

Sommaire

Liste d'abréviations.....	10
Introduction	12
Préambule	12
Première partie : Développement des cancers.....	13
1. Oncogénèse.....	13
2. Antigènes tumoraux.....	14
3. Concept d'immunosurveillance.....	19
4. De l'immunosurveillance à l'immunoédition.....	21
5. Controverse de l'immunosurveillance.....	22
Deuxième partie : Immunité antitumorale.....	25
1. Mécanismes non spécifiques d'antigènes.....	25
1.1 Cellules NK	25
1.2 Cellules NKT	27
2. Mécanismes spécifiques d'antigènes.....	28
2.1 Immunité à médiation cellulaire	28
2.2 Immunité humorale	30
2.3 Rôle central des cellules dendritiques	31

2.3.1 Ontogénie et sous-populations de DCs.....	33
2.3.2 Biologie des DCs	35
2.3.3 Récepteurs exprimés par les DCs	37
2.3.4 Les DCs dans le contexte tumoral	39
3. Mécanismes d'échappement tumoral	42
3.1 Diminution de l'expression des molécules de CMH par les cellules tumorales	42
3.2 Résistance aux mécanismes cytotoxiques	43
3.3 Immunosuppression.....	43
3.3.1 Synthèse d'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO).....	43
3.3.2 Dérégulation des « immune checkpoints ».....	44
3.3.3 Sécrétion de cytokines immunosuppressives	45
3.3.4 Recrutement de cellules immunorégulatrices.....	46
3.3.4.1 Tregs	46
3.3.4.2 Macrophages.....	48
3.3.4.3 Cellules myéloïdes suppressives (MDSCs).....	48
Troisième partie : Immunothérapies antitumorales	50
1. Immunothérapies non spécifiques	50
1.1 Cytokines.....	50

1.2 Agonistes de TLR & Adjuvants	52
1.3 Anticorps monoclonaux.....	53
1.3.1 Principes de conception des anticorps monoclonaux	53
1.3.2 Anticorps monoclonaux ciblant des cellules tumorales	54
1.3.3 Anticorps monoclonaux immunomodulateurs ou « inhibiteurs de checkpoints ».....	55
1.4 Thérapies cellulaires	56
1.5 CAR-T-cells	57
2. Vaccination thérapeutique	58
2.1 Choix de l'antigène.....	58
2.2 Vaccination cellulaire	60
2.3 Vaccins non cellulaires.....	61
2.3.1 Vaccins peptidiques.....	62
2.3.2 Vaccins nucléiques	64
2.3.3 Inconvénients des formulations peptidiques et nucléiques	65
2.3.4 Vecteurs dérivés de microorganismes	65
2.3.5 Vecteurs non viraux.....	67
2.3.5.1 Ciblage des DCs via des constructions protéiques.....	68
2.3.5.1.1 Constructions basées sur des anticorps.....	68

2.3.5.1.2 Constructions basées sur des dérivés de microorganismes ...	70
2.3.5.2 Ciblage des DCs via des liposomes.....	70
2.3.5.3 Stratégie de lipopolyplexes à ARNm (LPR) mannosylés	72
Objectifs de thèse.....	75
Résultats	77
Discussion	122
Quel est, par rapport aux autres stratégies vaccinales, l'avantage des LPR trimmanosylés en termes de ciblage des DCs ?	123
Quel est, par rapport aux autres stratégies vaccinales, l'avantage des LPR trimmanosylés en termes d'induction de réponse immune inflammatoire ?.....	124
Comment pourrait-on optimiser la réponse thérapeutique ?.....	126
Schéma vaccinal	126
Etude de l'effet de la vaccination sur le microenvironnement tumoral.....	127
Choix de l'antigène.....	127
Quantité d'antigène disponible.....	128
Voies et sites d'injection	128
Combinaisons thérapeutiques	129
Caractérisation de la réponse immune induite sur cellules humaines	131
Conclusion	135
Bibliographie.....	136

Liste d'abréviations

ADCC Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity

AICD Activation-induced cell death

APC Antigen-presenting cell

C57Bl/6 lignée de souris consanguines

CAR Chimeric antigen receptor

CCR C-C chemokine receptor

CD Cluster of differentiation

cDC Cellule dendritique conventionnelle

CEA Carcinoembryonic antigen

CMV Human cytomegalovirus

CTL Lymphocyte T cytotoxique

CTLA-4 Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

CyaA Adenylate cyclase

DAMP Damage-association molecular pattern

DC Cellule dendritique

DC-SIGN DC-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

DNA Acide deoxyribonucleique

E6 protéine E6 du papillomavirus humain HPV16

E7 protéine E7 du papillomavirus humain HPV16

EGF Epidermal growth factor

EGFR Epidermal growth factor receptor

ELISpot Enzyme linked immunosorbent spot

Fas-L Fas-ligand

Fc Fragment crystallizable region

FGF Fibroblast growth factor

FoxP3 Forkhead box protein P3

GFP Green fluorescent protein

GM-CSF Granulocyte-macrophage colony stimulating factor

HER2/Neu Human epidermal growth factor receptor 2

HBV Hepatitis B virus

HCV Hepatitis C virus

HIV Human immunodeficiency virus

HLA Human leukocyte antigen

HPV Human papillomavirus

IFN- γ Interferon gamma

Ig Immunoglobulin

ID Intradermique

iDC Cellule dendritique intersituelle	PD-1 Programmed cell death 1
IL Interleukine	pDC Cellule dendritique plasmocytoïde
mAb Monoclonal antibody	PD-L1 Programmed death ligand 1
MAGE Melanoma-associated antigen	PEGHpK PEGylated histidylated polylysine
MDSC Myeloid-derived suppressor cell	RAG Recombinase activated gene
MHC Major histocompatibility complex	SC Sous-cutané
MIP Macrophage inflammatory protein	SCID Severe combined immunodeficiency
MINCLE Macrophage inducible Ca ²⁺ -dependent lectin	TA Tumor antigens
MN-LPR monomannosylated mRNA lipopolyplexe	TAA Tumor-associated antigen
MMP Matrix metalloproteinase	TAM Tumor-associated macrophages
mRNA Messenger ribonucleic acid	TSA Tumor-specific antigen
NF- κ B Nuclear factor-kappa B	TC-1 lignée cellulaire murine
NK Natural killer	TCR T-cell receptor
NKT Natural killer T cell	TGF- β Transforming growth factor beta
LC Langerhans cells	Th T-helper
OVA Ovoalbumin	TNF- α Tumor necrosis factor alpha
p53 Protein 53	TLR Toll-like receptor
PARP Poly-ADP-ribo-polymerase	Treg T regulatory cells
PBMC Peripheral blood mononuclear cells	triMN-LPR trimonomannosylated mRNA lipopolyplexe
PCR Polymerase chain reaction	VEGF Vascular endothelial growth factor

Introduction

Préambule

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde. La découverte et la caractérisation des mécanismes moléculaires de l'oncogenèse ont permis l'élaboration de thérapies anti-tumorales telles que la chimiothérapie ou la radiothérapie. Cependant, les cellules malignes échappent souvent à ces traitements, rendant ainsi nécessaire le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Depuis 20 ans, on assiste à l'émergence de plusieurs de ces thérapies innovantes. En particulier, la mise en évidence du rôle du système immunitaire dans le contrôle et l'apparition des tumeurs, a permis l'apparition de nombreuses immunothérapies, qui ont pour but de mobiliser le système immunitaire du patient contre sa propre tumeur. Ces immunothérapies ont donné lieu à de nombreux essais cliniques, à plusieurs autorisations de mise sur le marché, et représentent une véritable révolution dans la prise en charge des patients atteints de cancer.

Parmi ces immunothérapies, la vaccination thérapeutique a pour but d'induire une réponse cytotoxique dirigée contre un antigène tumoral. Pour permettre l'induction d'une telle réponse immune, les cellules dendritiques sont des cibles de choix car elles sont spécialisées dans la présentation d'antigènes et l'activation de la réponse immune adaptative.

Mon projet de thèse porte sur une stratégie de vaccination thérapeutique dont le but est justement de cibler les cellules dendritiques, par le biais de résidus mannoses présentés à la surface de lipopolyplexes encapsulant des ARN codant des antigènes tumoraux, afin de leur faire exprimer ces antigènes tumoraux, et de permettre l'induction d'une réponse cytotoxique spécifiquement dirigée contre ces antigènes.

Première partie : Développement des cancers

1. Oncogenèse

La cellule eucaryote est régie par une multitude de gènes ayant pour fonction de maintenir l'intégrité du génome, de contrôler la prolifération cellulaire et de réguler son métabolisme. Certaines instabilités génétiques et épigénétiques peuvent amener à des mutations de ces gènes, entraînant une dysfonction de la cellule et sa transformation en cellule tumorale. Les sources d'instabilité génétique amenant de telles transformations sont nombreuses et regroupent, entre autres, les rayonnements ionisants, les protéines virales oncogènes, mais aussi un état métabolique altéré, résultant de l'accumulation de facteurs oxydants (Alexandrov et al., 2013).

Les altérations génétiques ainsi présentées par les cellules tumorales leur permettent d'acquérir de nouvelles capacités, et ses capacités ont été décrites par R. Weinberg comme des caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011). Parmi ces caractéristiques, on retrouve un potentiel prolifératif illimité, une insensibilité aux signaux inhibant la croissance, une capacité d'invasion tissulaire et un potentiel métastatique, une insensibilité aux signaux pro-apoptotiques, une autosuffisance en signaux de croissance, une dérégulation du métabolisme énergétique, un échappement immunitaire et une induction de la néo-angiogenèse.

Ces caractéristiques sont plus ou moins importantes en fonction des tumeurs et de leurs histoires naturelles, et aboutissent à des degrés variés d'agressivité ainsi qu'à des capacités variables d'invasion métastatique, de néo-angiogenèse et de résistance au système immunitaire.

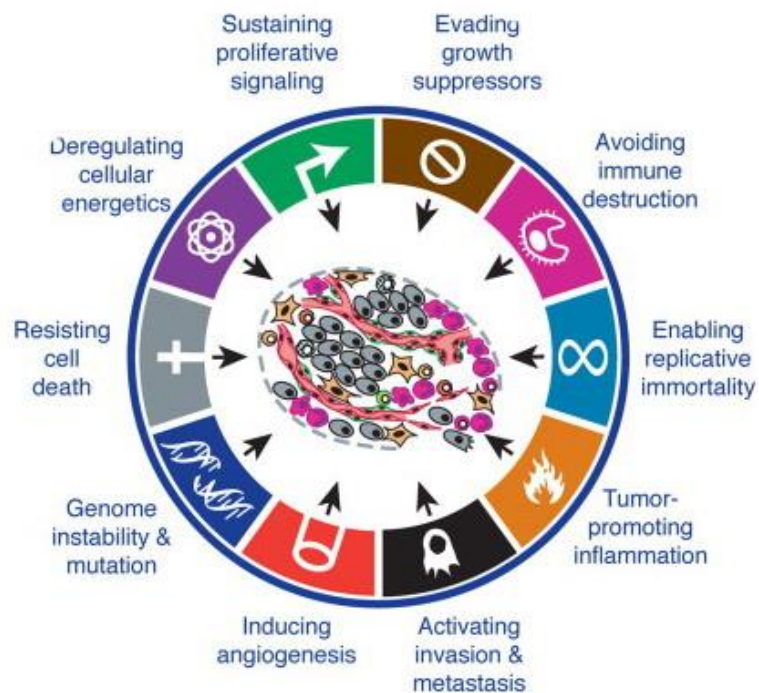


Figure 1 : Caractéristiques des cellules tumorales. D'après (Hanahan and Weinberg, 2011)

2. Antigènes tumoraux

Du fait de leur altération génétique, les cellules tumorales expriment donc des protéines qui diffèrent des protéines du soi, normalement exprimées par les cellules saines. Ces protéines mutées peuvent être qualitativement différentes des protéines non mutées, mais peuvent aussi résulter d'une surexpression d'une protéine normale. Dans ces deux cas, elles peuvent être considérées comme des antigènes tumoraux. Les antigènes tumoraux sont classés en plusieurs catégories, selon leur spécificité vis-à-vis de la tumeur, leur immunogénicité et leur origine.

P. van der Bruggen *et al.* ont élaboré une base de données ayant pour objectif de rassembler les nombreux antigènes ainsi mis en évidence. Cette base de donnée est disponible sur internet (Bruggen et al., Peptide Database, Cancer Immunity, <http://cancerimmunity.org.gate2.inist.fr/peptide/>), et est régulièrement mise à jour (dernière mise à jour : octobre 2015).

On y distingue plusieurs classes d'antigènes : les antigènes associés aux tumeurs (TAA), qui sont les protéines du soi surexprimées par les cellules tumorales mais dont l'expression n'est pas restreinte à la tumeur ; et les antigènes spécifiques des tumeurs (TSA) qui sont, pour leur part, absents des cellules non malignes.

Les TAA sont très nombreux, ils peuvent être des protéines surexprimées, des protéines de différenciation, ou des protéines dont l'expression est altérée. Les principaux TAA sont repris dans le tableau suivant (Tableau 1) :

Catégorie	Exemples	Histologie	Travaux princeps
Protéines surexprimées	HLA-DOβ	Plusieurs types	(Kang et al., 2013)
	Hepsine	Plusieurs types	(Guo et al., 2013)
	WT1	Leucémies	(Inoue et al., 1994)
	BING-4	Mélanome	(Rosenberg et al., 2002)
	Calcium-activated chloride channel 2	Cancer du poumon	(Konopitzky et al., 2002)
	Cyclin-B1	Plusieurs types	(Yu et al., 2002)
	9D7	Cancer du rein	(Klade et al., 2002)
	Ep-CAM	Cancer du sein	(Gastl et al., 2000)
	EphA3	Plusieurs types	(Chiari et al., 2000)
	Her2/neu	Cancer du sein (et autres types)	(Fisk et al., 1995; Peoples et al., 1995)
	Telomerase	Plusieurs types	(Vonderheide, 2002)
	Mesotheline	Cancer du pancréas	(Argani et al., 2001)
	5T4	Plusieurs types	(Hole and Stern, 1990)
	SAP-1	Cancer colorectal	(Seo et al., 1997)
Survivine	Plusieurs types	(Ambrosini et al., 1997)	
Protéines de différenciation associées aux tumeurs	Melan-A/MART-1	Mélanome	(Kawakami et al., 1994)
	Gp100	Mélanome	(Bakker et al., 1994)
	Tyrosinase	Mélanome	(Brichard et al., 1993)
	TRP-1/-2	Mélanome	(Kawakami et al., 1998; Wang et al., 1996)
	polypeptide P	Mélanome	(Touloukian et al., 2001)
	MC1R	Mélanome	(Salazar-Onfray et al., 1997)
	CEA	Cancers colorectaux	(Kantor et al., 1992)
	Mammaglobine A	Cancer du sein	(Jaramillo et al., 2002)
	NY-BR-1	Cancer du sein	(Wang et al., 2006)
	NY-MEL-1	Mélanome	(Walton et al., 2006)
	OA1	Mélanome	(Touloukian et al., 2003)
	PSA	Cancer de la prostate	(Alexander et al., 1998)
PAP	Cancer de la prostate	(Olson et al., 2010)	
Protéines comportant des altérations post-transcriptionnelles	MUC1	Cancer du pancréas, rein	(Finn et al., 1995; Jerome et al., 1991; Kufe, 2010)

Tableau 1 : Différentes catégories des antigènes associés aux tumeurs (TAA) adapté de (Zarour et al., 2003 ; Linley et al., 2011 ; Bruggen et al., 2015)

Les TSA, ensuite, peuvent être de plusieurs origines différentes :

- Les antigènes de la famille *cancer testis*, souvent assimilés aux TSA, sont normalement exprimés par les cellules d'origine testiculaire et les cellules placentaires. Cependant, ces tissus sont des sites immunoprivilégiés et n'expriment pas de molécules de classe I du CMH à la surface de leurs cellules. NY-ESO-1, PRAME, CT83, SSX2 et la famille MAGE, sont les principaux représentants de cette famille et sont partagés par de nombreux types de tumeurs (Chen et al., 1997; Ikeda et al., 1997; Smith and McNeel, 2010). Le premier antigène tumoral décrit chez l'homme dans le mélanome (MAGE-1) appartient à cette catégorie (Bruggen et al., 1991).
- Les antigènes viraux : plusieurs virus, tels que le papillomavirus (HPV) de 16 ou 18 pour le cancer du col de l'utérus ou le virus de l'hépatite B pour les carcinomes hépatocellulaires, sont impliqués dans la transformation maligne des cellules infectées, *via* les onco-protéines virales. Ces protéines peuvent être apprêtées et présentées par les cellules néoplasiques, constituant ainsi des antigènes spécifiquement associés aux tumeurs (Boon et al., 1997). Les protéines E6 et E7 d'HPV 16, par exemple, sont exprimées par les cancers HPV-induits.
- Les néoantigènes, qui sont des protéines mutées hautement spécifique de la tumeur. Ils incluent les protéines mutées CDK4, p53, β -caténine, p53 ou caspase 8 (Ito et al., 2007; Mandruzzato et al., 1997; Robbins et al., 1996; Wölfel et al., 1995) dont les fonctions physiologiques permettent la régulation du cycle cellulaire, la prévention de l'apparition de tumeurs, de la survie cellulaire ou de l'apoptose. Lorsque ces protéines sont mutées, le risque de cancer est fortement accru, faisant d'elles des antigènes largement répandus dans plusieurs types de cancers. Par exemple, plus de 50% des cancers présentent une mutation de p53 (Surget et al., 2013). Dans certains cancers bronchiques, le gène codant l'ALK, par ailleurs fréquemment muté dans les lymphomes (Passoni and Gambacorti-Passerini, 2003), subit une fusion avec le gène EML4, aboutissant à la synthèse

d'un récepteur tyrosine kinase modifié ALK-EML4, dont l'expression est spécifique des cellules tumorales (Soda et al., 2007), ce qui confère à la tumeur une plus grande sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinases (Shaw et al., 2013). De même, on observe dans les leucémies myéloïdes chroniques une translocation entre la tyrosine kinase ABL et le gène BCR, aboutissant à la formation d'une protéine chimérique BCR-ABL, constituant un néoantigène spécifique des cellules tumorales présentant à la fois un intérêt diagnostique et thérapeutique.

Parallèlement, le séquençage comparatif d'ADN tumoral *versus* ADN sain du même patient a permis l'identification de nouveaux néoantigènes. Après identification génomique, ces épitopes sont synthétisés sous forme de peptides puis utilisés pour générer des tétramères permettant l'identification de lymphocytes T spécifiques dans le sang du patient, malgré des fréquences très faibles (Cohen et al., 2015a). L'identification de lymphocytes T spécifiques de ces antigènes montre qu'ils sont bien immunogènes. Ces nouveaux néoantigènes sont hautement variables entre les individus, et doivent être caractérisés pour chaque patient. Ils ouvrent la possibilité d'obtenir pour chaque patient un spectre d'antigènes spécifique de leur propre tumeur, permettant la mise en place d'immunothérapies personnalisées.

De plus, la quantification de ces néoantigènes peut être associée pour chaque patient à un pronostic de survie (Schumacher and Schreiber, 2015). En effet, les tumeurs présentant un nombre important de mutations uniques, sont associées à un meilleur pronostic, et à une meilleure réponse aux chimiothérapies (McGranahan et al., 2016).

On voit ici que la variété des antigènes tumoraux est très importante, et que chacun de ces antigènes a des propriétés immunogéniques et une distribution inter- et intra-individuelle qui lui est propre.

Il est donc essentiel dans le cadre d'immunothérapies ciblées de choisir l'antigène en fonction de toutes ces propriétés (immunogénicité et spécificité), afin d'obtenir la meilleure réponse thérapeutique possible, tout en induisant le moins possible d'effets indésirables. Dans

ce contexte, les TSA sont particulièrement intéressants, de par leur haute spécificité vis à vis de la tumeur et leur immunogénicité (Wang and Wang, 2017).

3. Concept d'immunosurveillance

Malgré l'existence d'antigènes tumoraux, le rôle du système immunitaire dans le développement et le contrôle des cellules tumorales n'a pas toujours été consensuel. C'est P. Ehrlich le premier qui a proposé l'idée d'un contrôle exercé par le système immunitaire sur les tumeurs cancéreuses (Ehrlich, 1909). Cette idée était alors supportée par les travaux de W. Coley qui montraient que l'inoculation d'une toxine, composée de *Streptococcus pyogenes* et de *Serratia marcescens*, induisait un taux de réponse de 10% chez les patients atteints de sarcome des tissus mous (Coley, 1906). Parallèlement, D.M. Scott montra qu'il était impossible de transplanter une tumeur dans des souris immunocompétentes. Cependant, les travaux de W.H. Wolgom démontrèrent que le rejet observé était dû à la reconnaissance d'un tissu allogénique plutôt qu'à un rejet spécifique de la tumeur (Wolgom, 1929).

Le concept d'immunosurveillance est réapparu dans les années 1950 avec le développement de souches consanguines de souris, permettant de s'abstraire de la réaction allogénique. Les souris, préalablement immunisées contre les virus oncogènes tel que SV40, développaient une résistance à la greffe syngénique de tumeurs induites par ce virus, mais restaient sensibles à l'apparition de tumeurs induites par un autre virus (Prehn and Main, 1957), montrant ainsi que l'induction préalable d'une réponse immunitaire spécifique d'antigènes associés à la tumeur, permettait de prévenir l'apparition des tumeurs exprimant ces antigènes.

Intégrant ces nouvelles connaissances, M. F. Burnet a reformulé le principe proposé par P. Ehrlich de la façon suivante : « Le système immunitaire peut éliminer des néoplasies émergentes si elles expriment un néoantigène, protégeant ainsi l'organisme de l'apparition de cancers » (Burnet, 1957)

À la même époque, L. Thomas suggéra que l'immunité à médiation cellulaire avait pour rôle de protéger de néoplasies émergentes, afin de maintenir l'homéostasie tissulaire dans les organismes pluricellulaires complexes (Thomas, 1959).

Ces notions ont finalement abouti à l'élaboration du concept d'immunosurveillance, proposé par M. F. Burnet selon laquelle le système immunitaire permettait l'élimination ou l'inactivation des cellules mutantes potentiellement dangereuses, et que les lymphocytes y jouaient le rôle de sentinelles (Burnet, 1971).

Avec le développement des souris *nude* athymiques, comme premiers modèles de souris immunodéficientes, apparurent les premières controverses quant au rôle du système immunitaire sur le contrôle des tumeurs. En effet, si les souris *nude* - dépourvues de lymphocytes T - présentaient une susceptibilité accrue aux cancers viro-induits et aux lymphomes, l'incidence des autres tumeurs, spontanées ou induites par un carcinogène, était la même que chez les souris de phénotype sauvage (Burstein and Law, 1971; Grant and Miller, 1965). Il apparut rapidement que la fréquence élevée des tumeurs viro-induites reflétait en fait une plus grande sensibilité des souris *nude* aux agents infectieux. Il fut aussi proposé que l'augmentation de l'incidence de lymphomes était en réalité due à la stimulation anormale des lymphocytes, dans un contexte d'infections chroniques (Stutman, 1975).

Par ailleurs, R.T. Prehn montra qu'il existait une corrélation entre la dose de carcinogène administré et l'immunogénicité de la tumeur (Prehn, 1975). Puisque les cancers humains résultent le plus souvent d'une longue exposition à de faibles doses d'agents carcinogènes, l'idée selon laquelle les tumeurs émergentes n'étaient pas ou peu immunogènes fut alors proposée.

Le concept d'immunosurveillance fut abandonné, et L. Thomas reconnut que les modèles animaux disponibles à l'époque ne permettaient pas de montrer formellement l'existence d'une immunosurveillance du cancer (Thomas, 1982).

4. De l'immunosurveillance à l'immunoédition

Les décennies qui suivirent virent l'apparition de nombreux modèles expérimentaux, avec en particulier de nouvelles souris immunodéficientes. Ces modèles permirent de combler les lacunes des souris *nude*, dont seuls les lymphocytes T thymo-dépendants étaient absents, et de conclure quant au rôle du système immunitaire dans le contrôle des tumeurs. En effet, l'équipe de Schreiber montra en 2001 que les souris RAG2^{-/-} STAT1^{-/-}, qui présentent un déficit en lymphocytes B et T ainsi qu'en IFN γ , sont plus sensibles aux sarcomes induits par le méthylcholanthrene (MCA) et aux tumeurs épithéliales spontanées (Shankaran et al., 2001). Ces travaux permirent également de montrer que les tumeurs spontanées issues de souris immunocompétentes étaient moins immunogènes que celles issues de souris immunodéficientes RAG2^{-/-} STAT1^{-/-}.

Ces nouveaux résultats amenèrent R. Schreiber à reconsidérer la notion d'immunosurveillance et à proposer la notion nouvelle d'immunoédition. L'Immunoédition décrit la double capacité du système immunitaire à éliminer les cellules tumorales tout en exerçant sur elles une pression de sélection favorisant finalement les mécanismes d'échappement (Dunn et al., 2002). Ce rôle ambivalent du système immunitaire permet d'expliquer l'apparent paradoxe de la formation de tumeurs dans des individus immunocompétents. Le concept d'immunoédition fut formalisé en « théorie des trois E » selon laquelle le système immunitaire joue d'abord un rôle d'Élimination, avant d'entrer en Équilibre avec la tumeur qui finit par développer des mécanismes d'Échappement (Dunn et al., 2004).

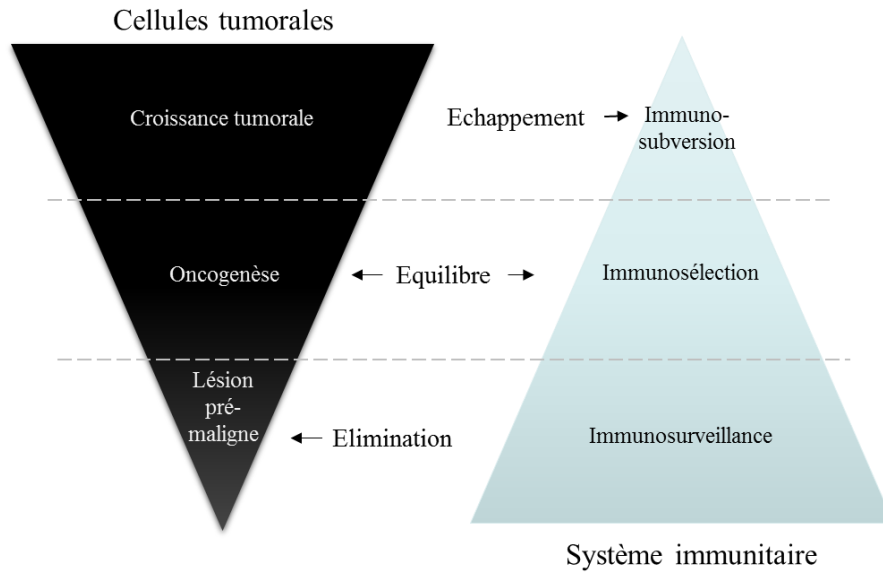


Fig. 2 : Théorie des trois E. Le système immunitaire exerce un rôle d'Elimination sur les lésions pré-malignes. Cette pression de sélection entre en équilibre avec les cellules tumorales qui entrent dans une voie d'oncogenèse. La tumeur échappe ensuite au système immunitaire et se développe de manière non contrôlée. Adapté de (Tesniere et al., 2009).

5. Controverse de l'immunosurveillance

Suite au modèle décrit par R. Schreiber, T. Blankenstein répondit qu'il n'existait aucune preuve formelle de l'apparition précoce de lymphocytes T effecteurs (T_{eff}) dans le contexte de tumeurs spontanées (Blankenstein, 2007), ainsi que de leur supposée efficacité, remettant ainsi en cause le rôle de l'immunoédition dans la survenue de cancers.

Ses critiques visaient en premier lieu le modèle expérimental des sarcomes induits par exposition au MCA, arguant que la susceptibilité accrue des souris immunodéficientes aux tumeurs induites par le MCA pouvait être causée par un défaut de réparation tissulaire après exposition au MCA, plutôt qu'à l'absence de T_{eff} . Il rappela aussi que la susceptibilité accrue des souris immunodéficientes aux pathogènes pouvait induire un état inflammatoire chronique favorisant le développement de tumeurs (Enzler et al., 2003; Erdman et al., 2003).

De plus, dans une réponse à l'article de Dunn *et al.*, il montra que les souris Rag-/- maintenue et élevées dans les mêmes conditions que les souris immunocompétentes ne montraient significativement pas plus de tumeurs chimio-induites que les souris immunocompétentes (Qin and Blankenstein, 2004).

Enfin, Blankenstein montra, dans un modèle de tumeurs spontanées, que les cellules tumorales ayant subi un long processus d'oncogenèse étaient toujours immunogènes (elles étaient rejetées après transplantation chez une souris immunocompétente), et que même si elles permettaient la mise en place de réponses cellulaires et humorales spécifiques, ces réponses immunes étaient non-fonctionnelles ; démontrant ainsi que l'immunogénicité de la tumeur n'était pas directement liée à l'efficacité de la réponse immune (Willimsky and Blankenstein, 2005).

Parallèlement, un modèle de tumeur pancréatique spontanée montre que, contrairement à l'idée proposée par *Schreiber*, les lymphocytes T spécifiques de la tumeur restent naïfs au début de l'oncogenèse (Lyman et al., 2004) et s'activent lorsque la tumeur grossit, grâce à l'augmentation de la quantité d'antigène disponible (Nguyen et al., 2002). Cependant, les T_{eff} ainsi activés ne sont plus capables de contrôler efficacement la tumeur car cette dernière est réfractaire à l'infiltration et/ou a déjà induit des phénomènes immunosuppresseurs locaux.

Chez l'Homme, une méta-analyse a permis la caractérisation de 28 types de cancers différents chez des patients immunodéprimés, qu'ils soient transplantés rénaux ou séropositifs pour le VIH (Grulich et al., 2007). Selon la théorie de l'immunosurveillance, les patients immunodéprimés devraient présenter un risque accru pour tout type de cancers. Or, les résultats ont montré que seuls les cancers viro-induits ou reliés à une cause infectieuse, et les lymphomes, présentaient une apparition significativement plus importante chez ces patients. Ces résultats semblent donc contredire la théorie de l'immunosurveillance, car l'augmentation d'apparition des cancers liés à un agent infectieux peut s'expliquer par la plus grande sensibilité des patients à ces dits agents infectieux, et l'augmentation des lymphomes peut quant à elle être liée à la stimulation anormale des lymphocytes, dans un contexte d'infections

chroniques. En effet, plusieurs études mettent en avant le rôle pro-tumoral de la réponse inflammatoire chronique (Balkwill et al., 2005). Celle-ci peut favoriser la progression tumorale en stimulant l'angiogenèse, et en sécrétant des facteurs solubles comme le TNF α (Karin et al., 2006) ou l'IL6 (Naugler et al., 2007). Différentes études montrent d'ailleurs que l'inflammation chronique chez l'Homme est un facteur de risque pour l'apparition de plusieurs cancers (Coussens and Werb, 2002).

Enfin, Blankenstein conclut qu'« il importe peu que l'immunosurveillance du cancer existe ou non, si les composants du système immunitaire peuvent être manipulés afin d'agir efficacement contre le cancer » (Blankenstein, 2007). Pour aller dans ce sens, je vais à présent aborder les différents mécanismes immunitaires pouvant agir contre les cellules tumorales.

Deuxième partie : Immunité antitumorale

1. Mécanismes non spécifiques d'antigènes

1.1 Cellules NK

Les cellules NK ($CD56^+CD3^-$) sont divisées en 2 sous-populations : la première représente environ 10% des cellules NK, et est caractérisée par l'absence d'expression du marqueur CD16 et par la forte expression de CD56 ($CD56^{bright}CD16^-$). Cette population est essentiellement présente dans les ganglions ; elle est spécialisée dans la production de cytokines, en particulier d' $IFN\gamma$, et possède une forte capacité de prolifération.

La deuxième population est majoritaire et correspond aux NK cytotoxiques que l'on connaît, caractérisées par la double expression de CD56 et du marqueur CD16 ($CD56^{dim}CD16^+$). De manière intéressante, les cellules NK $CD16^-$ peuvent se différencier en cellules NK cytotoxiques (Chan et al., 2007).

Les cellules NK cytotoxiques expriment un large répertoire de récepteurs inhibiteurs ou activateurs permettant la discrimination de cellules présentant un « soi » altéré. La plupart de ces récepteurs appartiennent à la superfamille des immunoglobulines ou des lectines de type C. Les récepteurs inhibiteurs sont hautement polymorphiques et reconnaissent de nombreux variants alléliques du CMH de classe I (Lanier, 2005; Waldhauer and Steinle, 2008).

Les récepteurs activateurs parmi lesquels on peut citer Nkp30, NKp44, NKp46 et NKG2D, reconnaissent d'autres variants du CMH I dont l'expression est sensible au stress cellulaire. Le marqueur CD16, qui reconnaît la partie constante des anticorps et qui intervient dans le mécanisme de cytolyse médiée par les anticorps (ADCC), est lui aussi un récepteur activateur des cellules NK.

C'est l'équilibre entre les signaux activateurs et les signaux inhibiteurs qui détermine si la cellule NK va s'engager ou non dans une voie de cytolyse. Dans le contexte tumoral,

l'inhibition de l'expression du CMHI, d'une part, et l'expression de marqueurs de stress par les cellules tumorales d'autre part, participent à la mise en place d'une réponse cytotoxique par les cellules NK. Cette cytotoxicité est médiée par les voies perforine et granzyme, ainsi que par l'expression de FasL et la sécrétion de TNF β .

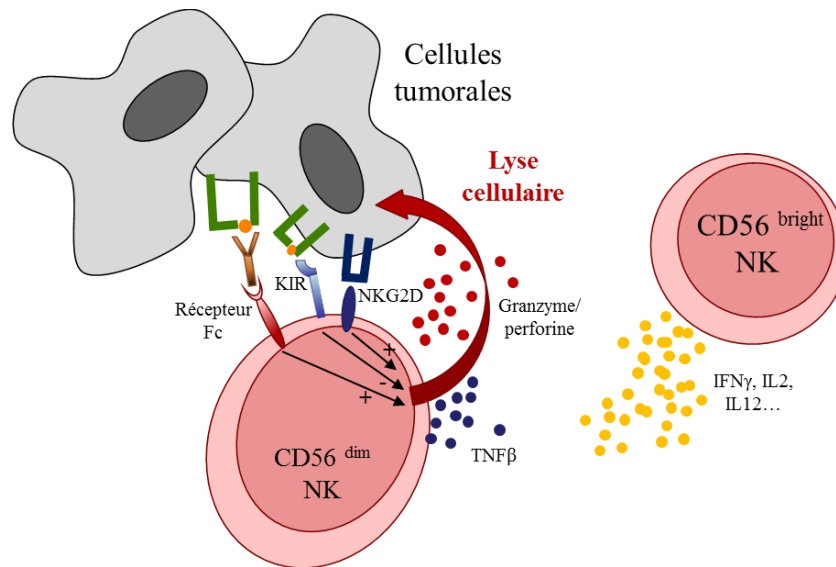


Fig. 3 : Mécanisme d'action des cellules NK. Les cellules NK cytotoxiques discriminent les cellules du « soi » par le biais de nombreux récepteurs activateurs ou inhibiteurs. C'est l'équilibre entre ces récepteurs qui va décider si la cellule entre dans une voie de cytolyse ou non. Parallèlement, les cellules NK CD56^{bright} participent à l'instauration d'un contexte proinflammatoire en sécrétant de l'IFN γ

L'analyse du microenvironnement tumoral a pu montrer que, dans ce contexte, l'infiltration de la tumeur par les cellules NK est associée à un meilleur pronostic dans plusieurs carcinomes et adénocarcinomes (Lundgren et al., 2016; Wagner et al., 2016; Villegas et al., 2002; Ishigami et al., 2000).

Les cellules NK sont en effet particulièrement efficaces pour lyser des cellules tumorales n'exprimant plus les molécules du CMH de classe I. Leur rôle peut donc apparaître complémentaire à celui des lymphocytes T CD8 nécessitant l'expression du CMH de classe I sur sa cible. De plus, les cellules tumorales peuvent exprimer des signaux de dangers, reconnus par les récepteurs activateurs des cellules NK, ce qui favorise l'action cytotoxique des NK.

1.2 Cellules NKT

Comme les lymphocytes T, les cellules NKT expriment le marqueur CD3 ainsi qu'un TCR $\alpha\beta$. Leur TCR a la spécificité d'être semi-invariant et de reconnaître des antigènes glycolipidiques présentés sur la molécule de CMH I non classique CD1d. Les NKT expriment aussi de nombreux marqueurs typiques des cellules NK comme le récepteur NKG2D, le CD16 et le CD56. (Altman et al., 2015)

Après activation, les NKT peuvent induire une cytotoxicité de la cellule cible par l'intermédiaire des voies granzyme perforine ainsi que par l'expression des molécules FasL et TRAIL.

Par ailleurs, l'expression de CD40L par les NKT leur permet d'interagir avec le CD40 des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), et de sécréter un large éventail de cytokines proinflammatoires comme l'IFN γ , l'IL2 et l'IL12 qui vont agir sur le microenvironnement tumoral. La nature des cytokines sécrétées dépend de l'antigène reconnu par les NKT. L' α -Galactosylceramide (α -GalCer), par exemple, induit une forte réponse IFN γ (Sullivan et al., 2010).

Dans le contexte tumoral, les NKT ont montré un rôle dans le développement d'un modèle murin de carcinome hépatique. Ainsi, les souris privées de NKT fonctionnelles présentaient une tumeur plus agressive (Anson et al., 2012), suggérant que les NKT peuvent jouer un rôle dans le contrôle des cellules tumorales.

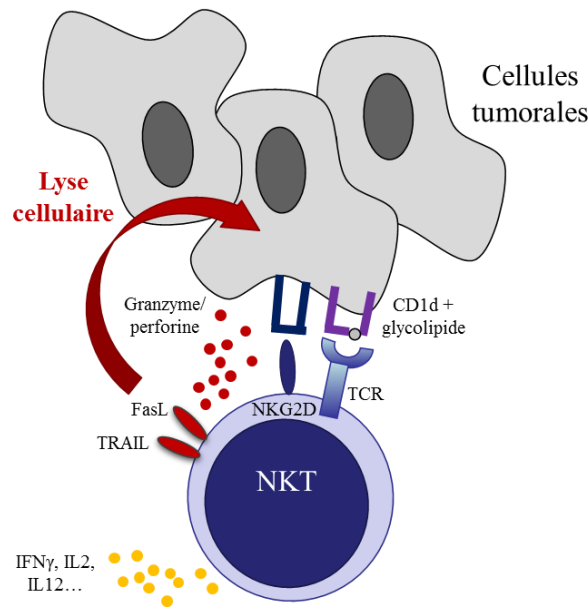


Fig. 4 : Mécanisme d'action des cellules NKT. Les cellules NKT peuvent reconnaître des antigènes glycolipidiques via un TCR $\alpha\beta$. Après activation, elles engagent une réponse cytotoxique contre la cellule cible.

2. Mécanismes spécifiques d'antigènes

2.1 Immunité à médiation cellulaire

Je vais à présent décrire les mécanismes effecteurs de la réponse immunitaire, spécifique d'antigène, en abordant tout d'abord la réponse à médiation cellulaire dont les effecteurs principaux sont les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTLs).

Les CTLs sont spécialisés dans la reconnaissance et la lyse des cellules infectées ou transformées. *Via* leur TCR (T cell receptor), ils peuvent en effet reconnaître les antigènes présentés sur le CMH I des cellules tumorales et, s'ils ont été correctement activés, engager une réponse de type cytotoxique. Cette réponse est médiée par les voies granzyme et perforine, ainsi que par les molécules proapoptotiques TRAIL (CD253) et FasL (CD178).

Leur état d'activation est essentiel pour la mise en place d'une réponse cytotoxique efficace, et ce sont les cellules dendritiques (DC) qui jouent un rôle central dans cette activation. Elles capturent les antigènes présents dans le microenvironnement tumoral, et les présentent aux lymphocytes T effecteurs. Si cette présentation est associée à l'expression de molécules de costimulation (CD80, CD86, CD40) et à la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les DC, alors les lymphocytes T effecteurs vont pouvoir acquérir un phénotype activé, avec toutes les fonctions cytotoxiques qui y sont liées.

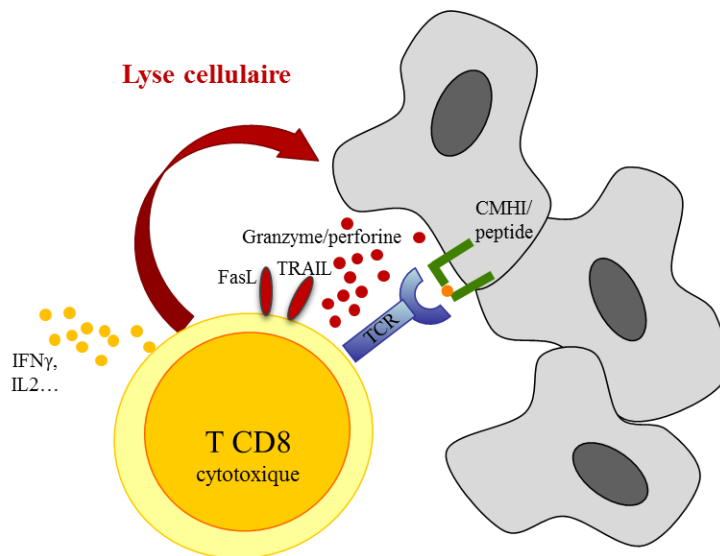


Fig. 5 : Mécanisme d'action des lymphocytes T CD8. Les lymphocytes T CD8 reconnaissent l'antigène tumoral via leur TCR, et engagent une réponse cytotoxique contre la cellule cible.

Dans le contexte tumoral, l'état de maturation des DC est donc primordial pour l'orientation et l'efficacité de la réponse T cytotoxique. Malheureusement, et comme je vais l'aborder plus loin, ce contexte n'est pas toujours propice à l'activation des DC.

Des analyses de différents microenvironnement tumoraux ont pu montrer par ailleurs que la forte densité de CTLs au sein du microenvironnement tumoral est associée à un meilleur pronostic dans de nombreux types de cancers comme le mélanome, le cancer du sein, les cancers des voies aérodigestives supérieures, le cancer colorectal, et le cancer du poumon (Fridman et al., 2012).

2.2 Immunité humorale

Les mécanismes suppresseurs de tumeurs peuvent aussi reposer sur les anticorps, qui permettent la mise en place de mécanismes cytotoxiques comme l'ADCC et la lyse par le complément.

Les anticorps spécifiques d'antigènes sont synthétisés par des plasmocytes. Ces plasmocytes sont des lymphocytes B activés qui, après une reconnaissance de l'antigène via leur BCR (B cell receptor), et une costimulation des lymphocytes T CD4 *helper* Th2, ont pu subir au niveau des centres germinatifs une hypermutation somatique et une maturation d'affinité. Les plasmocytes sécrètent de grandes quantités d'anticorps de différentes classes isotypiques, en particulier des IgG.

Au sein du microenvironnement tumoral, les IgG ainsi sécrétées se fixent sur les cellules tumorales et permettent le recrutement des cellules NK via leur récepteur à la partie constante des anticorps (récepteur Fc), le CD16. Le CD16 ainsi activé va permettre d'orienter la cellule NK vers une voie de cytotoxicité. Les macrophages peuvent eux aussi être recrutés via leur récepteur Fc, et participer à l'élimination des cellules tumorales par phagocytose.

En plus de recruter des cellules cytotoxiques, les IgG1 et les IgG3 permettent la fixation de la protéine C1. Cette protéine initie la voie classique du complément, dont la cascade d'évènements aboutit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire permettant la lyse des cellules tumorales.

Dans le contexte tumoral, des IgG spécifiques d'antigènes tumoraux ont été retrouvés dans le sérum de nombreux patients (Garranzo-Asensio et al., 2016; Ghalamfarsa et al., 2017; Wandall et al., 2010), et leur présence peut être associée à un meilleur pronostic, dans le cancer gastrique en particulier (Kurtenkov et al., 2007; Smorodin et al., 2013).

2.3 Rôle central des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Elles sont caractérisées par leur capacité à capturer des antigènes, à les apprêter et à les présenter sous forme de peptides associés au CMH de classe I ou de classe II, permettant ainsi l'activation des lymphocytes T CD4 et CD8. Elles possèdent de plus des capacités migratoires importantes.

Toutes ces caractéristiques lui confèrent un rôle central dans l'immunosurveillance, puisque, comme illustré sur la figure 6, les mécanismes cytotoxiques, qu'ils soient cellulaires ou médiés par les anticorps, sont contrôlés directement ou indirectement par la cellule dendritique.

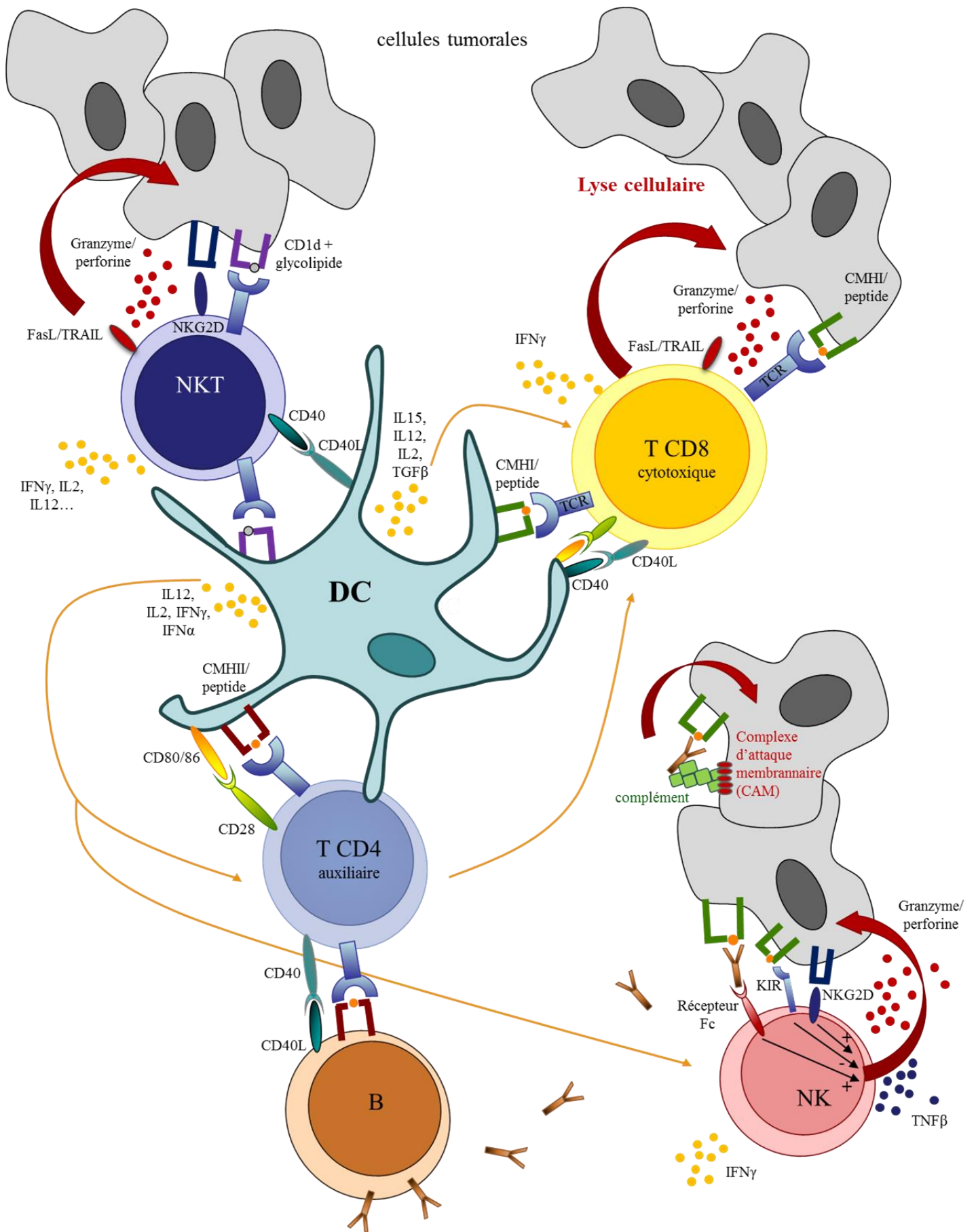


Figure 6 : Rôle central de la cellule dendritique pour l'induction de la réponse immunitaire. La cellule dendritique peut directement activer les cellules NKT, les cellules NK, ainsi que la réponse adaptative T CD4 et T CD8. Indirectement, elle participe à l'activation de la réponse B, par le biais des lymphocytes T CD4 helper.

2.3.1 Ontogénie et sous-populations de DCs

Les cellules dendritiques (DCs) ont été décrites pour la première fois par R. Steinman en 1973 (prix Nobel, 2011). Elles constituent une famille très hétérogène de cellules, tant au niveau de leur morphologie qu'à celui de leur phénotype, de leur fonction, de leur localisation et de leur origine hématopoïétique.

Comme les autres cellules de la lignée hématopoïétique, les DCs se développent à partir de cellules souches hématopoïétiques. Pendant longtemps, il a été admis que les DCs dérivent d'un progéniteur myéloïde commun, à l'exception des DCs plasmocytoïdes, qui dérivent quant à elles d'un progéniteur lymphoïde (Shortman and Heath, 2010). Cependant des travaux récents montrent que l'ontogénie des DCs est plus complexe, et que les sous-populations de DCs, et en particulier les pDCs, peuvent partager plusieurs origines à la fois myéloïdes et lymphoïdes (Merad et al., 2013; Shortman et al., 2013). La plasticité des DCs à se différencier à partir de deux types de précurseurs est, à ce jour, une caractéristique exclusive des DCs. Cette caractéristique leur permet d'adapter le nombre et la nature des DCs au sein d'un tissu, en fonction de l'état d'inflammation de ce dernier, et fait des DCs une population importante dans la mise en place et dans la régulation de la réponse immune.

Les sous-populations de DCs, initialement établies en fonction de leurs origines ontogéniques, sont maintenant principalement caractérisées par leur phénotype, leur fonction et leur localisation. Ces différentes sous-populations ainsi que les marqueurs les caractérisant, sont repris dans le tableau ci-après (Figure 7).





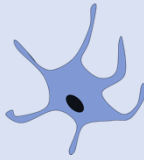

	pDCs	cDCs		infDCs	cellules de Langerhans	DCs du derme
						
humain	CD11c - BDCA2+ CD123+	BDCA3+ CD141+ CLEC9A+ XCR1+ Batf3	BDCA1+ CD1c+ CD1a+ CD11b+	CD206+ CD1c+ CD1a+ CD14+ CD64+	CD207+ E-cadherine+ CD1a+	CD209+ CD11c+ CD11b+ CD14+
souris	CD11c+ Siglech+ DEC205+	XCR1+ CD8α+ CLEC9A+ DEC205+ Batf3	CD11b+ CD11c+ CD172+	CD11c+ Ly6C+ CD64+	CD207+ E-cadherine+	CD172+ Dectin1+ Ly6C+

Fig. 7 : Caractéristiques phénotypiques des sous-populations de DCs. Les DCs peuvent être classées en différents sous-types définis selon leur phénotype, leur ontogénie et leur localisation. Adapté de (Merad et al., 2013).

Les DCs plasmocytoïdes (pDCs) sont spécialisées dans la production d'IFN de type I en réponse aux infections virales. Elles ont des capacités de capture et de présentation antigénique plus restreintes.

Les DCs conventionnelles (cDCs) sont composées de deux principaux groupes, caractérisés par des phénotypes différents. En fonction de leur localisation et de leur état d'activation, chacun de ces deux groupes peut être assimilé à des DCs résidentes ou des DCs

migratoires. Les DCs résidentes sont principalement situées dans les organes lymphoïdes secondaires, où elles vont rester de manière durable. Les DCs migratoires sont présentes dans les tissus périphériques et, après activation, vont migrer jusqu'au ganglion lymphatique le plus proche. (O'Keefe et al., 2015)

Les DCs inflammatoires (infDCs) sont absentes des tissus en dehors du contexte inflammatoire. En réponse aux cytokines pro-inflammatoires produites lors de la mise en place de la réponse innée, les monocytes du sang se différencient en infDCs, qui migrent alors jusqu'au ganglion drainant. Les infDCs ont des capacités importantes de présentation antigénique et d'activation des lymphocytes T (Segura and Amigorena, 2013).

Les cellules dendritiques naturellement présentes au niveau de la peau sont les cellules de Langerhans, dans l'épiderme, et les DCs du derme. Elles sont aussi capables de migrer jusqu'au ganglion drainant en cas d'inflammation.

2.3.2 Biologie des DCs

En tant que cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles, les DCs jouent un rôle central dans l'induction des réponses immunes et assurent le lien entre système immunitaire innée et adaptatif.

A l'état immature, les DCs sont spécialisées dans la capture d'antigènes. Cette capture est médiée par des mécanismes très variés comme la phagocytose, la micro- et la macropinocytose, ainsi que l'endocytose qui peut faire intervenir de nombreux récepteurs comme les récepteur Fc, les récepteurs au complément, les intégrines, les lectines de type C, les récepteurs aux corps apoptotiques mais aussi les récepteurs *scavengers* (Sabado et al., 2017).

Les antigènes sont ensuite présentés par la voie exogène sur le CMH de classe II, ce qui permet d'activer les lymphocytes T CD4. Alternativement, les antigènes exogènes peuvent aussi être pris en charge par la voie de cross-présentation afin d'être présenté sur le CMH de classe I, permettant l'activation des lymphocytes T CD8 (Segura and Amigorena, 2015).

Après exposition aux stimuli activateurs, les DCs engagent une série de changements phénotypiques et fonctionnels aboutissant à leur maturation. Ces stimuli activateurs sont souvent liés à la capture d'antigènes et sont perçus par des récepteurs comme les TLR (Akira and Takeda, 2004), les récepteurs intracellulaires comme RIG-I, GAS (Kato et al., 2006) ou l'inflammasome (Pedra et al., 2009). Ils peuvent aussi être médiés par différents facteurs comme l'ATP, l'ADN, HMGB1 ou les protéines de choc thermique dont le relargage dans le milieu extracellulaire est perçu comme un signal de danger (Gallo and Gallucci, 2013).

Le processus de maturation est caractérisé par la surexpression de récepteurs aux chimiokines (CCR7), de molécules d'adhésion, de molécules de costimulation (CD80, CD86), des molécules de CMH I et II, et des immunoprotéasomes. Les immunoprotéasomes sont des protéasomes modifiés permettant la dégradation des protéines en une plus grande quantité de peptides de différentes natures (Nandi et al., 2006). De même, la maturation s'accompagne de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ , l'IL2 et l'IL12. Toutes ces molécules permettent aux DCs d'une part de migrer jusqu'aux tissus lymphoïdes, d'autre part de correctement apprêter les antigènes, et activer la réponse adaptative.

En effet, les lymphocytes T CD4 et CD8, *via* leur TCR, vont reconnaître les peptides présentés respectivement sur les CMH de classe II et I ; parallèlement, les molécules de costimulation exprimées par les DCs fourniront aux LT le deuxième signal d'activation ; et les cytokines pro-inflammatoires leur fourniront le troisième signal d'activation (Sabado et al., 2017).

Les DCs, *via* leur sécrétion d'IL12 et d'IFN de type I, sont aussi capables d'activer les cellules NK (Fernandez et al., 1999), qui jouent un rôle majeur dans la réponse cytotoxique. De même, elles peuvent activer les cellules NKT grâce à l'expression de la molécule CD1c permettant la présentation d'antigènes glycolipidiques.

Cependant, quand les DCs ne subissent pas ce processus de maturation, elles peuvent induire une tolérance périphérique (Waisman et al., 2016; 2003). Les travaux de *Hawiger et al.* montrent que lorsqu'on cible les DC *via* un anticorps anti-DEC205 fusionné à un peptide antigénique, celles-ci présentent l'antigène mais ne montrent aucune surexpression ni du

CMH II ni de CD80. En réponse à cette présentation antigénique, les auteurs ont relevé une prolifération de lymphocytes T spécifiques, ne sécrétant pas d'IFN γ , et qui disparaissent en 7 jours. A contrario, lorsque l'anticorps de fusion est injecté conjointement à un agoniste de CD40, dans le but de faire maturer les DCs, la réponse T mesurée est persistante (Hawiger et al., 2001).

De même, un modèle Cre/Lox mis au point dans l'équipe de *M. Van Der Broek* et permettant l'expression et la présentation d'un antigène du cytomegalovirus (CMV) par près de 8% des DCs CD11c⁺ a pu montrer que la présentation antigénique par des DCs non matures induit une forte tolérance périphérique vis-à-vis du CMV. Cette tolérance se traduit par une absence de LT CD8 fonctionnels, et elle ne peut être rompue même après une infection ultérieure par le CMV, pourtant connu pour son immunogénicité (Probst et al., 2003).

Ces DCs ainsi « reprogrammées » qui présentent des peptides antigéniques sans subir de processus de maturation sont dénommées DCs tolérogènes et sont caractérisées par l'expression de plusieurs molécules de co-inhibition comme PDL-1 et PDL-2 (Davidson et al., 2013; Probst et al., 2005; Yogeve et al., 2012). Ces molécules, en remplaçant les molécules de co-stimulation CD80 et CD86, vont inhiber le récepteur CD28 des lymphocytes T et/ou vont activer leur récepteur inhibiteur PD1. Les DCs tolérogènes vont aussi sécréter des facteurs immunosuppresseurs comme l'IL-10, le TGF- β , l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), l'IL-27, l'arginase I, et le monoxyde d'azote (NO) (Li and Shi, 2015).

2.3.3 Récepteurs exprimés par les DCs

Le ciblage des cellules dendritiques, tel qu'envisagé dans mon projet de thèse, passe nécessairement par le ciblage de molécules exprimées à leurs surface, et en particulier des récepteurs associés aux DCs. Les récepteurs constitutivement exprimés par les DCs sont nombreux et variés. On trouve parmi eux la famille des TLR (Toll like récepteur), celle des lectines de type C (CLR), ainsi que les récepteurs de type NOD (NLR). Tous ces récepteurs sont spécialisés dans la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes.

Les lectines de type C, en particulier, sont des molécules glycosylées, reconnaissant des ligands carbohydrogénés, et cette reconnaissance est médiée par un mécanisme dépendant du calcium. Les CLR exprimées à la surface des DCs comprennent de nombreux récepteurs comme le récepteur au mannose (CD206), DC-SIGN (CD209, récepteur humain sans équivalent murin), la langérine (CD207), dectin-1 (CLEC7A), DGNR-1 (CLEC9A), dectin-2, DEC-205 (CD205), le récepteur *dendritic-cell-associated lectin-1* (DCAL-1), le récepteur *myeloid-DAP12-associating lectin* (MDL-1), le récepteur *macrophage C-type lectin* (MCL), le récepteur *Macrophage inducible Ca²⁺-dependent lectin* (MINCLE), SIGN-R1 (CD209b, récepteur murin sans équivalent humain) et le MGL (CD301) (Cummins and McEver, 2009). La plupart de ces lectines de type C possèdent de fortes capacités d'endocytose et certaines sont associées à des capacités d'induction de la maturation des cellules dendritiques.

Le récepteur au mannose, en particulier, possède d'importantes capacités d'endocytose et reconnaît une large variété de ligands carbohydrogénés regroupant les motifs bactériens et viraux mais aussi des ligands endogènes tels que des protéines de la matrice extracellulaire ou des hormones glycosylées (Linehan et al., 2001). Il est exprimé par les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules endothéliales non vasculaires (Martinez-Pomares, 2012). Chez l'Homme, l'expression du récepteur au mannose par les cellules dendritiques est souvent associée à l'état de maturation de ces dernières. Ainsi, on observe une surexpression du CD206 par les cellules dendritiques dans des conditions inflammatoires (Gazi and Martinez-Pomares, 2009; Martinez-Pomares, 2012; Wollenberg et al., 2002). Les pDCs, à l'inverse, ne montrent pas d'expression du récepteur au mannose (Meyer-Wentrup et al., 2008). Par ailleurs, ce récepteur est associé à une activité de cross-présentation et une capacité de polarisation Th1 qui le rendent particulièrement intéressant dans le cadre de la vaccination thérapeutique (Singh et al., 2011).

D'autres lectines comme MINCLE et CLEC9A peuvent reconnaître, via l'exposition de fibres d'actines, les cellules nécrotiques en général et les cellules tumorales en particulier (Ahrens et al., 2012; Sancho and Reis e Sousa, 2013; Zhang et al., 2012). CLEC9A, qui est particulièrement exprimé par les cDCs BDCA3⁺, est essentiel à la cross-présentation des

antigènes tumoraux ainsi endocytés, et à la mise en place d'une réponse Th1 dirigée contre ces antigènes (Sancho et al., 2008, 2009).

Enfin les lectines telle que DC-SIGN et la langérine sont plus spécifiquement associées à certaines sous-populations de cellules dendritiques comme les DCs du derme et les cellules de Langerhans, respectivement. DC-SIGN, qui reconnaît des ligands associés au mannose ou au fucose, est associée à de fortes capacités d'endocytose, ainsi qu'à une capacité de maturation des cellules dendritiques (Svajger et al., 2010). La langérine, quant à elle, permet l'endocytose de ligands mannosylés. Leur internalisation est associée à la formation de granules de Birbeck, qui sont tout à fait spécifiques de la langérine et des cellules de Langerhans (Chabrol et al., 2015; Valladeau et al., 2000). Ces structures sont des sous-domaines des compartiments d'endocytose et permettent la présentation des antigènes ainsi capturés par des voies non classiques de présentation (Mc Dermott et al., 2002). Si ces deux récepteurs sont capables de reconnaître des ligands de type sucrés, les mécanismes de cross-présentation associés à chacun de ces récepteurs sont différents. Ainsi, certains ligands qui vont être reconnus à la fois par DC-SIGN et par la langérine, ne seront adressés vers la cross-présentation que par l'un ou l'autre de ces récepteurs, en fonction de la longueur de leur glycosylation (Fehres et al., 2015).

Toutes ces propriétés font des lectines de type C des cibles de choix pour une stratégie vaccinale visant à favoriser la capture et la présentation antigénique ainsi que l'induction d'une réponse immune optimale.

2.3.4 Les DCs dans le contexte tumoral

Différentes études se sont intéressées à la quantité et la qualité des DCs infiltrant la tumeur. Plusieurs de ces études montrent en particulier la corrélation entre le nombre de DCs infiltrantes et un pronostic favorable chez les patients atteints de cancer du pancréas (Yamamoto et al., 2012) et de cancer ovarien (Zhang et al., 2015b). Dans le cancer

bronchique, la présence de DCs matures au sein de la tumeur est aussi associée à un meilleur pronostic (Remark et al., 2016).

Cependant, dans certains types de lymphomes, l'évolution défavorable de la maladie est associée à un plus grand nombre de DCs infiltrantes (Zhang et al., 2014). Dans ce contexte particulier, les cellules dendritiques sont caractérisées comme étant immatures, suggérant une altération phénotypique des DCs dans le contexte tumoral.

Parallèlement, des altérations fonctionnelles et quantitatives des DCs circulantes ont aussi été observées dans différents types de cancers. Par exemple, une diminution du nombre de DCs myéloïdes circulantes a pu être observée dans plusieurs cancers dont le cancer du sein (Della Bella et al., 2003), le cancer métastatique de la prostate (Sciarra et al., 2007), le carcinome hépatique (Ormandy et al., 2006), les cancers de la tête et du cou (Sakakura et al., 2006), la leucémie myéloïde chronique (Boissel et al., 2004), le myélome multiple (Ratta et al., 2002) et le cancer du pancréas (Yamamoto et al., 2012).

Au niveau fonctionnel, une plus faible sécrétion d'IL12 par les mDCs a été relevée dans le cancer du sein (Della Bella et al., 2003) et dans le carcinome hépatique (Ormandy et al., 2006), tandis qu'une plus faible expression du CMH II a été relevée dans les cancers de la tête et du cou (Sakakura et al., 2006), mais aussi dans le myélome multiple, associée à la diminution des marqueurs CD80 et CD40 (Ratta et al., 2002). Enfin, l'expression du récepteur inhibiteur CD85k a été relevée sur les mDCs de patients atteints de cancer colorectal (Orsini et al., 2014). Pour le mélanome, les données publiées sont assez contradictoires, avec des études montrant une diminution des DCs circulantes, en particulier des pDCs (Failli et al., 2013), une augmentation des mDCs (McCarter et al., 2007) ou bien une absence de différence avec les sujets sains (Charles et al., 2010). Ces études montrent cependant une variabilité des résultats en fonction du stade du mélanome, ce qui pourrait refléter l'évolution des populations de DCs au cours de l'histoire de la maladie.

Dans un modèle murin de cancer de l'ovaire, par exemple, l'évolution de la maladie est corrélée au changement phénotypique des DCs vers un profil de DCs tolérogène avec, en particulier, une diminution d'expression du CMH II, de CD40, et une surexpression de PDL-1

(Scarlett et al., 2012). De plus, la déplétion des DCs, qui accélère la progression de la maladie lorsqu'elle est réalisée à un stade précoce, entraîne à l'inverse un retard de croissance tumorale lorsqu'elle est réalisée à un stade avancé. Dans deux autres modèles murins, les DCs circulantes, mais aussi celles présentes au niveau du ganglion drainant la tumeur montrent une surexpression des molécules de co-inhibition PDL-1 et PDL-2 (Idoyaga et al., 2007; McDonnell et al., 2010).

Afin de comprendre cette polarisation des DCs vers un profil tolérogène, *Liu et al.* ont placé en coculture des cellules tumorales murines fraîchement isolées et des DCs saines. Ils ont montré que les cellules tumorales sont capables d'induire chez les DCs une diminution d'expression du CMH II, ainsi qu'une sécrétion d'IL-10, de NO, de VEGF, et d'arginase I. De plus, les DCs ainsi cultivées sont incapables d'induire une prolifération de lymphocytes T (*Liu et al.*, 2009).

Des résultats similaires sont obtenus avec des cellules humaines en culture (*Dumitriu et al.*, 2009). Ces données suggèrent que la tumeur est directement à l'origine de cette polarisation tolérogène des DCs d'autant plus que la tumeur secrète de nombreux facteurs solubles comme le VEGF (*Gabrilovich et al.*, 1996), l'IL6, le G-CSF (*Bharadwaj et al.*, 2007), le M-CSF (*Menetrier-Caux et al.*, 1998) le TGF- β (*Wang et al.*, 2013) et les gangliosides GD-3 et GM-3 (*Péguet-Navarro et al.*, 2003) qui inhibent la maturation des DCs, ainsi que la différenciation des monocytes et des précurseurs hématopoïétiques en DCs.

Cependant, les cellules tumorales peuvent aussi sécréter des facteurs permettant l'activation des DCs. Plus particulièrement, certaines chimiothérapies induisent la sécrétion d'ATP par la tumeur, via des mécanismes d'apoptose (*Martins et al.*, 2009), et cet ATP peut jouer un rôle activateur des DCs, via le récepteur P2Y2 (*Boyd-Tressler et al.*, 2014). De plus, et comme détaillé précédemment, certaines lectines de type C peuvent reconnaître les cellules tumorales nécrotiques (*Ahrens et al.*, 2012; *Sancho and Reis e Sousa*, 2013; *Zhang et al.*, 2012), facilitant ainsi la capture et la présentation des antigènes tumoraux. Les protéines de choc thermique, qui peuvent elles aussi être sécrétées par les cellules tumorales, sont

reconnues par les TLR 2 et 4 présents à la surface des DCs et peuvent orienter le système immunitaire vers une réponse pro-inflammatoire (Chalmin et al., 2010; Shi et al., 2016).

On voit ici que l'équilibre entre signaux activateurs et tolérogènes des DCs est particulièrement important dans le contexte tumoral, et qu'il est directement associé à la valeur pronostic des DCs. Comme toutes les cellules du microenvironnement tumoral, les DCs sont soumises aux facteurs solubles sécrétés par la tumeur, et la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs, favorisant l'orientation tolérogène des DCs, peut faire partie des mécanismes d'échappement mis en place par la tumeur. Il est donc essentiel de contourner ces mécanismes d'échappement pour restaurer l'état de maturation des DCs, car cet état est un préalable nécessaire à toute tentative de restauration de la réponse adaptative antitumorale. Dans les chapitres suivants, j'aborderais donc les différents mécanismes d'échappement mis en place par les cellules tumorales, avant d'aborder les stratégies d'immunothérapies qui ont pu être élaborées pour les contourner.

3. Mécanismes d'échappement tumoral

3.1 Diminution de l'expression des molécules de CMH par les cellules tumorales

L'absence partielle ou totale d'expression des molécules du CMH est un mécanisme fréquemment observé dans de nombreux types de cancers comme le mélanome ou le carcinome du côlon (Algarra et al., 1997). Différents mécanismes moléculaires peuvent être à l'origine de cette déficience, comme la dérégulation des composantes du protéasome telles que LMP-2 et LMP-7, des transporteurs peptidiques comme TAP1 et TAP2, ou bien même de la chaîne β 2-microglobuline du CMH (Atkins et al., 2004; So et al., 2005).

Cette absence d'expression conduit à une résistance aux mécanismes de cytotoxicité médiés par les lymphocytes T CD8, qui ont besoin du CMH I pour engager leur TCR. Cependant, la perte du CMH I conduit aussi à l'activation des cellules NK, par désengagement de leurs récepteurs inhibiteurs.

3.2 Résistance aux mécanismes cytotoxiques

Plusieurs mécanismes de résistance tumorale aux fonctions cytotoxiques des CTLs et des cellules NK, impliquant particulièrement la voie perforine/granzyme et celle des récepteurs apoptotiques, ont été décrits à ce jour.

L'interaction Fas/FasL par exemple se traduit par l'activation d'une cascade de caspases impliquant notamment la caspase 8. Certaines tumeurs expriment la protéine cFLIP, un inhibiteur de la caspase 8, les rendant ainsi résistantes à l'apoptose induite par Fas (Belharazem et al., 2015). Un autre mécanisme d'échappement consiste en la surexpression d'un inhibiteur de serine protéase PI-9, qui conduit au blocage de la voie perforine/granzyme (Medema et al., 2001). De plus, l'expression par la tumeur de protéines régulatrices du complément (CRPs), comme le CD46 (MCP), le CD55 (DAF), le CD35 (CR1) ou le CD59, lui confère une résistance aux mécanismes d'ADCC. L'expression de ces CRPs par les cellules tumorales est hautement variable, en fonction du type de cancer et de son origine histologique (Fishelson et al., 2003). Enfin, les cellules tumorales peuvent sécréter des ligands solubles du récepteur NKG2D, limitant ainsi l'activité cytotoxique des cellules NK (Morvan and Lanier, 2016).

3.3 Immunosuppression

D'autres mécanismes d'échappement passent par une suppression active de la réponse immunitaire.

3.3.1 Synthèse d'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO)

L'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO) est produite par les cellules tumorales, dans de nombreux cancers comme les carcinomes hépatiques, les mélanomes, les cancers du col de l'utérus ou du poumon (Schalper et al., 2016; Uyttenhove et al., 2003). Le mécanisme d'action de cette enzyme repose sur une réduction locale de la concentration en tryptophane, due à sa conversion en kynurénine, et à la production de métabolites de tryptophane pro-apoptotiques (Grohmann et al., 2003). Elle inhibe la prolifération et favorise l'apoptose des

lymphocytes T (Uyttenhove et al., 2003), elle limite l'activité cytotoxique des cellules NK (Morvan and Lanier, 2016) et altère la fonctionnalité des DCs, en limitant leur maturation (Hwang et al., 2005).

3.3.2 Dérégulation des « immune checkpoints »

Les *immune checkpoints* sont des récepteurs inhibiteurs naturellement exprimés à la surface des lymphocytes T. Ils jouent un rôle essentiel dans la régulation de la réponse immune et dans le maintien de la tolérance. Les *immune checkpoints* principalement étudiés sont les récepteurs CTLA-4 et PD-1. Le récepteur CTLA-4 est exprimé par les lymphocytes T, rapidement après leur activation. Il entre en compétition avec le récepteur activateur CD28 pour se lier aux molécules de costimulation CD80 et CD86, et transmet un signal inhibiteur au lymphocyte T. Sa fonction biologique est d'éviter un emballement de la réponse T effectrice. Il est aussi exprimé constitutivement par les lymphocytes T régulateurs, et stimule leur fonction immunorégulatrice (McCoy and Le Gros, 1999). De la même manière, PD-1 est exprimé par les lymphocytes T effecteurs rapidement après leur activation, ainsi que par les lymphocytes T régulateurs. Il reconnaît le ligand PDL-1 exprimé par les cellules présentatrices d'antigène et transmet un signal inhibiteur au lymphocyte (Pardoll, 2012). Le récepteur Tim-3 est lui aussi exprimé par les lymphocytes T. Il est associé à une fonction immunorégulatrice et son ligand est la galectin-9 (Anderson, 2014). Enfin, le récepteur inhibiteur TIGIT, nouvellement décrit, est exprimé à la surface des lymphocytes T activés, des Tregs et des cellules NK (Liu et al., 2016).

Il a été montré que de nombreuses tumeurs expriment à leur surface le ligand PDL-1, dérégulant ainsi le mécanisme de maintien de la tolérance périphérique, et permettant l'échappement des cellules tumorales face au système immunitaire (Pardoll, 2012). La surexpression de PDL-1 par les cellules tumorales est associée à un microenvironnement plutôt immunosuppresseur et à un pronostic plus sombre dans différents cancers comme celui du pancréas (Birnbau et al., 2016), de l'estomac (Tamura et al., 2015) ou dans le carcinome rénal (Thompson et al., 2004).

Parallèlement, la surexpression des récepteurs PD-1 et CTLA-4 par les lymphocytes du microenvironnement tumoral est aussi associée à un pronostic plus sombre dans de nombreux cancers (Deng et al., 2015; Fourcade et al., 2014; Gao et al., 2012; Kim et al., 2013; Zhang et al., 2016; Liu et al., 2016). Des anticorps ciblant ces « immune checkpoints » représentent une évolution majeure dans le traitement des patients atteints de cancer, avec une grande efficacité clinique que je détaillerais dans la deuxième partie de mon introduction.

Enfin, il semblerait que les tumeurs expriment la molécule FasL à leur surface, ce qui induit la mort par apoptose des LT spécifiques de la tumeur exprimant le récepteur Fas lors de leur interaction avec les cellules tumorales (Igney and Krammer, 2005).

3.3.3 Sécrétion de cytokines immunosuppressives

La composition cytokinique du microenvironnement tumoral joue un rôle essentiel dans l'échappement tumoral. En effet, les cellules malignes produisent de nombreuses cytokines et chimiokines comme l'IL6, l'IL10, l'IL13, le VEGF et le TGF- β . Ces molécules vont instaurer un contexte immunosuppresseur au sein du microenvironnement tumoral.

Plus particulièrement, la maturation et la fonctionnalité des cellules dendritiques vont être altérées, notamment en orientant les DCs vers un profil tolérogène, avec une perte d'expression des récepteurs de co-stimulation CD80 et CD86, comme indiqué précédemment dans le chapitre dédié aux cellules dendritiques.

Toutes ces cytokines immunosuppressives peuvent aussi inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes T effecteurs (Della Porta et al., 2005; Ghiringhelli et al., 2005; Ohm et al., 2003; Zitvogel et al., 2006). Le TGF- β , par exemple, est reconnu par les lymphocytes T effecteurs via leur récepteur TGF β RII et induit une régulation des gènes médiant la fonction cytotoxique des T CD8, dont le granzyme A, le granzyme B, l'IFN γ et Fas ligand (Thomas and Massagué, 2005). Il inhibe aussi la voie MAP-K, associée à la signalisation du TCR (di Bari et al., 2009).

Les cytokines telles que l'IL10 et le TGF- β jouent aussi un rôle dans la polarisation de la réponse T CD4 vers un profil Th2 au détriment du profil Th1 (Maeda and Shiraishi, 1996). La polarisation Th2 a été associée à des potentiels métastatiques plus importants et des pronostics plus sombres dans différents types de cancer comme le cancer du sein ou les cancers ORL (Gaur et al., 2014; Zhang et al., 2015a).

Les cellules NK peuvent elles aussi être affectées par ce microenvironnement cytokinique et en particulier par le TGF- β qui induit une diminution d'expression de leurs récepteurs activateurs NKp30 et NKG2D (Castriconi et al., 2003; Lee et al., 2004; Morvan and Lanier, 2016).

En plus d'inhiber directement les fonctions et/ou le recrutement des cellules immunitaires présentes au sein du microenvironnement tumoral, les cytokines immunorégulatrices sécrétées par la tumeur conduisent au recrutement de plusieurs autres populations régulatrices comme les Tregs, les TAMs ou les MDSCs, dont les effets pro-tumoraux ont déjà été évoqués. Le CSF-1 par exemple, qui est exprimé dans plus de 70% des cancers du sein, induit le recrutement des TAMs, et est associé à un mauvais pronostic (Lin et al., 2002). De même, le VEGF induit le recrutement de TAMs (De Palma, 2012).

3.3.4 Recrutement de cellules immunorégulatrices

3.3.4.1 Tregs

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs), caractérisés par l'expression du facteur de transcription Foxp3, sont spécialisés dans le contrôle de la réponse immunitaire. Ils agissent sur les cellules effectrices en exprimant des molécules inhibitrices comme le récepteur CTLA4 et la Galectin-1, ainsi qu'en sécrétant diverses cytokines immunorégulatrices comme l'IL10 et le TGF β , et en consommant préférentiellement l'IL2 (Shevach, 2009).

Il est assez difficile d'associer l'infiltration de Tregs dans la tumeur à une valeur pronostique, car les études traitant de ce sujet sont contradictoires et dépendent du type de cancer (Fridman et al., 2012). Par exemple, les Tregs sont associés à un mauvais pronostic dans le cancer de l'ovaire (Curiel et al., 2004), le cancer du sein (Gobert et al., 2009) et le

cancer hépatique (Gao et al., 2007a) ; mais associés à un meilleur pronostic dans d'autres études portant sur le cancer de l'ovaire (Leffers et al., 2009), le cancer de la vessie (Winerdal et al., 2011), les cancers oropharyngés (Lukesova et al., 2014) et le cancer colorectal (Tosolini et al., 2011).

Ces résultats contradictoires sont étonnants mais plusieurs pistes peuvent être proposées pour les expliquer : tout d'abord, il est important de noter que l'identification des Tregs peut parfois être rendue difficile par la présence de lymphocytes T activés, exprimant transitoirement le marqueur Foxp3. Ensuite, il est important de rappeler que l'inflammation chronique peut exercer une activité pro-tumorale. Dans ce cas, des Tregs pourraient, en diminuant cette inflammation, exercer un rôle anti-tumoral, aussi paradoxal que cela puisse paraître. Cette hypothèse expliquerait que les Tregs soient plutôt de bon pronostic dans les cancers muqueux, où l'inflammation est souvent très importante (Tanchot et al., 2013)

Une étude réalisée dans un modèle murin de cancer du poumon rapporte que les structures lymphoïdes tertiaires (TLS) jouent un rôle important dans l'immunosuppression induite par les Tregs (Joshi et al., 2015). Les TLS sont des structures lymphoïdes présentant de fortes analogies structurales avec les organes lymphoïdes secondaires. Elles se forment à proximité de la tumeur, et dans le cancer du poumon, il a été montré que la densité des TLS était associée à une signature immunitaire intratumorale caractérisée par une infiltration massive de LT CD8⁺ et une expression coordonnée des gènes de l'immunité à médiation cellulaire. De plus, la forte infiltration de LT CD8⁺ dans les tumeurs bronchiques semble être corrélée à un pronostic de survie favorable, ceci uniquement lorsqu'elle est associée à la présence de TLS (Goc et al., 2014).

Cependant *Joshi et al.* ont montré dans leur modèle murin que les Tregs jouent un rôle inhibiteur sur la réponse cytotoxique mis en place au niveau des TLS, en limitant la présentation par les DCs et la prolifération des lymphocytes T CD8. Ainsi, cibler les Tregs au sein des TLS pour en inhiber les mécanismes immunosuppresseurs, pourrait être un moyen d'orienter la réponse immune vers une réponse cytotoxique.

3.3.4.2 Macrophages

Dans le contexte tumoral, les macrophages (*tumor infiltrating macrophages* ou TAMs) ont un profil fortement immunosuppresseur. Ils sécrètent de nombreuses cytokines comme l'IL10 et le TGF- β et des chimiokines comme CCL2, CCL5, CCL22 et CCL20 (Guo et al., 2016), ayant pour conséquence d'induire et de recruter des Tregs. Par ailleurs, CCL2 induit le recrutement de monocytes inflammatoires qui, en relarguant du VEGF, vont promouvoir les métastases tel qu'observé dans le cancer du sein (Qian et al., 2011). Parallèlement, les TAMs facilitent la survie des cellules tumorales lors de leur migration vers les poumons (Chen et al., 2011). Enfin, ils participent à la mise en place de la transition épithélio-mésenchymateuse, favorisant ainsi les métastases comme observé dans le carcinome hépatique (Gupta et al., 2014) et dans le cancer du pancréas (Liu et al., 2013). Les TAMs jouent aussi un rôle pro-lymphangiogénique pro-angiogénique, en particulier par l'expression de VEGF, ce qui constitue un facteur de risque supplémentaire pour l'apparition de métastases (Guo et al., 2016).

Il a d'ailleurs été montré que l'infiltration de la tumeur par les TAMs est associée à un moins bon pronostic et/ou à un risque accru de métastases dans de nombreux cancers comme le cancer du sein (Gwak et al., 2015), de la prostate (Hu et al., 2015), de la vessie (Takayama et al., 2009), du poumon à petites cellules (Li et al., 2015) et de la cavité orale (Wang et al., 2014).

Enfin, leur présence est aussi corrélée à une plus faible réponse aux traitements classiques que sont la chimiothérapie et la radiothérapie (Guo et al., 2016).

3.3.4.3 Cellules myéloïdes suppressives (MDSCs)

Les MDSCs sont des cellules myéloïdes immatures de diverses natures, essentiellement des granulocytes, monocytes et cellules dendritiques immatures, exerçant une activité immunosuppressive. Elles sont caractérisées, chez l'Homme, par l'expression

conjointe de CD11b, CD15 et CD33, ainsi que par une absence d'expression du CMHII, et une activation du facteur de transcription STAT3 (Hargadon, 2013).

Leur activité immunosuppressive est principalement médiée par deux enzymes : l'oxyde nitrique synthase et l'arginase, qui sont connues pour altérer la fonctionnalité des lymphocytes T. Plus précisément, l'action combinée de ces deux enzymes inhibe la traduction de la chaîne ξ du CD3, la synthèse d'IL2 et favorise l'apoptose des lymphocytes T. De plus, les MDSCs sécrètent diverses cytokines immunosuppressives qui participent au recrutement des Tregs (Bronte and Zanovello, 2005).

Différentes études ont montré que la présence de MDSCs au sein du microenvironnement tumoral, des ganglions drainants la tumeur, ou même dans le sang périphérique, était associé à un mauvais pronostic (Diaz-Montero et al., 2009; Vasquez-Dunddel et al., 2013).

Troisième partie : Immunothérapies antitumorales

Les immunothérapies antitumorales ont pour but d'éliminer activement les cellules tumorales via les mécanismes immunitaires décrits dans le chapitre précédent. Plus précisément, les immunothérapies peuvent agir de deux manières : elles peuvent, d'une part, activer ou restaurer les mécanismes effecteurs anti-tumoraux comme l'immunité à médiation cellulaire ; et, d'autre part, contrer les signaux inhibiteurs permettant l'échappement tumoral.

Les immunothérapies ne sont pas exclusives entre elles et peuvent agir en synergie. De nombreux essais cliniques combinant différentes immunothérapies sont actuellement en cours et l'étude de ces combinaisons est d'ailleurs un champ de recherche particulièrement dynamique (Kunii et al., 2009).

1. Immunothérapies non spécifiques

1.1 Cytokines

L'injection de cytokines est une immunothérapie passive non spécifique dont le but est de stimuler la réponse préexistante, et de favoriser la mise en place d'une éventuelle réponse spécifique.

Les thérapies par injection d'IL2 ont été mises au point dès les années 1990, où elles ont montré des capacités à activer les réponses Th1 et NK, ainsi que la sécrétion d'IL12 (Nishimura et al., 1986). Des résultats cliniques modestes ont été montrés dans le mélanome et le carcinome rénal (Alva et al., 2016; Gill et al., 2016), et l'IL2 est aujourd'hui indiquée dans la prise en charge de l'adénocarcinome rénal métastatique. La principale critique de l'immunothérapie par IL2 est le risque de favoriser la prolifération des Tregs (Saadoun et al., 2011), ainsi que la toxicité cardiovasculaire induite (Lissoni, 2016). En effet, si l'IL2 est, à forte dose, un facteur de croissance essentiel à l'activation T, elle exerce une fonction immunorégulatrice en activant préférentiellement les Tregs lorsqu'elle est présente à faible dose (Waldmann, 2015).

Le TNF α est quant à lui indiqué dans le sarcome des tissus mous de membres, où il exerce une activité anti-angiogénique en induisant l’apoptose des cellules endothéliales associées à la tumeur (Rüegg et al., 1998). De plus, il augmente la perméabilité de la vascularisation tumorale, permettant l’accumulation au sein de la tumeur des molécules thérapeutiques telles que la chimiothérapie (Folli et al., 1993; van der Veen et al., 2000).

Enfin, l’IFN α est indiqué dans différents cancers dont les leucémies, lymphomes folliculaires et myélome multiple, où il est principalement utilisé comme traitement adjuvant. Son efficacité reste cependant assez modeste (Lee and Margolin, 2011).

Cytokine	Nom commercial	Indication
IL2	PROLEUKIN	adénocarcinome rénal métastatique
TNF α	BEROMUN	sarcome tissus mous des membres
IFN α 2b	INTRONA	leucémie à tricholeucocytes; leucémie myéloïde chronique; myélome multiple; lymphomes folliculaires; tumeurs carcinoïdes; mélanome malin
IFN α 2a	ROFERON	leucémie à tricholeucocytes; leucémie myéloïde chronique; lymphome cutané T; lymphomes folliculaires non-hodgkinien; cancer du rein; mélanome malin stade II

Tableau. 2 : Autorisations de mise sur le marché (AMM) accordées pour des traitements cytokiniques. 3 cytokines font l’objet de traitement approuvés, il s’agit de l’IL2, du TNF α et de l’IFN α .

D’autres cytokines, comme l’IFN γ , le GM-CSF, le FLT-3 ligand et l’IL12 sont des outils thérapeutiques potentiels, de par leur nature immunoactivatrice. Le FLT-3 ligand a montré une efficacité thérapeutique (Lynch et al., 1997) dans un modèle préclinique, et l’IL12 a été testée dans les carcinomes de la tête et du cou, où elle a permis d’orienter la réponse immune locale vers un profil Th1 (van Herpen et al., 2004).

1.2 Agonistes de TLR & Adjuvants

Basés sur la même démarche d'immuno-stimulation non spécifique que les cytokines, les agonistes de TLR sont une immunothérapie active, qui induit une reconnaissance de signaux de dangers par les cellules de l'immunité innée, et peut aider à réorienter le système immunitaire vers une élimination des cellules tumorales.

Différentes stratégies d'immunothérapies utilisent des agonistes de TLR seuls ou combinés avec d'autres approches thérapeutiques (Vacchelli et al., 2013).

Le CpG oligodésoxynucléotide (CpG-ODN), par exemple, est un agoniste du TLR 9 qui a montré une efficacité clinique dans le glioblastome (Carpentier et al., 2010). L'imiquimod, un agoniste du TLR 7, montre une efficacité clinique dans les carcinomes basocellulaires superficiels de l'adulte (Bath-Hextall et al., 2014) et permet de réduire le risque de métastases cutanées dans le cancer du sein (Adams et al., 2012). D'autres travaux ont montré que le GLA-SE, un agoniste du TLR4, limitait le risque de métastases chez la souris et le rat (Matzner et al., 2016).

L'efficacité de ces stratégies d'immunostimulation non spécifique reste relativement modeste. Cela peut s'expliquer par le fait que le microenvironnement des cancers de stade avancés est souvent fortement orienté vers l'immunosuppression, et qu'une application d'adjuvant ou l'injection d'une cytokine immunoactivatrice n'est pas suffisante pour inverser cette polarisation.

De plus, il a récemment été montré que les cellules tumorales exprimaient elles aussi certains TLR. En particulier, les TLR2, 4 et 9 sont exprimées dans le cancer du pancréas, et leur activation est associée à plus forte prolifération tumorale, ainsi qu'une activation de la signalisation VEGF (Grimmig et al., 2016).

1.3 Anticorps monoclonaux

1.3.1 Principes de conception des anticorps monoclonaux

Ces anticorps, comme toutes les immunoglobulines, sont constitués d'une partie variable (V) et d'une partie constante (C). Les séquences d'acides aminés responsables de la reconnaissance de l'antigène sont les séquences hautement variables CDR, comprises dans la partie variable (V), comme indiqué sur le schéma (figure 8).

Les toutes premières tentatives d'injection de anticorps murins dirigés contre un antigène humain se sont vite confrontées à la neutralisation de ces anticorps par le système immunitaire du patient, due à la reconnaissance des motifs murins. Pour surmonter cet écueil, les anticorps chimériques ont été mis au point, comprenant une région constante humaine avec une région variable murine. Avec cette technique, la fréquence d'induction d'une réponse anti-anticorps était considérablement diminuée.

Pour diminuer encore l'immunogénicité des anticorps chimériques, les anticorps humanisés ont été développés. Dans les anticorps humanisés, toutes les séquences d'acides aminés provenant de la souris sont remplacées par des séquences humaines, à l'exception des CDR responsables de la formation de l'antigène. Aujourd'hui, l'utilisation de souris transgéniques a permis l'élaboration d'anticorps entièrement humains, empêchant ainsi tout risque de réponse contre l'anticorps lui-même (Figure 8).

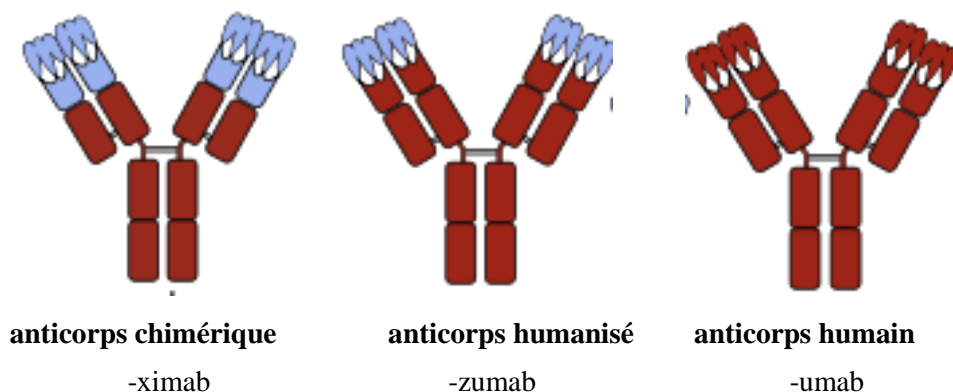


Figure 8 : Structure des différentes immunoglobulines de synthèses. Les anticorps monoclonaux peuvent être chimériques (-ximab), humanisés (-zumab) ou humains (-umab) selon l'origine de leurs différentes chaînes. Les chaînes murines sont représentées ici en bleu, et les chaînes humaines en rouge.

Les anticorps monoclonaux peuvent être utilisés de deux manières : ils peuvent directement cibler les cellules néoplasiques et induire des mécanismes cytotoxiques, ou bien inhiber les mécanismes d'échappement mis en place par la tumeur et jouer un rôle immunomodulateur.

1.3.2 Anticorps monoclonaux ciblant des cellules tumorales

Historiquement, ce sont d'abord les anticorps ciblant les cellules tumorales qui ont été mis au point. Ces anticorps sont spécifiques d'un antigène tumoral donné, et possèdent des mécanismes d'actions variés, dépendant de l'antigène ciblé. De manière générale, le but est de bloquer un récepteur naturellement exprimé par la tumeur afin de limiter le métabolisme des cellules tumorales, et donc leur croissance. Dans certains cas, ils peuvent aussi induire des mécanismes de lyse des cellules tumorales, par ADCC.

Le rituximab, premier anticorps mis sur le marché aux USA, est une IgG1 ciblant le CD20, qui est un marqueur spécifique des lymphocytes B. Son mécanisme d'action repose sur la lyse des lymphocytes B malins par ADCC, *via* le complément ou par induction d'apoptose. Il est indiqué pour les lymphomes et leucémies B où il montre de très bons résultats thérapeutiques (Prica et al.).

De la même manière, le trastuzumab permet la reconnaissance de récepteur Her-2. Her-2 est surexprimé dans près de 15% des cancers du sein, et son action est bloquée par la fixation de l'anticorps, inhibant ainsi le métabolisme des cellules tumorales. Il est indiqué dans le cancer du sein Her-2 positif où il montre de très bons résultats thérapeutiques (Yeo et al., 2015).

D'autres anticorps ont suivi comme ceux dirigés contre le récepteur à l'EGF (cetuximab, panitumumab), dont l'expression par la tumeur lui permet d'augmenter ses capacités de prolifération. La voie de signalisation associée au récepteur est ainsi perturbée et la croissance de la tumeur est inhibée. Ces anticorps sont indiqués dans certains cancers colorectaux où l'EGF est largement surexprimé (Seymour et al., 2013; Spano, 2005), ainsi que des carcinomes de la tête et du cou.

Enfin, l'anticorps anti-VEGF (bevacizumab) permet de neutraliser le VEGF, facteur clé de la vasculogénèse et de l'angiogénèse. Ces mécanismes étant essentiels au développement des tumeurs, leur inhibition permet donc de très bons résultats thérapeutiques. Il est indiqué dans différents cancers comme les cancers colorectaux et bronchiques.

1.3.3 Anticorps monoclonaux immunomodulateurs ou « inhibiteurs de checkpoints »

Dans un second temps, les anticorps immunomodulateurs ont été mis au point. Leur but est de cibler les points de contrôle immunitaires qui sont, comme décrit précédemment, dérégulés au sein du microenvironnement tumoral ; ils possèdent différents mécanismes d'action selon leur molécule cible et leur isotype. De manière générale, leur rôle est de bloquer les récepteurs inhibiteurs des lymphocytes ou leurs ligands. Leur développement constitue une véritable révolution dans la prise en charge des patients atteints de cancer.

L'anticorps anti-CTLA-4 (ipilimumab) est le premier inhibiteur de checkpoint ayant montré une efficacité clinique dans le mélanome (Hodi et al., 2010). Il permet l'inactivation du récepteur inhibiteur CTLA-4 présent à la surface des LT effecteurs. Son efficacité clinique est malheureusement associée à des effets secondaires de type auto-immun assez importants, probablement dus à l'expression ubiquitaire de CTLA-4 (Yang et al., 2007).

Les anticorps ciblant l'axe PD-1/PD-L1 montrent eux aussi d'excellents résultats thérapeutiques dans différents types de cancer.

En particulier, des anticorps anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) et anti-PD-L1 (atezolizumab, durvalumab) sont aujourd'hui indiqués pour la prise en charge en situation métastatique des mélanomes (Robert et al., 2015), des cancers bronchiques (Borghaei et al., 2015), de carcinomes à cellules rénales et de certains lymphomes (Ansell et al., 2015).

D'autres cibles thérapeutiques sont étudiées à l'heure actuelle comme le récepteur activateur OX40 pour lequel l'utilisation d'un anticorps agoniste en essai de phase I montre une efficacité clinique dans plusieurs cancers solides métastatiques (Curti et al., 2013) ; le

récepteur au TNF CD137 pour lequel l'utilisation d'un anticorps agoniste (urelumab) est en cours d'évaluation clinique (Segal et al., 2016) ; ou le récepteur inhibiteur des cellules NK (KIR) pour lequel un anticorps antagoniste (lirilumab) montre une efficacité préclinique dans un modèle de lymphome murin (Kohrt et al., 2014). Très récemment, le lirilumab a montré une efficacité clinique de près de 25% dans les carcinomes de la tête et du cou dans le cadre d'un essai de phase I/II où il était associé au nivolumab (SITC Communication, 2016).

1.4 Thérapies cellulaires

Si les *inhibiteurs de checkpoints* permettent de moduler la réponse immune préexistante en contrant l'immunosuppression du contexte tumoral, ils ne permettent pour autant pas la mise en place d'une réponse spécifique contre la tumeur.

Le principe des thérapies par transfert adoptif autologue est justement, de cultiver *ex vivo* les lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) du patient afin de les amplifier et de stimuler leur activité antitumorale, avant de les réinjecter au patient. Le but de cette stratégie thérapeutique est donc d'exploiter la spécificité naturelle des TILs, tout en potentialisant leur efficacité. Les approches classiques d'amplification et d'activation des lymphocytes sont basées sur une culture dans un milieu enrichi en IL2, et ont montré une bonne efficacité dans le mélanome métastatique (Besser et al., 2013; Rosenberg et al., 2011) et le carcinome rénal métastatique (Figlin et al., 1997).

Les cellules NK ont elles aussi fait l'objet de thérapies cellulaires, avec la réinjection de cellules NK autologues, qui n'ont cependant pas montré d'efficacité dans le cadre d'essais de phase I menés dans le cancer colorectal, le mélanome métastatique ou le carcinome rénal. Dans ce contexte, les cellules NK réinjectées présentaient un profil peu activé, avec un faible niveau d'expression de NKG2D (Krause et al., 2004; Parkhurst et al., 2011), ce qui peut expliquer l'absence d'efficacité clinique. D'autres équipes ont donc cherché à injecter des NK allogéniques haploidentiques, associées à des chimiothérapies lymphodéplétives. Même si la sécurité de cette stratégie a été validée dans le cadre de plusieurs essais de phase I/II (Geller et

al., 2011; Iliopoulou et al., 2010) les patients ainsi traités montrent un degré de chimérisme NK, malgré la lymphodéplétion, et l'efficacité thérapeutique n'est pas clairement démontrée.

1.5 CAR-T-cells

Afin d'améliorer l'efficacité des thérapies cellulaires basées sur les TILs, une nouvelle approche a été mise au point, basée sur des modifications génétiques permettant l'expression par les lymphocytes de récepteurs antigéniques chimériques (CARs). Ces récepteurs sont constitués pour leur domaine extracellulaire d'un anticorps dirigé contre un antigène tumoral, couplé à la chaîne ζ du domaine intracellulaire du TCR, qui en s'associant à la protéine ZAP70, permet l'induction d'un signal activateur.

Cette approche a montré une très bonne efficacité clinique dans le lymphome non hodgkinien, la leucémie lymphoïde chronique et la leucémie lymphoblastique aigüe, où elle représente une avancée thérapeutique majeure (Kochenderfer et al., 2015).

Dans les tumeurs solides cependant, ils sont souvent associés à une cardiotoxicité résultante d'une cross-réactivité auto-immune des TCR modifiés (Linette et al., 2013), du au fait que les antigènes cibles sont moins spécifiques que ceux associés aux cancers hématologiques. Récemment cependant, une étude de cas a montré une réponse complète chez un patient atteint de glioblastome et traité avec des CAR-T-cells dirigés contre le récepteur à l'IL13, sans cardiotoxicité majeure.

Pour améliorer la stratégie des CAR-T-cells dans les tumeurs solides, *Roybal et al.* ont mis au point des lymphocytes transgéniques exprimant deux CARs différents, chacun spécifique d'un antigène donné. Les lymphocytes T ainsi modifiés ne peuvent s'activer de manière complète que face à une cellule cible présentant les deux antigènes à sa surface. Ce système permet une très bonne discrimination des cellules tumorales et induit, dans le modèle murin, une excellente efficacité thérapeutique (Roybal et al., 2016).

Malheureusement, toutes ces stratégies de transfert adoptif restent lourdes à mettre en place, en particulier à cause des étapes de culture cellulaire. En effet, les cellules de chaque patient doivent être isolées, cultivées, amplifiées voire modifiées génétiquement avant d'être prêtes à être réinjectées au patient. Ces différentes étapes, en plus d'être coûteuses, représentent des délais assez longs, affectant directement la prise en charge des patients.

2. Vaccination thérapeutique

Un autre moyen de stimuler la réponse immune spécifique des antigènes tumoraux, repose sur la vaccination thérapeutique. La vaccination thérapeutique a en effet pour but d'induire *in vivo* une réponse cytotoxique spécifiquement dirigée contre la tumeur, et ne présente pas les contraintes techniques de production cellulaire préalablement abordées. De plus, les préparations vaccinales présentent généralement de bonnes facilités de synthèse et de stockage, ce qui permet de s'adapter à une prise en charge rapide des patients. Ainsi, la vaccination thérapeutique représente une voie particulièrement intéressante pour la mise en place d'immunothérapies immuno-activatrices, utilisables à grande échelle. C'est cette voie que je vais développer à présent.

2.1 Choix de l'antigène

Comme je l'ai abordé précédemment, les antigènes tumoraux peuvent être classés en deux grandes catégories : les antigènes associés aux tumeurs (TAA), qui sont des protéines du soi, et les antigènes spécifiques des tumeurs (TSA) qui sont, pour leur part, absents des cellules non malignes.

Les lymphocytes T spécifiques des TAA étant spécifiques du *soi*, ils ont théoriquement un TCR de faible affinité, car les TCR de forte affinité sont éliminés au cours de la sélection thymique négative. Pour ces raisons, il semble difficile de cibler les TAA dans le cadre d'immunothérapies car, en plus de présenter un risque de toxicité auto-immune important, la valeur thérapeutique des lymphocytes T possédant un TCR de faible affinité est incertaine (Blankenstein et al., 2012).

Les TSA, par contre, présentent une très bonne spécificité tumorale, un potentiel immunogène beaucoup plus élevé et un risque de toxicité auto-immune beaucoup plus faible que les antigènes précédemment décrits. Leur utilisation dans le cadre d'immunothérapies semble donc plus appropriée.

Parmi les nombreux TAA déjà identifiés et décrits dans un chapitre précédant, il est important de remarquer que les antigènes de différenciation et les protéines surexprimées sont mal adaptés à une stratégie vaccinale, car ils sont souvent peu immunogènes et associés à un risque élevé de toxicité auto-immune de par cette faible spécificité.

Parmi les TSA, les néoantigènes sont cibles pertinentes car, en plus d'être hautement spécifiques, ils sont souvent issus de protéines essentielles au métabolisme des tumeurs, et donc moins concernées par les mécanismes d'échappement tumoral par perte d'expression (*loss variants antigens*) (So et al., 2005). Plus spécifiquement, les néoantigènes issus du séquençage comparatif, et caractérisés pour chaque patient, possèdent un haut degré de spécificité (Wang and Wang, 2017). De plus, leur expression par la tumeur et leur immunogénicité est validée au moment de la caractérisation (Cohen et al., 2015a), ce qui fait aussi d'eux d'excellents antigènes candidats. Deux essais cliniques de phase I sont en cours, afin de tester une vaccination personnalisée chez des patientes atteints de cancer du sein triple négatif. Après le diagnostic, une biopsie est réalisée afin de caractériser les néoantigènes de chaque patiente, puis la patiente est orientée vers les thérapies conventionnelles (chimiothérapie et chirurgie). Pendant les semaines de traitement, le vaccin personnalisé est élaboré soit sous forme d'ADN (NCT02348320), soit sous forme d'un long peptide (NCT02427581) (Zhang et al.). A l'issue du traitement conventionnel, le vaccin est administré aux patientes, dans le but de limiter les rechutes qui sont très fréquentes pour ce cancer. Ce type de stratégie est très prometteur mais représente un coût extrêmement important car le vaccin doit être mis au point pour chaque patient, et n'est donc pas envisageable à une très large échelle. Etant donné le délai de mise au point, cette stratégie ne peut pas être proposée en première ligne, mais peut par contre parfaitement s'associer aux thérapies conventionnelles, comme immunothérapie d'entretien.

Les antigènes viraux sont eux aussi très spécifiques de la tumeur, et, même si leur fonction n'est pas toujours nécessaire au métabolisme des tumeurs, on retrouve leur expression chez de nombreux patients atteints de cancers, ce qui permet d'élaborer des formules vaccinales administrables à une plus large population. Les onco-protéines E6 et E7 d'HPV16, par exemple, sont exprimées par tous les cancers induits par l'HPV16. De plus, leur immunogénicité a été validée dans plusieurs essais de vaccination peptidique (Vici et al., 2016). Le virus HPV est responsable de près d'un tiers des cancers viro-induits, en particulier les cancers du col de l'utérus et les cancers ORL viro-induits. Son rôle dans la carcinogénèse est médié par les onco-protéines E6 et E7 qui agissent sur les dégradations respectives du facteur de transcription p53 et de la protéine suppressive de tumeur pRb (Chung and Gillison, 2009).

2.2 Vaccination cellulaire

Comme je l'ai déjà développé dans le chapitre dédié, les DCs représentent la population centrale dans la mise en place de la réponse immune, et sont donc des cibles particulièrement intéressantes dans le cadre des stratégies de vaccination thérapeutique. Permettre la présentation par ces dernières de l'antigène d'intérêt, c'est s'assurer de la mise en place d'une réponse immune optimale faisant intervenir à la fois les lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques de l'antigène cible.

C'est pour s'appuyer sur ces propriétés des DCs que plusieurs stratégies ont consisté à réaliser des transferts adoptifs de DCs préalablement chargées avec un ou des antigènes tumoraux.

Ces thérapies cellulaires, ou vaccins cellulaires, reposent sur la culture *ex vivo* de précurseurs de DCs, directement isolés à partir du sang du patient, puis cultivés de manière à obtenir des DCs fonctionnelles. Ces DCs sont ensuite induites à la maturation et chargées avec des peptides antigéniques, avant d'être réinjectées au patient. Les DCs obtenues *ex vivo* peuvent être générées à partir de deux populations cellulaires cultivées avec différentes cytokines et facteurs de croissance : les monocytes CD14⁺ (Nair et al., 2012) ; ou les cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ (Ratta et al., 1998).

Chez des sujets sains, une seule injection de DCs chargées suffit pour induire une rapide prolifération de lymphocytes T spécifiques (Dhodapkar et al., 2014), là où l'injection d'un peptide seul ne permet pas ce genre de réponse. Dans le contexte clinique, la stratégie de vaccination par cellules dendritiques dérivées de monocytes a montré son efficacité dans différents cancers comme le mélanome métastatique, le neuroblastome, le sarcome et le lymphome (Abediankenari et al., 2013; Bol et al., 2014; Krishnadas et al., 2015; Wilgenhof et al., 2011).

Un seul vaccin de ce type a pu obtenir une autorisation de mise sur le marché, il s'agit du Sipuleucel-T, indiqué aux Etats-Unis depuis 2011 dans le cancer de la prostate où il montre une augmentation de la survie moyenne, sans effet sur l'évolution clinique (Graff and Chamberlain, 2015). Il a depuis fait l'objet de nombreuses critiques méthodologiques (Huber et al., 2012). 7 essais cliniques de phase III en cours (NCT02546102, NCT02111577, NCT01983748, NCT02993315, NCT02503150, NCT01582672, NCT00045968) dans plusieurs cancers comme le mélanome, le glioblastome, le cancer colorectal, rénal ou celui de la prostate.

Cependant, la vaccination cellulaire n'en reste pas moins une technique lourde, coûteuse et difficile à standardiser, de par l'étape indispensable que représente la culture cellulaire, là où la vaccination cherchait justement à s'affranchir de toutes ces contraintes. Pour surmonter ces écueils, il a été proposé de délivrer l'antigène aux DCs directement *in vivo*, via des vecteurs qui peuvent être synthétiques ou dérivés de micro-organismes.

2.3 Vaccins non cellulaires

Parmi les nombreuses formulations vaccinales qui peuvent exister, la stratégie de vaccination thérapeutique doit reposer sur une formulation capable de correctement cibler et activer les DCs. Un vaccin qui n'est pas capable de correctement activer les DCs n'a en effet que peu de chances d'induire une réponse efficace, même avec un antigène spécifique et immunogénique. Dans le contexte tumoral, il est d'autant plus important d'apporter aux DCs des signaux de maturation, que ces dernières sont déjà souvent orientées vers un profil tolérogène.

2.3.1 Vaccins peptidiques

La vaccination peptidique a consisté en l'une des premières stratégies de vaccination thérapeutique. Le choix du peptide antigénique qui sera administré en tant que vaccin prête à de nombreuses considérations.

Ainsi, les peptides peuvent être de différentes tailles, ce qui impacte directement la manière dont ils vont être présentés. L'injection de peptides immunodominants courts (9 acides aminés) leur permet de se lier directement sur le CMHI des cellules présentatrices d'antigène, sans aucune nécessité d'être endocyté et présenté par les voies habituelles de présentation et de cross-présentation. Cela a pour avantage de favoriser la reconnaissance du peptide antigénique par le TCR des lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Cependant, ceci implique aussi que les peptides ne vont pas activer la maturation des cellules dendritiques, et qu'ils peuvent même se fixer sur les CMHI des cellules avoisinantes, risquant ainsi d'induire une réponse tolérogène. Des peptides plus longs ont donc été développés, dans le but de limiter d'une part leur dégradation par les endo- et les exopeptidases, et de favoriser d'autre part leur endocytose par les DCs et donc leur présentation par les voies classiques (Slingluff, 2011). L'inconvénient majeur de cette stratégie de peptide unique, qu'il soit court ou long réside dans la restriction HLA qui lui est associée. Ainsi, un peptide donné ne peut être administré qu'aux seuls patients présentant un HLA pour lequel le peptide est restreint.

D'autres stratégies ont consisté à administrer plusieurs peptides de différentes natures, immunodominants ou non, avec par exemple, des restrictions HLA différentes mais aussi des antigènes différents, permettant d'induire une réponse polyclonale et variée. Ces stratégies de peptides multiples, cependant, posent la question de la compétition entre les peptides pour la présentation par les DCs (Slingluff, 2011).

Quasiment systématiquement associés aux vaccins peptidiques, les adjuvants sont des composés permettant d'augmenter ou de potentialiser l'immunogénicité d'un antigène. Ils sont nécessaires pour l'induction d'une réponse vaccinale optimale et pérenne. Les adjuvants peuvent être classés en deux grandes catégories : les *carriers* qui n'ont pas d'activité immunogénique mais qui potentialisent l'immunogénicité intrinsèque des antigènes en les

transportant jusqu'aux cellules immunitaires ; et les adjuvants immunostimulateurs qui vont eux-mêmes activer les récepteurs de l'immunité innée.

Parmi les adjuvants *carriers* on trouve les liposomes neutres et les microsphères, alors que les adjuvants immunostimulateurs peuvent être des ligands de TLR, de CLR ou de NLR ainsi que des saponines (Guy, 2007).

Du fait du très grand nombre d'adjuvants qui peuvent être exploités, il est essentiel de déterminer la combinaison optimale qui permet d'activer au mieux les récepteurs de l'immunité innée et d'orienter les DCs vers la maturation, sans pour autant risquer de déclencher des effets indésirables de type auto-immuns, ou bien d'amplifier les effets délétères de l'inflammation chronique qui est souvent associée aux tumeurs. De manière générale, l'efficacité de ces combinaisons est testée de manière empirique sur les modèles murins (O'Hagan and Fox, 2015).

Les vaccinations peptidiques MAGE-A3 et MUC1, par exemple, ont été développées respectivement dans des modèles de cancer du poumon et de mélanome. Elles consistent en l'injection du peptide MAGE-A3 ou MUC1 couplés à différentes associations d'adjuvants immunostimulateurs. Ces stratégies ont permis l'obtention de réponses T et B spécifiques, ainsi qu'une diminution significative des tailles tumorales (Gérard et al., 2014; Lu et al., 2015).

78 essais cliniques sont actuellement en cours (<https://clinicaltrials.gov> ; peptide vaccine cancer). Malheureusement, les résultats qui ont été rapportés dans différents cancers comme le mélanome, le lymphome et différents carcinomes (Aranda et al., 2013; Pol et al., 2015; Vacchelli et al., 2012) ne sont pas concluants.

Sur ce même principe vaccinal, d'autres composés ont pu être étudiés comme l' α -GalCer qui a été testé dans la cadre d'un essai de phase I. L' α -GalCer est un antigène glycolipidique reconnu par les cellules NKT, comme abordé précédemment. Il a été injecté sous forme libre ou pré-chargé sur des cellules dendritiques (DCs) matures. Les résultats de ces études ont montré une augmentation du nombre de NKT ainsi qu'une promotion de la

réponse inflammatoire antitumorale, permettant une stabilisation de la maladie chez plusieurs patients atteints de tumeurs solides comme des carcinomes ou des myélomes. (Chang et al., 2005; Giaccone et al., 2002; Ishikawa et al., 2005; Kunii et al., 2009)

2.3.2 Vaccins nucléiques

Une autre stratégie vaccinale consiste en l'injection d'acides nucléiques codants pour l'antigène. Dans le cas de la vaccination ADN, le plasmide portant le gène codant pour l'antigène tumoral est injecté au patient en association avec un procédé permettant la capture de l'ADN par les cellules (*gene-gun*, électroporation ou réactif de transfection). L'antigène est ensuite exprimé par les cellules transfectées, qui peuvent être des cellules présentatrices d'antigènes mais aussi des cellules épithéliales ou musculaires, selon la route d'injection du vaccin. Cette stratégie permet l'induction d'une réponse immune spécifique chez l'animal dans de nombreux modèles (Bloy et al., 2015; Ulmer et al., 1993). Dans le cancer cervical, un essai de phase 2/3 portant sur l'électroporation d'ADN codant pour les antigènes viraux E6 et E7 montre une régression tumorale chez près de 50% des patientes traitées (contre 30% des patientes sous placebo) (Trimble et al., 2015). Comme pour les vaccins peptidiques, cependant, de nombreux autres essais cliniques ont été réalisés dans différents cancers comme le mélanome, le cancer du sein ou le cancer colorectal et montrent une efficacité très limitée (Yang et al., 2015).

L'ARN peut lui aussi être administré comme antigène vaccinal. Malgré une plus grande fragilité que l'ADN, il représente un risque d'intégration génomique beaucoup plus faible et une immunogénicité propre qui lui valent depuis plusieurs années un retour en force dans les stratégies vaccinales précliniques (Benteyn et al., 2015; Lint et al., 2015). Récemment, un essai de phase I réalisé chez des patients atteints de mélanome métastatique a montré que l'utilisation d'un ARNm couplé à des liposomes permet de monter une réponse T spécifique de l'antigène ainsi codé (Kranz et al., 2016).

2.3.3 Inconvénients des formulations peptidiques et nucléiques

Malgré des résultats précliniques souvent encourageants, l'efficacité thérapeutique des vaccinations peptidiques et nucléiques peine toujours à être démontrée. Cet échec apparent peut s'expliquer par différentes raisons. Tout d'abord, ces vaccins ne permettent pas de cibler les DCs, ce qui limite la quantité d'antigène réellement disponible pour être ensuite présenté par les DCs. De plus, le vaccin n'a pas d'immunogénicité propre. Il est donc co-administré avec des adjuvants. Cependant, adjuvants et antigènes ne sont pas nécessairement capturés par les mêmes cellules, ce qui implique que certaines DCs peuvent recevoir l'antigène sans les signaux de maturation, et donc aboutir à une présentation tolérogène. Enfin, certains adjuvants utilisés ne sont pas forcément adaptés au contexte tumoral. Des essais ont par exemple été réalisés avec de l'IL12 comme adjuvant, associé à un vaccin ADN (Bloy et al., 2015). Malheureusement, cette technique d'adjuvantisation, qui a été mise au point la première fois dans un modèle infectieux (VIH) (Boyer et al., 2000), n'a pas montré d'efficacité dans le contexte tumoral. Le contexte tumoral est en effet souvent fortement immunosuppresseur, et la stratégie adjuvante à mettre en place pour lever cette immunosuppression doit être particulièrement réfléchie et adaptée. Pour permettre la levée de cette immunosuppression, d'autres stratégies ont cherché à délivrer les antigènes directement aux DCs, par le biais de vecteurs délivrant par la même occasion des signaux de maturation aux DCs ainsi ciblées. Ces stratégies permettent ainsi de délivrer spécifiquement l'antigène aux DCs, tout en favorisant leur orientation vers une voie immuno-activatrice, dans le but d'induire une réponse immune cytotoxique spécifique de l'antigène tumoral.

2.3.4 Vecteurs dérivés de microorganismes

Les vecteurs vivants, qu'ils soient bactériens ou viraux, possèdent des propriétés adjuvantes intrinsèques et, dans certains cas, des capacités de ciblage des cellules dendritiques. Dans le contexte des stratégies d'immunothérapies des cancers, ces vecteurs sont associés aux antigènes tumoraux principalement sous forme nucléique.

Les vecteurs bactériens les plus utilisés sont *Listeria monocytogenes*, *Shigella dysenteriae*, *Bordetella pertussis*, et le BCG. Les souches bactériennes sont génétiquement

modifiées pour ne plus exprimer de gènes de virulence, mais synthétiser des antigènes tumoraux. Les vaccins basés sur l'utilisation de *Listeria monocytogenes* se sont révélés efficaces pour l'induction de réponses immunes T CD8 spécifiques de nombreux antigènes tumoraux et montrent une efficacité thérapeutique dans différents modèles précliniques comme ceux des cancers du pancréas, du sein, de la prostate et du poumon (Souders et al., 2007; Wood and Paterson, 2014).

Différents vaccins basés sur *Salmonella* ont fait l'objet de plusieurs essais cliniques (Toussaint et al., 2013). Par ailleurs, il a été montré que la sous-unité β de la toxine Shiga de *Shigella dysenteriae* interagit avec le glycolipide Gb3, préférentiellement exprimé par les DCs et les lymphocytes B. Quand cette sous-unité est couplée à des antigènes tumoraux tels que l'ovalbumine (OVA) ou la protéine E7, elle est capable de délivrer l'antigène aux DCs et d'induire une forte réponse T CD8, permettant une réponse thérapeutique dans le modèle préclinique EG7 (Vingert et al., 2006).

Enfin, la stratégie vaccinale reposant sur l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*, associée à différents antigènes, a montré des capacités de ciblage du Cd11c présent à la surface des DCs, ainsi que des capacités d'activation de la voie TLR4/TRIF, aboutissant à la maturation de ces dernières. Finalement, cette stratégie a permis l'induction d'une forte réponse T CD8 spécifique (Dadaglio et al., 2014).

D'autres travaux se sont basés sur l'utilisation de vaccins dérivés de virus comme le virus de la vaccine, le virus modifié Ankara, les poxyvirus, les adénovirus, ou les virus de la famille de l'herpès. Les vecteurs viraux, en plus de leurs propriétés adjuvantes, possèdent l'avantage d'exprimer des molécules leur permettant dans de nombreux cas de cibler les cellules dendritiques.

Beaucoup de ces vaccins ont fait l'objet d'essais cliniques de phase I/II dans différents cancers comme le mélanome, le cancer du rein, du poumon ou de la prostate, montrant des bonnes capacités d'induction de réponse immune, et une augmentation modeste de la survie des patients, limitée à certains essais (Eder et al., 2000; Larocca and Schlom, 2011; Marshall et al., 2000). Un essai de phase III basé sur l'utilisation d'un virus de vaccine modifié et

portant l'antigène oncofoetal 5T4 a été réalisé chez des patients atteints de cancer rénal métastatique. Malheureusement, cet essai n'a pas montré d'effet significatif sur la survie des patients (Amato et al., 2010). De même, un essai de phase III portant sur le vaccin PROSTVAC, basé sur le poxvirus et ciblant l'antigène spécifique de la prostate PSA, est en cours chez des patients atteints de cancer de la prostate (NCT01322490). L'essai de phase II associé montre des résultats assez encourageants (Kantoff et al., 2010, 2016).

Cependant, les stratégies vaccinales reposant sur l'utilisation de virus présentent généralement des inconvénients importants. En particulier, les vecteurs vaccinaux induisent souvent la production d'anticorps neutralisants dirigés contre la capsid virale, limitant la possibilité de continuer les injections de ce même vaccin chez le patient (Dharmapuri et al., 2009; Larocca and Schlom, 2011). Dans certains cas, une réponse anticorps préexiste même à la première injection, ce qui rend inefficace toute la stratégie vaccinale. Par ailleurs, certains de ces virus possèdent des propriétés de neurotropisme ce qui pose un problème majeur en termes de sécurité. De même, l'intégration génomique des gènes d'intérêt peut représenter un risque pour le patient. Enfin, la plupart des virus utilisés sont lytiques et induisent donc une lyse rapide de la cellule cible après sa transfection. Dans le cas des cellules dendritiques, cela limite fortement leur capacité d'induction d'une réponse immune (Larocca and Schlom, 2011).

2.3.5 Vecteurs non viraux

Contrairement aux vecteurs viraux, les vecteurs non viraux sont des constructions synthétiques, plus faciles à produire, à manipuler, à stocker et n'étant pas considérés comme des OGM. Dans le contexte de la vaccination thérapeutique, deux grandes approches de vectorisation synthétique ont été élaborées. Premièrement, différentes constructions protéiques ont été mises au point dans le but de cibler spécifiquement les cellules dendritiques. Deuxièmement, des constructions lipidiques (liposomes) ont été élaborées, permettant l'encapsulation d'antigène sous différentes formes, et pouvant être fonctionnalisés avec différents groupements permettant le ciblage et/ou la maturation des DCs.

2.3.5.1 Ciblage des DCs via des constructions protéiques

2.3.5.1.1 Constructions basées sur des anticorps

Les protéines de fusion associent des anticorps spécifiques des récepteurs associés aux DCs, et un peptide ou une protéine antigénique. Les récepteurs ciblent très souvent des lectines de type C. En effet, ces récepteurs sont largement répandus au sein des différentes populations de cellules dendritiques. Comme expliqué précédemment, leur fonction de reconnaissance des motifs carbohydrogénés est souvent associée à des capacités d'endocytose et de maturation. Ils représentent donc des cibles de choix pour une stratégie vaccinale visant à favoriser la capture et la présentation antigénique ainsi que l'induction d'une réponse immune optimale (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009). Pour autant, toutes les lectines ne sont pas aussi efficaces en termes de capture et de présentation. De la même manière, la qualité de la réponse induite varie en fonction des lectines ciblées (Palucka and Banchereau, 2013).

Les travaux répertoriés et reposant sur des stratégies de ciblage des DCs *in vivo* via des anticorps spécifiques des lectines de type C, couplés à des peptides ou des protéines antigéniques, sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 3). La majorité de ces travaux sont réalisés chez la souris. Ils montrent de bons résultats, en termes d'induction de la réponse immune spécifique de l'antigène, mais aussi d'efficacité thérapeutique, dans différents modèles tumoraux. Seules deux stratégies sont actuellement testées en clinique. La première stratégie repose sur l'injection d'une protéine de fusion entre l'antigène NY-ESO-1 et un anticorps monoclonal anti DEC205, couplée à l'injection de différents agonistes de TLR. Elle permet l'induction d'une réponse à la fois cellulaire et humorale et, dans le cadre d'un essai de phase 1, une efficacité clinique a déjà été relevée dans différents cancers (Dhodapkar et al., 2014). Plusieurs autres essais de phase 1 ou 2 sont en cours. La deuxième stratégie repose sur la protéine de fusion entre la β -hCG et un anticorps anti CD206. Un essai de phase 1 a déjà montré l'efficacité de ce vaccin pour induire une réponse cellulaire et humorale dans plusieurs cancers. L'essai de phase 2/3 est en cours (Morse et al., 2011).

LECTINES CIBLES	STRATEGIE DE CIBLAGE	INDUCTION REPONSE IMMUNE ?	EFFICACITE THERAPEUTIQUE ?	RÉFÉRENCES
Dectin-1 humain	protéine de fusion MART1/anticorps anti Dectin-1	induction réponse cellulaire		(Ni et al., 2010)
DCIR humain	protéine de fusion Flu/anticorps antiDCIR	induction réponse cellulaire		(Klechevsky et al., 2010)
CLEC9A	protéine de fusion OVA/anticorps antiCLEC9A	induction réponse humorale	-	(Lahoud et al., 2011) (Caminschi et al., 2012)
CLEC9A	protéine de fusion peptide MUC1 /anticorps anti CLEC9A	-	modèle MC38 : inhibition pousse tumorale	(Picco et al., 2014)
MR (CD206)	anticorps antiCD206	dépend des adjuvants utilisés	-	(He et al., 2015)
DEC205 (CD205)	protéine de fusion HER2neu/anticorps anti DEC205		modèle D2F2/E2 HER2/neu positif : régression tumorale quand couplé à la cyclophosphamide modèle de tumeurs mammaires spontanées BALB-neuT : inhibition pousse tumorale	(Cao et al., 2013)
DEC205 (CD205)	protéine de fusion gp100/anticorps anti DEC205	induction réponse cellulaire	modèles B16F10 et RET : inhibition de la pousse tumorale	(Johnson et al., 2008)
CLEC9A	protéine de fusion peptide OVA/anticorps anti CLEC9A	induction réponse cellulaire	modèle B16 : éradication des métastases pulmonaires	(Sancho et al., 2008)
DEC205 (CD205)	protéine de fusion OVA/anticorps anti DEC205	induction réponse cellulaire		(Bonifaz et al., 2002)
DEC205 (CD205)	protéine de fusion NY-ESO-1/anticorps antiDEC205	Induction réponse cellulaire et humorale	essai clinique phase 1 : régression tumorale pour 20% des patients / augmentation médiane durée de vie de 6 mois autres essais phase 1/2 en cours	(Dhodapkar et al., 2014) ClinicalTrial NCT00948961 NCT02166905 NCT01834248 NCT01522820 NCT02129075
MR (CD206)	protéine de fusion hCG-β/anticorps antiCD206	Induction réponse cellulaire et humorale	essai phase 2/3 en cours	(Morse et al., 2011) ClinicalTrial NCT00709462

Tableau 3 : Stratégies reposant sur le ciblage in vivo des DCs via des anticorps spécifiques des lectines de type C.

Cependant, les stratégies décrites ici sont tout à fait spécifiques d'une lectine de type C donnée, et ne permettent donc pas de délivrer l'antigène à de larges populations de DCs. De plus, elles n'ont pas d'effet adjuvant propre, et doivent donc être associées à des adjuvants. Enfin, l'antigène doit être associé de façon covalente à l'anticorps, ce qui limite l'adaptabilité de ces stratégies.

2.3.5.1.2 Constructions basées sur des dérivés de microorganismes

D'autres stratégies de ciblage consistent à utiliser des protéines dérivées de microorganismes, dont les capacités de ciblage et de maturation des DCs sont déjà connues. Vingert *et al.*, par exemple, ont décrit l'efficacité thérapeutique préclinique de la sous-unité B de la toxine Shiga, associée à la protéine OVA comme antigène et ciblant les DCs (Vingert *et al.*, 2006). Yang *et al.* ont quant à eux développé un vecteur lentiviral (LV) exprimant une glycoprotéine modifiée du virus *Sindbis* afin de cibler les DCs *via* leur récepteur DC-SIGN. Ce LV semble capable d'induire une maturation des DCs *in vivo* et montre lui aussi une efficacité thérapeutique dans un modèle murin de lymphome (Yang *et al.*, 2008). Cependant, les glycoprotéines de ce LV étant d'origine virale, le risque de développer des anticorps neutralisants après plusieurs injections ne peut pas être exclu (Larocca and Schlom, 2011), ce qui limite de fait la possibilité de réaliser des injections répétées au même patient.

Comme pour les constructions basées sur les anticorps, ces stratégies présentent comme inconvénient de nécessiter des liaisons covalentes avec l'antigène, ce qui limite de fait leur adaptabilité.

2.3.5.2 Ciblage des DCs via des liposomes

Pour faciliter l'association vecteur/antigène, d'autres approches ont été étudiées, et en particulier, les stratégies basées sur l'utilisation de liposomes.

Les liposomes sont des bicouches lipidiques de quelques dizaines de nanomètres de diamètre, particulièrement efficaces pour délivrer des molécules dans le cytosol des cellules cibles, et qui peuvent être ou non fonctionnalisés avec des résidus protéiques ou

glycolipidiques. Contrairement aux vecteurs viraux et bactériens décrits précédemment, les liposomes ne sont pas immunogènes et ne risquent donc pas d'induire d'anticorps neutralisants.

Les travaux *princeps* de J. Kantor ont montré qu'ils étaient efficaces comme adjuvants dans le cadre de stratégies de thérapies antitumorales (Bei et al., 1998). Un essai clinique, basé sur l'encapsulation de peptides immunodominants de la survivine dans des liposomes a par ailleurs montré la sécurité de ce type de formulation (Berinstein et al., 2015).

Depuis, différentes stratégies ont pu être mise au point, avec notamment les travaux de *Neeland et al.* qui montrent que des liposomes utilisés comme vecteurs vaccinaux permettent l'induction d'une réponse immune adaptative, et que l'incorporation d'ARN poly(I :C) au sein des liposomes améliore la capture de l'antigène par les cellules dendritiques, leur maturation, et la réponse humorale spécifique de l'antigène vectorisé (Neeland et al., 2014). De manière générale, l'ARN est reconnu comme un signal de danger par les DCs, ce qui lui confère un pouvoir immunostimulateur intrinsèque (Benteyn et al., 2015; Lint et al., 2015).

D'autres formulations liposomales ont été mises au point et, en particulier, des liposomes cationiques permettant l'encapsulation d'une séquence d'ADN (lipoplexe) et son relargage dans le cytosol. L'équipe de X. Gao a aussi montré que l'utilisation d'un liposome polycationé en association avec un polymère de poly-L-lysine (lipopolyplexe) améliore l'efficacité de la transfection (Midoux and Pichon, 2015; Gao and Huang, 1996). En effet, le polymère de poly-L-lysine permet la condensation de l'acide nucléique au sein du liposome.

Plus récemment, *Kranz et al.* ont montré que des lipoplexes vectorisant un ARNm codant pour l'antigène d'intérêt étaient capables de cibler les cellules dendritiques selon un mécanisme dépendant de leurs charge. Cette approche vaccinale permet l'induction d'une réponse de type IFN α , qui a été validée en clinique (Kranz et al., 2016).

Pour améliorer le ciblage des cellules dendritiques, d'autres approches ont consisté à fonctionnaliser ces liposomes avec des résidus mannose, qui sont des ligands des lectines de type C précédemment décrites et particulièrement intéressantes dans le cadre des stratégies de

ciblage des DCs. *Thomann et al.*, par exemple, ont mis au point des liposomes dont les lipides sont associés de manière covalente à des peptides antigéniques, mais aussi à des résidus mannose et à des agonistes de TLR comme adjuvants. Cette construction a montré une bonne efficacité dans un modèle de cancer du sein exprimant Her2 (*Thomann et al.*, 2011). Malheureusement, la nécessité de lier les peptides de manière covalente aux lipides formant le liposome impacte fortement l'adaptabilité et la versatilité de cette stratégie.

2.3.5.3 Stratégie de lipopolyplexes à ARNm (LPR) mannosylés

Afin d'associer les capacités de ciblage des liposomes mannosylés à l'intérêt de l'ARNm, l'équipe de P. Midoux a mis au point des liposomes cationiques mannosylés permettant l'encapsulation d'un ARNm. En plus de ses capacités immunoactivatrices précédemment décrites et de l'adaptabilité qu'il représente, car n'importe quel antigène peut théoriquement être traduit en ARNm, le choix de vectoriser l'antigène sous forme d'ARNm repose sur des avantages forts en termes d'applicabilité chez l'Homme. En effet, la transfection d'ARNm diminue fortement le risque d'intégration génomique par rapport à une transfection d'ADNc. De plus, elle ne nécessite pas l'utilisation de séquences promotrices et enhancer, et n'est pas considérée comme une substance soumise à la réglementation sur les OGM. De fait, cette approche est beaucoup plus sécurisante. Toutes ces raisons font de l'ARNm un choix particulièrement intéressant dans le cadre de la vaccination thérapeutique par ciblage des DCs.

Dans le cadre de la stratégie développée par *Midoux et al.*, la mannosylation est directement réalisée sur les lipides constituant le liposome et peut être simple ou triple (3 résidus mannose disposés en trident) (*Barbeau et al.*, 2016). Le but de la trimannosylation est de s'approcher au mieux de la conformation naturelle des ligands naturels des CLR (Figure 9).

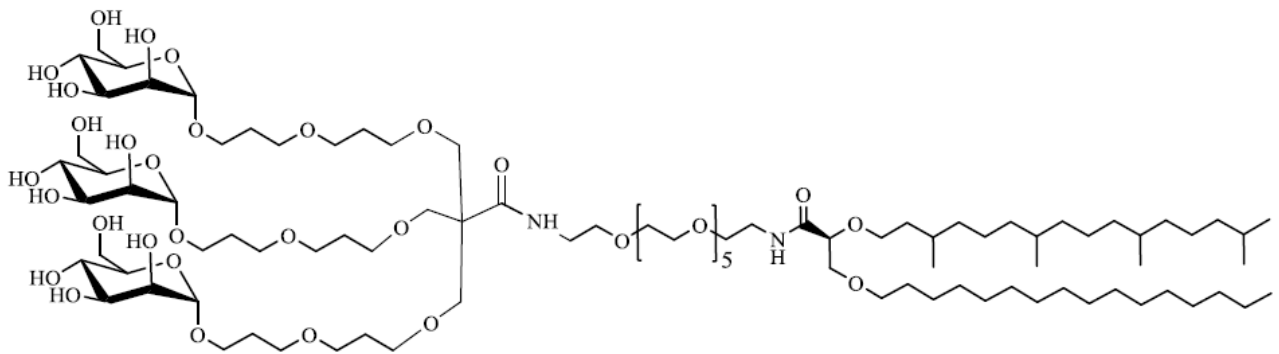


Figure 9 : Structure du lipide trimannosylé. D'après (Barbeau et al., 2016)

Ce type de ciblage est beaucoup moins spécifique que les protéines de fusion antigène/anticorps telles que décrites dans la figure 7, mais possèdent l'avantage considérable de ne pas se restreindre à une fraction des DCs. Le ciblage large des CLR permet d'ailleurs aux LPR d'être théoriquement reconnu par les autres cellules présentatrices d'antigène, à savoir les macrophages et les lymphocytes B. Enfin, en activant les CLR avec un ligand conformationnel, proche de leurs ligands naturels, les LPR sont susceptibles d'activer la signalisation propre aux CLR, qui est souvent associée à des capacités d'endocytose et de maturation (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009).

Afin de vectoriser l'ARNm, les liposomes sont associés à des polymères cationiques (polyplexes) permettant la condensation d'un acide nucléique au sein du liposome et son relargage dans le cytosol de la cellule cible. Le polymère utilisé est de la poly-L-lysine histidylée et PEGylée (Poly ethylen glycol), ce qui permet la condensation de l'ARN en nanoparticules de 50 nm et sa protection contre les dégradations enzymatiques. D'autre part, les liposomes élaborés par Midoux *et al.* contiennent aussi des résidus histidine. La double histidinylation du liposome et du polymère confère à ces derniers la capacité de fusionner à pH légèrement acide (pH 6), ce qui permet le transfert de l'ARNm dans le cytosol des cellules à partir des vésicules d'endocytose (Figure 10).

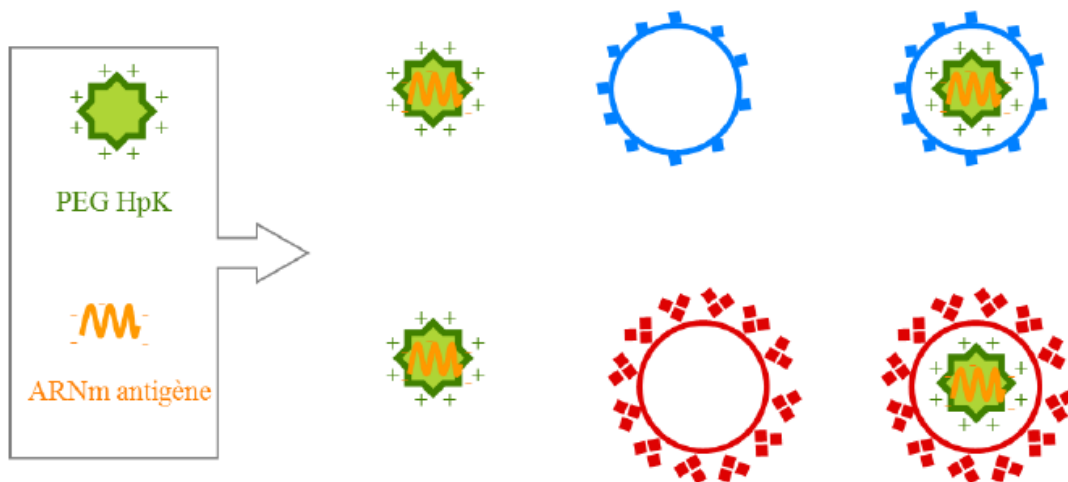


Figure 10 : Structure des lipopolyplexes à ARNm (LPR) mannosylés. L'ARNm codant l'antigène est associé à un polymère de lysine, et le complexe est encapsulé dans un liposome mono- ou tri-mannosylé

L'efficacité de la formulation utilisant des LPR monomannosylés a été démontrée dans un modèle murin de mélanome (B16F10) avec une stratégie vaccinale préventive ciblant l'antigène MART1 exprimé par la tumeur (Perche et al., 2011). Dans cette étude, la vaccination préventive ainsi réalisée est efficace pour protéger les souris de l'apparition de tumeurs.

Objectifs de thèse

L'objectif général de mon travail de thèse est de développer une nouvelle stratégie thérapeutique des cancers basée sur la vaccination thérapeutique par lipopolyplexes à ARNm (LPR) mannosylés.

Le premier objectif de mon travail était de tester la capacité des LPR mannosylés à être capturés par des cellules exprimant des lectines de type C en général, et des cellules dendritiques en particulier. Pour cela, nous avons placé des LPR fluorescents en coculture avec des cellules exprimant des lectines de type C d'une part, et des cellules dendritiques d'autre part, et nous avons mesuré le degré de fixation des LPR. Nous souhaitons aussi tester la correcte expression de l'antigène dans la cellule après translocation de l'ARNm, et nous avons pour cela utilisé des LPR vectorisant l'ARNm de la GFP, afin de tester l'expression de cet antigène. Nous avons enfin étudié la biodistribution des LPR injectés *in vivo*, ainsi que leur colocalisation avec les cellules dendritiques.

Mon deuxième objectif était d'étudier la réponse immune induite *in vivo* par les LPR mannosylés. Pour répondre à cette question, nous avons injecté à des souris des LPR spécifiques d'un antigène tumoral et nous avons mesuré la réponse T spécifique de l'antigène au niveau systémique. Nous avons aussi caractérisé la réponse inflammatoire induite localement au point d'injection et au niveau du ganglion drainant.

Le troisième objectif de ce travail, était de tester l'efficacité thérapeutique de la stratégie LPR dans différents modèles tumoraux, ce que nous avons pu réaliser dans le modèle de carcinome TC1, le modèle de mélanome B16 et le modèle de lymphome EG7.

Enfin, le quatrième objectif de mon projet de thèse était d'étudier la capacité de fixation des LPR par les cellules humaines, et plus particulièrement par les cellules dendritiques. Nous avons donc placé des cellules mononucléées de sang périphérique (PBMCs) ainsi que des cellules dendritiques humaines cultivées en présence de LPR

fluorescents, et nous avons mesuré leur degré de fixation. Nous avons aussi testé sur des cellules dendritiques issues de monocytes l'expression de la GFP vectorisée dans des LPR.

Résultats

Evaluation préclinique de la vaccination thérapeutique LPR

Mon travail de doctorat portant sur l'évaluation de la stratégie LPR comme thérapie vaccinale antitumorale a donné lieu au dépôt d'un brevet intitulé « DIÉTHERS D'ARCHAEA LIPIDES SYNTHÉTIQUES » le 9 juin 2016, et à la rédaction d'une publication soumise à *Cancer Research*. Cette publication est présentée ci-après.

Résumé

L'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire repose sur la capacité des cellules dendritiques à correctement présenter l'antigène aux cellules effectrices. Nous avons donc développé une stratégie de vaccination thérapeutique basée sur des lipopolyplexes à ARNm (LPRs) : l'ARNm codant pour l'antigène, associé à un complexe de polylysine histidylée est incorporé dans un liposome trimannosylé afin de mieux cibler les cellules dendritiques. En effet, les cellules dendritiques expriment largement les lectines de type C, qui sont des récepteurs reconnaissant principalement des résidus mannose.

Dans le travail présenté ici, nous montrons que les LPR trimannosylés sont capables de se fixer sur les cellules dendritiques humaines et murines. De manière très intéressante, nous montrons aussi que les LPR trimannosylés injectés chez la souris induisent le recrutement et l'activation de cellules dendritiques dans le ganglion drainant. De plus, quand les LPR trimannosylés vectorisent un ARNm codant pour l'antigène tumoral E7, ils sont capables d'induire une réponse T spécifique d'E7 au niveau systémique.

Enfin, les LPRs trimannosylés permettent une réponse thérapeutique lorsqu'ils sont utilisés dans trois différents modèles de tumeurs : le modèle TC1 de carcinome exprimant E7, le modèle B16 de mélanome exprimant MART1 et le modèle EG7 de lymphome exprimant OVA. Cette stratégie apparaît donc prometteuse comme thérapie innovante anti-cancer.

Preclinical Evaluation of Trimannosylated mRNA Lipopolyplexes as Therapeutic Cancer Vaccines Targeting Dendritic-Cells

A. Le Moignic^{1,2}, P. Midoux³, T. Benvegna⁴, L. Lemiègre⁴, C. Baillou^{1,2}, M. Delost², G. Lescaille^{2,5}, C. Pichon³, F.M. Lemoine^{1,2,6*} and V. Mateo^{1,2*}.

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Paris, France

²UMR-S INSERM U1135, CNRS ERL 8255, Centre d'Immunologie et Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Paris, France

³Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Orléans, France

⁴UMR CNRS 6226 ENSC, Rennes, France

⁵Paris Diderot/Paris 07, Sorbonne Paris Cité, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Department of Odontology, Paris, France

⁶AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Department of Biotherapies, Paris, France

*equal contributions

Keywords :

Therapeutic vaccination, cancer, immunotherapies, dendritic cell, mRNA lipopolyplexes, LPR

Acknowledgments:

The authors would like to thank the microscopy platform « Plate-forme d'Imagerie Cellulaire Pitié Salpêtrière » (Pitié Salpêtrière hospital, Paris, France) and Béatrice Bault Levacher (UPMC, UMR-S INSERM U959, Paris) for her helpful assistance. The authors would like to thank Dr Bertrand Bellier (UPMC, UMR-S INSERM U959, Paris, France), Pr Kris Thielemans (Laboratory of Molecular and Cellular Therapy, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium), Dr Franck Fieschi (Institut de biologie structurale, Grenoble France) for their kind gift of pcDNA3-OVA, pGEM4Z-Sig-LAMP and pCEV4M-langerin plasmids, respectively.) We are grateful to Dr Alexandre Boissonas (CIMI-Paris, UMR-S INSERM 1135, Paris, France) for providing us CD11c-YFP transgenic mice. This work was granted by

“Ligue Nationale contre le Cancer”. ALM is recipient of fellowship from the French Ministry for Higher Education and Research (MENESR).

Corresponding authors:

Prof. François M. Lemoine, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, UPMC UMRS CR7, INSERM U1135 83, Bld. de l'Hôpital, 75651 Paris CEDEX 13, France. Phone: (33) 1 42 17 74 42; Fax: (33) 1 42 17 74 41; E-mail: francois.lemoine@upmc.fr.

Dr. Véronique Mateo, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, UPMC UMRS CR7, INSERM U1135 83, Bld. de l'Hôpital, 75651 Paris CEDEX 13, France. Phone: (33) 1 42 17 74 42; Fax: (33) 1 42 17 74 41; E-mail: veronique.mateo@upmc.fr.

Abstract:

Proper delivery of tumor antigens to Dendritic Cells (DCs) is crucial for successful therapeutic cancer vaccine. C-type Lectins are considered good targets in DCs based vaccination due to their capacity in triggering signals that induce their maturation.

Nanoparticles mRNA lipopolyplexes encoding tumor antigens have been shown to be suitable vehicles for DCs transfection. In this present work, we evaluate a newly formulated vaccine, composed of tumor antigen encoding mRNA lipopolyplexes functionalized with Trimeric Mannose residues, to target C-type Lectins (triMN-LPRs). TriMN-LPRs encoding GFP preferentially bind CD209/DC-SIGN and CD207/Langerin expressing cell-lines, as compared to mono-mannosylated LPR (MN-LPRs). When delivered to human and mouse DCs, triMN-LPRs exert a better capacity to fixate and target them among other hematopoietic cell populations. We next evaluated immune responses in C57BL/6 mice. In vivo DC targeting by triMN-LPRs induces a local inflammatory response two days after intradermal delivery to mice, followed by a recruitment and activation of DCs in the corresponding draining lymph nodes. This was accompanied by the skin production of CCR7 and CXCR4 at vaccination sites, two chemokines needed to drive DC migration. At the T cell level, tumor specific cytotoxic cells produced more IFN-gamma against E7-peptide loaded splenocytes after E7 mRNA triMN-LPRs vaccinations. Finally, the anti-tumoral properties of triMN-LPRs were evaluated in three therapeutic pre-clinical mice tumor models by using E7-expressing TC1 cells, OVA-expressing EG7 cells and MART-1-expressing B16F10 tumor cells in C57BL/6 animals. TriMN-LPRs, when combined with proper mRNA antigens, exert significantly late curative responses in vaccinated mice seven days after initial tumor inoculation. Together,

these encouraging results demonstrated that DC targeting with triMN-LPRs gave a sufficient stimulatory response to mount a therapeutic anti-cancer immune response, and could be considered for anti-cancer vaccine in Humans.

Abbreviations:

APC, Antigen presenting cell; CTL, Cytotoxic T lymphocyte; DC, Dendritic cell; DC-LAMP, Dendritic cell lysosome-associated membrane glycoprotein; DC-SIGN, DC-specific-ICAM3-grabbing-nonintegrin; DLN, Draining Lymph-Nodes; ID, Intradermal; GM-CSF, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor; MINCLE, Macrophage inducible Ca²⁺-dependent lectin; MN-LPR, monomannosylated mRNA lipopolyplexe ; Mo-DCs, Monocyte-derived dendritic cells; PAMPs, Pathogen Associated Molecular Pattern; PBMCs, Peripheral blood mononuclear cells; PEGHpK, PEGylated histidylated polylysine; PRRs, Pattern Recognition Receptors; SC, Subcutaneous; triMN-LPR, trimannosylated mRNA lipopolyplexe

Introduction:

Despite the progress made for improving the care of patients with cancer, new therapies are needed. Among them, therapeutic vaccination that consists of triggering an effective cytotoxic immune response directed against tumor cells may be a promising approach (1–3).

In order to mount such cytotoxic CD8⁺ T cell (CTL) responses, antigens should be taken in charge by professional antigen presenting cells (APC), which dendritic cells (DCs) being the most powerful APC. When delivered properly to DCs, antigens are uptaken, processed and presented to T-cells for priming. Selective delivery of vaccines to DCs is thus an attractive method for vaccination therapies (3–7). Since the pioneering works of R. Steinmann on DCs, many expectations have been made for developing DC-based vaccination. However, cellular DC vaccines represent a labor intensive and costly in-vitro procedure (2). For such a reason, DC-based vaccines cannot be an option to vaccinate a large population against infectious diseases or to treat cancers.

More recently, several strategies have been explored to present defined antigens directly to DCs in vivo. The targeting of these cells can be achieved with ligands that are

selectively recognized by surface receptors, and then will permit their endocytosis (6). Pattern Recognition Receptors (PRRs) bind molecular motifs (Pathogen Associated Molecular Pattern or PAMPs) expressed on viruses, bacteria, yeast, fungi or parasites. PAMPs may be composed of oligosaccharides comprising mannose and/or fucose, lipopolysaccharide, peptidoglycans, lipoproteins, and beta-glucans. C-Type Lectin Receptors is a large family of PRRs that binds carbohydrates. They encompass several lectins expressed by DCs that preferentially bind to Mannose, like the Mannose-Receptor/CD206, DC-specific-ICAM3-grabbing-nonintegrin/CD209 (also known as DC-SIGN) or Langerin/CD207. Mannose-containing structures can also bind to other receptors like the Fc γ R associated Dectin-2, MINCLE or Dectin-1 expressed on DCs but also on other APC such as monocytes, macrophages, and B-cells. Most of the DC'expressed lectins that bind mannose structures possess endocytic activity, and have been shown to induce in many instances DC maturation and potent immune responses. Thus, carbohydrate-based targeting seems a valuable manner to induce antigen uptake, antigen presentation, and following immune responses (8,9).

Several natures of antigens have been used in vaccine formulations as preventive or therapeutic agents. Of note, antigens could be proteins, polypeptides, but also nucleic acids like DNA or mRNA (10). Interestingly, clinical trials with direct administration of synthetic mRNAs encoding tumor antigens demonstrated safety and induction of tumor-specific

immune responses (11,12). Then, synthetic mRNAs can become bio-pharmaceutics allowing an innovative safe vaccination strategy against cancer. Of note, as compared to DNA-based vaccines, mRNA does not require its delivery in the nucleus to translate into transiently expressed antigens, does not contain promoters or anti-bacterial genes, and has no risk to integrate the genome.

We had previously showed that mRNA vaccine formed of ternary complexes designed with cationic liposomes (L)/cationic polymer (P)/mRNA (R) called lipo-polyplexes (LPRs), functionalized with monomeric mannose residues to favor mRNA delivery and DCs targeting, demonstrated efficient preventive protection against MART-1 expressing B16F10 mice melanoma (13).

In order to improve DC-targeting and vaccine efficacy, we designed new LPRs particles by adding to the formulation trimers of mannose residues (14).

In this study, we explore the effect of this new formulation in term of DC targeting, and induction of both immune and therapeutic response in different experimental tumor models.

Material and methods:

Plasmids. Plasmids used are pCEV4M-langerin, pcDNA3-E7, pcDNA3-GFP, pcDNA3-OVA, pGEM4Z-Sig-E7-LAMP, pGEM4Z-Sig-GFP-LAMP, pGEM4Z-Sig-OVA-LAMP, pGEM4Z-MART1 and pGEM-Sig-MART1-LAMP. pcDNA3-E7 was obtained by insertion of $\Delta E7$ sequence into pcDNA3 plasmid (15). pCEV4M-langerin is a kind gift from Dr Franck Fieschi (Institut de biologie structural, Grenoble France). pcDNA3-OVA is a kind gift from Dr. Bertrand Bellier (UPMC, UMR-S INSERM U959, Paris, France). pGEM4Z-MART1 and pGEM-Sig-MART1-LAMP were produced by Dr. Patrick Midoux (Orléans, France) using pGEM4Z-Sig-LAMP plasmid kindly given by Pr. Kris Thielemans (Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium). pGEM4Z-Sig-GFP-LAMP, pGEM4Z-Sig-E7-LAMP and pGEM4Z-Sig-OVA-LAMP were made by insertion of $\Delta E7$ sequence or OVA into the pGEM4Z-Sig-LAMP plasmid. Plasmids were inserted by electroporation into E. coli TOP10 electro-competant bacteria (Invitrogen, France), and then isolated and purified with NucleoBond Xtra Maxi EF Kit (Macherey-Nagel, Germany) after bacteria amplification.

mRNA production. pGEM4Z-Sig-E7-LAMP, pGEM4Z-Sig-GFP-LAMP, pGEM4Z-Sig-OVA-LAMP, pGEM4Z-MART1 and pGEM-Sig-MART1-LAMP plasmids were

linearized with SpeI; pcDNA3-E7, pcDNA3-GFP and pcDNA3-OVA plasmids were linearized with BglII. Linearized plasmids were used as a template for in vitro transcription using the T7 mMessage mMachine ultra kit (Ambion, United Kingdom) to produce anti-reverse cap analog (ARCA)-A100 mRNAs. The mRNA obtained by this means had an ARCA modified cap and a 100-adenosine poly(A) tail. The RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm. Non-coding polyU RNA was purchased from Invivogen (San Diego, USA).

Murine cell lines. TC1, B16-F0 and EG7-OVA cell lines were purchased from ATCC. TC1 cells are transformed murine (H-2b) epithelial cells co-transfected with HPV-16 E6/E7 genes and the activated human Ha-ras (G12V) oncogene DNA. B16-F0 and EG7-OVA cells are transformed murine (H-2b) tumor cells that expressed MART1 and OVA, respectively. DC2-4 cells is a murine dendritic cell line. All cell lines are maintained in RPMI (Gibco, USA) supplemented with 10% FCS, glutamine (2mM), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) in humidified air with 5% CO₂ at 37°C. Cells were tested for Mycoplasma.

Human cells. HEK-293T (293T) cell line was obtained from ATCC (American Type Culture Collection, USA) and 293T-DC-SIGN cell line was made in our laboratory by transducing 293T cells using a lentiviral vector encoding the DC-SIGN human lectin (CD209), a kind gift from O. Schwartz (Pasteur Institut, Paris, France). 293T-DC-SIGN cells are 99% CD209 positive. Both 293T and 293T-DC-SIGN cell lines were grown in DMEM (Gibco, USA) supplemented with 10% FCS, glutamine (2mM), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) in humidified air with 5% CO₂ at 37°C. 293T-langerin cells were obtained by transducing 1.106 293T cells with 3 µg of langerin encoding plasmid. Transduction was performed by electroporation (90 Ω; 300 V; 150 µF), and transduction rate evaluated by flow cytometry was 20-25% of langerin-expressing cells at 24h.

PBMCs were isolated from leukapheresis residues (EFS, Paris, France) collected from healthy volunteers after informed written consent, by using a Ficoll gradient (Biochrom, Berlin, Germany). Monocyte-derived dendritic cells (Mo-DCs) were obtained as previously described (16): briefly, CD14-positive cells were isolated from PBMCs using a magnetic cell sort (Miltenyi Biotec, France) and maintained in RPMI plus 10% human AB serum (hABS), glutamine (2mM), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) in humidified air with 5% CO₂ at 37°C. Culture medium was also supplemented with granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF, 100 ng/mL; Gentaur, France) and IL-4 (10

ng/mL; Miltenyi Biotec, France) for 5 days. At day 5, Mo-DCs were used for further experiments.

Mice. Female C57BL/6J (H-2b) mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) and were 7-weeks old at beginning of experiments. Female C57BL/6J (H-2b) CD11c-YFP transgenic mice were kindly provided by Dr. Alexandre Boissonas (CIMI-Paris, Paris, France). Mice were maintained under specific pathogen-free conditions, and manipulations were performed according to European Economic Community guidelines and approved by the local ethics committee.

LPR preparation. Lipopolyplexes were prepared as following: 15 μ g PEGHpK (in 10 μ L 10 mM HEPES buffer, pH 7.4) to 5 μ g mRNA (in 25 μ L 10 mM HEPES buffer, pH 7.4). After 4 seconds of mixing by vortex, the solution was kept at 20°C for 30 minutes. Then, lipopolyplexes were formed by adding 10 μ g of liposomes (5 μ L at 5.4 mM in 10 mM HEPES buffer, pH 7.4) to polyplexes by up-down pipetting. Liposomes were either mono-, tri-mannosylated, labeled or not with FITC or rhodamine fluorochrome. The solution was kept at 20°C for 15 minutes before use.

LPR binding assays. Cells (2×10^5 in 0.2 mL) in suspension were incubated with fluorescent LPR at indicated final concentrations, at 37°C for 3 hours. Then, cells were washed with PBS, and cell-associated fluorescence intensity was measured with a flow cytometer analyzer (LSRII, Becton Dickinson, USA). Raw data were analyzed with FlowJo software (FlowJo LLC, USA). Results are presented as percentages of LPR⁺ cells and as mean fluorescence intensity (MFI) ratio (MFI of LPR incubated cells divided by MFI of control cells).

LPR vaccinations. For LPR immunization, shaved and anesthetized mice (3% isoflurane) were two or three times (day 0, day 2, day 9) ID injected with 50 μ L of LPR in the back. In some experiments, mice were immunized either by IV (150 μ L of LPR) or SC (50 μ L of LPR) routes. Immune responses were evaluated 14 or 21 days after the first vaccination. Spleen and lymph nodes were collected for further use. In some experiments, skin samples and lymph nodes were also collected at day-2 following immunization, and then frozen in OCT. For CD11c-YFP transgenic mice, organs were first immersed in 4% paraformaldehyde

at 4°C during 24 hours, and then in a 30% sucrose solution at 4 °C during 24 hours before freezing.

For therapeutic vaccination, mice were first inoculated SC with 1.105 of TC1 or B16-F0, or 1.106 EG7-OVA cells. Seven days after cell injection, mice were ID vaccinated using 50 µL of LPR at day 7 and day 9. Tumor growth was monitored every 2 or 3 days. Tumor volumes were determined by measuring the largest diameter (L) and smallest diameter (l) and calculated according to the formula: $0.5 \times (L \times l \times l)$. Mice were euthanized when they reached a tumor volume of 2000 cm³.

Multiparameter flow cytometry. Murine cell suspensions were obtained from lymph nodes or spleen by enzymatic dissociation using 1 mg/mL of collagenase IV (Sigma-Aldrich) and 0.2 mg/mL of DNase (Roche). After counting, cells were stained using Fixable Viability Dye eFluor[®]780 at 2-8°C during 10 minutes and incubated with appropriate combinations of monoclonal antibodies (mAbs) described below. Human PBMCs were isolated from leukapheresis residues as described above.

All cell suspensions were stained at 4°C during 20 minutes according to manufacturer's recommendations using the following directly labeled mAbs: APCH7-anti-

CD14 (560180, BD Pharmingen), PERCP-eFluor710-anti-human CD19 (J3129, ebioscience), vioblue-anti-human HLA-DR (130095293, Miltenyi), BV650-anti-human CD3 (UCHT1, BD Horizon), PE-anti-human CD56 (A07788, Beckman Coulter), APC-anti-human CD15 (130091371, Miltenyi), PE-anti-human CD207 (PN IM3577, Beckman Coulter), PE-anti-human CD209 (12-2099-73, ebioscience), PC7-anti-mouse Ly6C (560593, BD Pharmingen), AF700-anti-mouse CD11b (56-0112-82, ebioscience), PE-anti-mouse Ly6G (551461, BD Pharmingen), APC-anti-mouse CD11c (550261, BD Pharmingen), APC-eFluor780-anti-mouse CD19 (47-0193-80, affymetrix ebioscience), v500-anti-mouse IA/IE (562366, BD Horizon), FITC-anti-mouse CD3 (553062, BD Pharmingen) and FITC-anti-mouse NKp46 (560756, BD Pharmingen). For analysis of E7RAHYNIVTF/H-2 Db complex expression, PE-dextramers (JA 2195, Immudex) were used. After washes, cells were analyzed using an LSRII (Becton Dickinson, USA) and raw data were analyzed with FlowJo software (FlowJo LLC, USA).

EliSpot assays. E7-specific IFN- γ production by splenocytes of immunized mice was determined in a standard murine ELISPOT assay (Mabtech, Sweden) as described previously (17). Briefly, splenocytes (5×10^5 cells per well) were stimulated for 48 hours with a 5 μ g/ml concentration of H-2b-restricted immunodominant HPV-16 E7 peptides (49-57; AnaSpec,

Canada). Spots were counted with an AID ELISPOT reader (ELR03; AID Autoimmun Diagnostika, Germany). Results, expressed as spot-forming units (SFU) per 10⁶ cells, represent the mean \pm SEM of triplicates.

RT-qPCR analysis. RNA was extracted from tissues following ReliPrep RNA Tissue Miniprep system (Z6112, Promega), and then retrotranscribed into cDNA using GoScript Reverse Transcription system (A5000, Promega). Sybergreen RT-qPCR was performed by the iGenSeq platform (Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France) using the primers described in Table 1. Results were analyzed with the 1536 Lightcycler software (Roche, Basel, Suisse). Quantification of gene expression was determined by the comparative $\Delta\Delta$ Ct method. The mRNA expression was normalized to β -actin and GAPDH (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) housekeeping genes references.

Immunohistochemistry and microscopy. OCT frozen tissues (skin samples and lymph nodes) were cut into 6 nm-thick cryosections and stained either by routine hematoxylin-eosin coloration or by immunohistochemistry staining as described: tissues were first saturated with 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) during 30 minutes. Rat anti-CD169 antibody

(ab53443, Abcam) was then incubated 1 hour, followed by secondary AF647-anti-rat (112605003, Jackson ImmunoResearch) staining during 1 hour. Finally, nuclei were stained with Hoechst coloration (Invitrogen). Slides were analyzed with a 20X microscope (AZ100, Nikon) or a confocal microscope (SP2, Leica). Cyto-centrifugation of dendritic cells was performed with 100 μ L of a suspension of 5.106 cells/mL centrifuged onto cytopsin slides in a cytocentrifuge (Cytospin 3, Shandon). Cytospin preparations were stained with Hoechst coloration (Invitrogen) and slides were analyzed with an epifluorescence microscope (DMI 6000B, Leica).

Statistical analysis. Student t-test or one-way ANOVA with Tukey's correction was used for normally distributed data. Kaplan-Meier log-rank analysis was used to evaluate the survival differences between groups. Statistical analysis was conducted using Prism 6.0 software (GraphPad). Only p values < 0.05 were considered as significant. Results are presented as mean \pm SEM of n separate experiments.

Results:

TriMN-LPR exerts a better efficacy than MN-LPR to fixate C-type lectin-expressing cells, resulting in effective mRNA antigen delivery.

The structure of triMN-LPR is more similar to C-type lectin natural ligands than original MN-LPR (13). For such a reason, we first studied the ability of triMN-LPR to fixate cells expressing or not C-type lectins such as DC-SIGN (CD209) or Langerin (CD207), by comparison to MN-LPR. Thus, FITC-labeled MN- and triMN-LPR were mixed at different concentrations with 293T cells or 293T-DC-SIGN cells. For LPR concentrations ranged from 0.6-2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, significantly higher percentages of fluorescent-positive cells were observed when 293T-DC-SIGN cells were mixed with triMN-LPR, as compared to other conditions (Figure 1A right panel). Because the percentage of fluorescent-positive cells also increased in a concentration-dependent manner whatever the expression of DC-SIGN and/or of the degree of LPR mannosylation, a binding mechanism independent of DC-SIGN should be evoked. By using LPR at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the percentage of fluorescent-positive 293T-DC-SIGN cells were equally high using MN or triMN-LPR but still remained significantly higher than percentages observed using 293T cells. This suggests that the expression of DC-SIGN by 293T cells gives a binding advantage over 293T cells for both MN- and triMN-LPR at this concentration. By measuring the mean fluorescence intensity (MFI) that indirectly reflects the number of fluorescent LPR molecules attached to the cells, we confirmed that triMN-LPR better and more specifically fixate 293T-DC-SIGN cells in a concentration-dependent manner (Figure 1A left panel). Langerin, another C-type lectin expressed by Langerhans cells, is also known

to bind mannose residues (18). For such a reason we transiently transfected 293T cells with a plasmid encoding the human langerin, and we tested the ability of FITC-labeled MN- and triMN-LPR used at 5 μ g/mL to fixate 293T cells expressing or not langerin. Figure 1B left panel shows a representative FACS analysis of langerin-transfected 293T cells. Analysis of langerin+ and langerin- 293T cells indicate that triMN-LPR significantly better fixate langerin+ 293T cells as compared to other conditions both regarding percentages and MFI (Figure 1B middle and right panels). These data indicate that the tri-mannosylated formulation of LPR conferred them the advantage to target C-type lectins expressing cells.

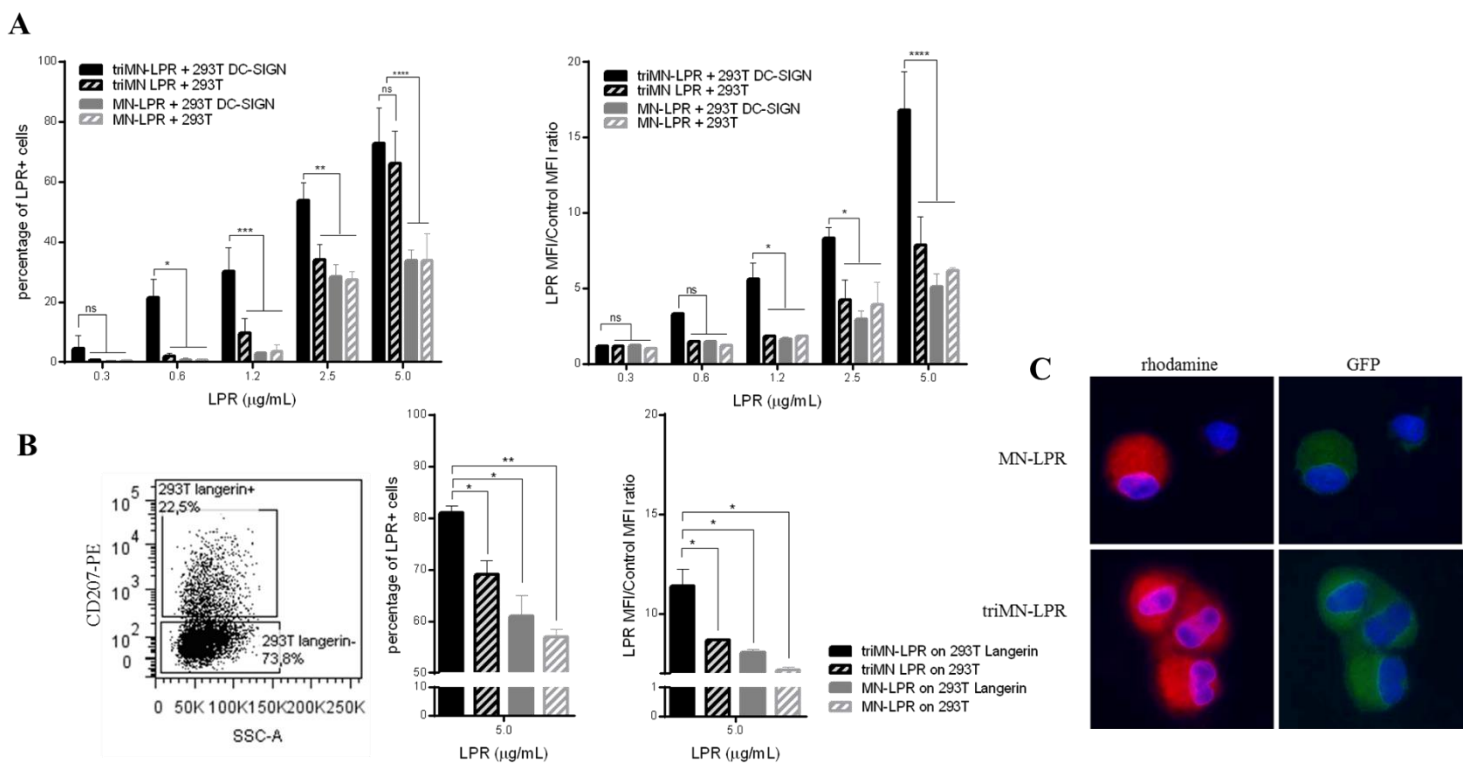


Figure 1: Fixation of mannosylated LPR on C-type lectins expressing cells (A and B), and antigen delivery (C). FITC-labeled MN-LPR or triMN-LPR were incubated at different concentrations with **A:** 293T cells stably expressing or not the human DC-SIGN lectin (data from 5 independent experiments) or **B:** 293T cells transiently expressing the human langerin lectin (data from 2 independent experiments). A representative FACS analysis showing the expression of the human langerin by transfected 293T cells is presented. The fixation of MN-LPR and triMN-LPR, based on FITC fluorescence, was analyzed by flow cytometry 3 hours after LPR incubation on 293T DC-SIGN⁺ cells, 293T Langerin⁺ cells, 293T Langerin⁻ cells, and unmanipulated 293T cells as a negative control. Results, expressed as Mean \pm SEM of different independent experiments, represent percentages of FITC-positive cells and Mean Fluorescence Intensity (MFI) ratio (MFI of cells incubated with LPR divided by MFI of cells incubated with PBS). Statistical analysis was performed using a 2-way ANOVA: ns = non-statistically significant, $p > 0.05$; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$. **C:** Antigen delivery after LPR fixation: 293T DC-SIGN cells were incubated with rhodamine-labeled MN- or triMN-LPR carrying the GFP mRNA. Six hours later, nuclei were stained with Hoechst coloration, and GFP and rhodamine fluorescence were detected using an epifluorescent microscope. Percentages of rhodamine⁺ GFP⁺ cells were estimated by counting at least 200 cells. Representative photographs of rhodamine⁺ and GFP⁺ cells are shown.

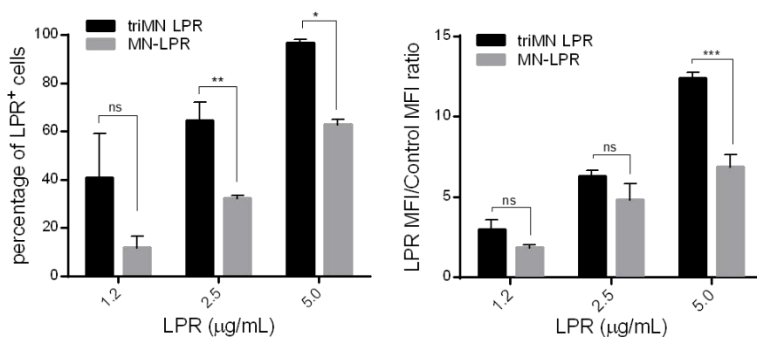
To ensure the ability of mannosylated LPR to deliver mRNA antigen after fixation, we incubated 293T-DC-SIGN cells with rhodamine-labeled MN- or triMN-LPR carrying the GFP mRNA, LPR being used at a concentration of 5 μ g/mL. Six hours later, nuclei were stained with Hoechst coloration and GFP and rhodamine fluorescence were analyzed by epifluorescent microscope. Higher percentages of rhodamine-positive 293T-DC-SIGN cells were observed when 293T-DC-SIGN cells were incubated with triMN-LPR, as compared to MN-LPR (Figure 1C, left panels). Interestingly, GFP fluorescence (green) can be observed in all rhodamine-labeled cells (Figure 1 C, right panels). These data confirm the better fixation

of triMN-LPR on 293T-DC-SIGN, and furthermore indicate that the antigen mRNA is correctly translocated in the cytosol, and then translated into protein after LPR fixation.

Advantage of triMN-LPR to better fixate in vitro and in vivo murine dendritic cells.

In a first set of experiments, we studied the ability of MN- and tri-MN-LPR to fixate in vitro murine dendritic cells. Thus, we incubated FITC-labeled MN- and triMN-LPR at different concentrations with DC 2.4 cells, a murine dendritic cell line known to express different C-type lectins such as DEC 205 and the mannose receptor (P. Midoux personal data). Fixation analyzed by flow cytometry shows that triMN-LPR significantly better fixate onto DC 2.4 cells than MN-LPR in a concentration-dependent manner (Figure 2A, left panel). This was also further confirmed in term of MFI at high LPR concentrations (Figure 2A, right panel).

A



98

B

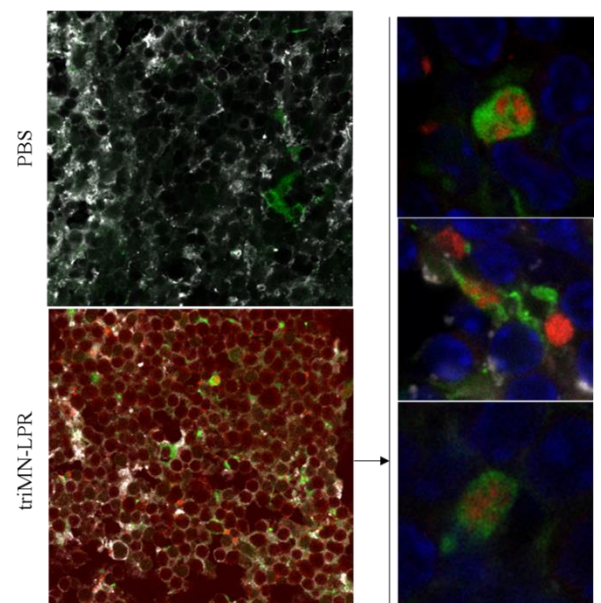


Figure 2: In vitro (A) and in vivo (B) fixation of mannosylated LPR on murine dendritic cells. **A:** FITC-labeled formulations of MN-LPR (■) and triMN-LPR (■) were incubated with DC 2.4 murine dendritic cells at indicated concentrations for 3 hours. Then, fixation of FITC-labeled LPR was analyzed by flow cytometry. Results, expressed as Mean \pm SEM of 3 independent experiments, represent percentages of FITC-positive cells and MFI ratio (MFI of cells incubated with LPR divided by MFI of cells incubated with PBS). Statistical analysis was performed using a 2-way ANOVA: ns = non-statistically significant, $p > 0.05$; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$. **B:** C57BL/6 YFP-CD11c transgenic mice were intradermally injected with PBS or rhodamine-labeled triMN-LPR. Mice were euthanized 36 hours after the injection. Draining lymph nodes were collected, and OCT frozen tissue sections were prepared for immunohistochemistry. Subcapsular macrophages were stained with CD169 mAbs and a secondary AF647 mAbs, and nuclei were stained with Hoechst coloration. Slides were analyzed by confocal microscopy at 20X magnification: CD169 cells (gray), CD11c-YFP cells (green), Nuclei (blue) and LPR (red). Right panels show representative co-localizations of triMN-LPR (Red) on CD11c-YFP cells (green) at x150 magnification.

In a second set of experiments, we evaluated the in vivo targeting of DCs by trimannosylated LPR. For this purpose, YFP-CD11c transgenic mice were ID immunized with rhodamine-labeled triMN-LPR. Thirty-six hours later, mice were euthanized and frozen sections from draining lymph nodes were analyzed by immunofluorescence after CD169 staining. The ID route for immunization was chosen according to preliminary data indicating that LPR immunization using the ID route gave better antigen-specific immune response than using the SC or IV route consuming even less amount of RNA (see supplemental Figure S1). Histological examination of draining lymph nodes indicates that triMN-LPR can reached the subcapsular area, characterized by the presence of resident CD169+ macrophages (19), 36 hours only after injection (Figure 2B, lower left panel). Furthermore, we could observe at

higher magnification that triMN-LPR co-localized in vivo with CD11c-YFP+ CD169- dendritic cells (Figure 2B, right panels). These data demonstrate the ability of triMN-LPR to reach draining lymph nodes and to be captured by APCs in vivo after ID immunization.

TriMN-LPR immunizations induce local inflammatory reaction resulting in a higher recruitment of lymph node DCs and a better antigen-specific systemic response than MN-LPR.

In order of using mannosylated LPR as vaccine candidates, C57BL6 mice were immunized with 7 μ g of E7-coding MN- or triMN-LPR at day 0, 2 and 9, and then monitored for local and systemic immune response.

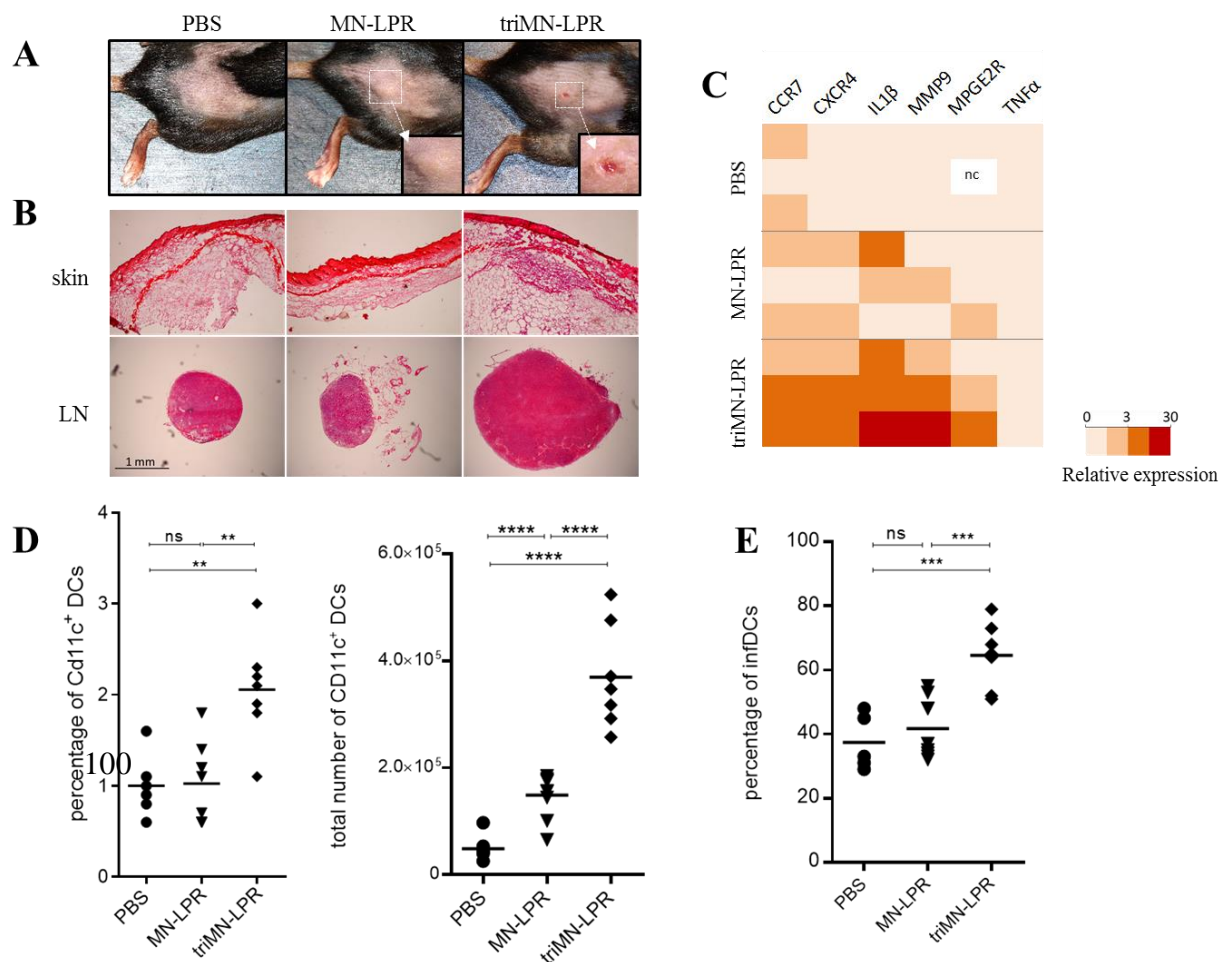


Figure 3: TriMN-LPR immunizations induce local inflammatory reactions. C57BL/6 mice were intradermally injected at day 0, day 2 and day 9 with PBS, MN-LPR or triMN-LPR, both containing E7-coding mRNA. **A:** Macroscopic local reactions on the skin of mice (3 mice per group) euthanized 2 days after injection; **B:** Analysis of skin (upper panels) and draining lymph nodes (lower panels) after hematoxylin and eosin coloration using a 20X microscope, tissues being collected from euthanized mice 2 days after injection. A representative out of 3 separate experiments is shown. **C:** RT-qPCR analysis performed on skin and lymph nodes collected from mice 14 days after immunizations. Quantification of gene expression was determined by the comparative $\Delta\Delta C_t$ method. The mRNA expression was normalized to β -actin and GAPDH genes used as endogenous housekeeping reference genes. Results, obtained from 3 mice per group, are presented in term of relative gene expression reported to gene expression average in PBS-injected mice. **D** and **E:** Analysis by flow cytometry of CD11c+ DCs (A) and inflammatory Ly6c+ DCs (B). Cell suspensions were obtained from draining lymph nodes collected from mice, 14 days after injections of PBS (●), MN-LPR (▼) or Tri-MN LPR (◆). Data were generated from 5 to 7 mice per group. Statistical analysis was performed using the Student t-test: ns = non-statistically significant, $p > 0.05$; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$; **** = $p < 0.0001$.

To our surprise, MN and triMN-LPR vaccinations resulted in a macroscopic induration at the vaccination' sites. However, triMN-LPR induces largest and ulcerative lesions in ~50% of mice (n=20), as soon as 24 hours after the first injection (Figure 3A, middle and right panel). To better analyze this reaction, mice were euthanized to collect skin and draining lymph nodes. Tissues were stained with hematoxylin and eosin and analyzed with a 20X microscope 2 days after immunization. A dermal infiltration by inflammatory cells was observed when mice were immunized with triMN-LPR (Figure 3B, upper right panel). This local inflammatory reaction was associated with a lymph node enlargement (Figure 3B, lower right panel). Macroscopic inflammatory reactions were not found in mice immunized with MN-LPR or receiving PBS. RT-qPCR performed onto skin samples showed

a significant increase of CCR7 and CXCR4 transcripts (Figure 3C), these chemokine' receptors being known to be associated with the migration of dendritic cells from the skin to draining lymph nodes (20,21). RT-qPCR analysis also revealed an up-regulation of MMP9, IL1 β and PGE2R genes, which are involved in inflammatory responses (22–24). FACS analysis of cell suspensions obtained from draining lymph nodes 14 days after LPR immunizations showed that triMN-LPR immunizations led to a significant increase and recruitment of CD11c⁺ DCs, as compared to MN-LPR or PBS (Figure 3D). More particularly, we focused on inflammatory monocyte-derived DCs (Mo-DCs), which have been described by Beatriz León et al. as Ly6c⁺ CD11c⁺ CD11b⁺ dendritic cells (25). These Mo-DCs included DCs derived from dermal monocytes and from monocytes recruited by the lymph nodes, and are induced by inflammatory responses. Interestingly, only triMN-LPR immunizations were able to significantly induce the recruitment of inflammatory Mo-DCs in draining lymph nodes (Figure 3E). Our findings, observed by using LPR containing either E7 RNA or non-coding ssPolyU, strongly suggest that triMN-LPR exerts, by themselves, an adjuvant effect.

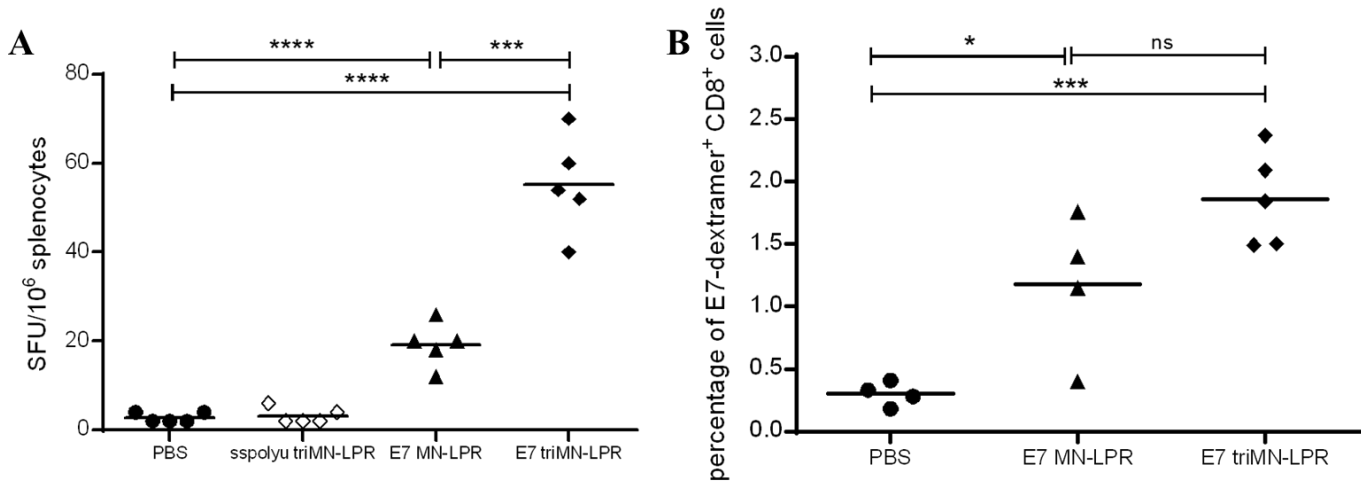


Figure 4: Analysis of antigen-specific immune responses after LPR vaccinations. C57BL/6 mice (4-5 mice per group) were intradermally vaccinated at day 0, day 2 and day 9 with PBS (●), MN-LPR (▼) or Tri-MN LPR (◆) containing E7 coding mRNA. At day 14, mice were euthanized and splenocytes were isolated. E7-specific immune response was measured on splenocytes **A**: by IFN γ -ELISpot after restimulation with E7 peptide and **B**: by flow-cytometry using E7 dextramers. Statistical analysis was performed using the Student t-test: ns = non-statistically significant, $p > 0.05$; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$; **** = $p < 0.0001$.

When considering the systemic immune response analyzed by IFN γ EliSpot assay on splenocytes, an E7-specific immune response was measured after both MN- and triMN-LPR immunization, albeit significantly much higher using triMN-LPR (Figure 4A). Cytometric analysis using E7-dextramers confirmed these results by showing significant higher percentages of E7-specific CD8 T cells in the spleen of mice immunized with triMN-LPR (Figure 4B).

Used as a therapeutic vaccine, triMN-LPR induce antitumoral responses in different tumor models.

To investigate the therapeutic effect of LPR, we vaccinated mice bearing TC1 tumors with non-coding ssPolyU or E7-coding MN- or triMN-LPR. Vaccinations were performed at day 7 and 9 after TC1 inoculation. Results showed that E7-coding triMN-LPR was the most efficient formulation for inducing a therapeutic anti-tumor response (Figure 5A-E) with a significant long-term survival rate of 55%, as compared to the E7-coding MN-LPR formulation (Figure 5F). Interestingly, non-coding ssPolyU triMN-LPR were also able to induce a therapeutic anti-tumor response with a survival rate of 30%. By comparison, non-coding ssPolyU MN-LPR had no therapeutic effect. This non-antigen specific tumor response might be explained by the inflammatory effects observed when mice are vaccinated by using triMN-LPR (see Figure 3).

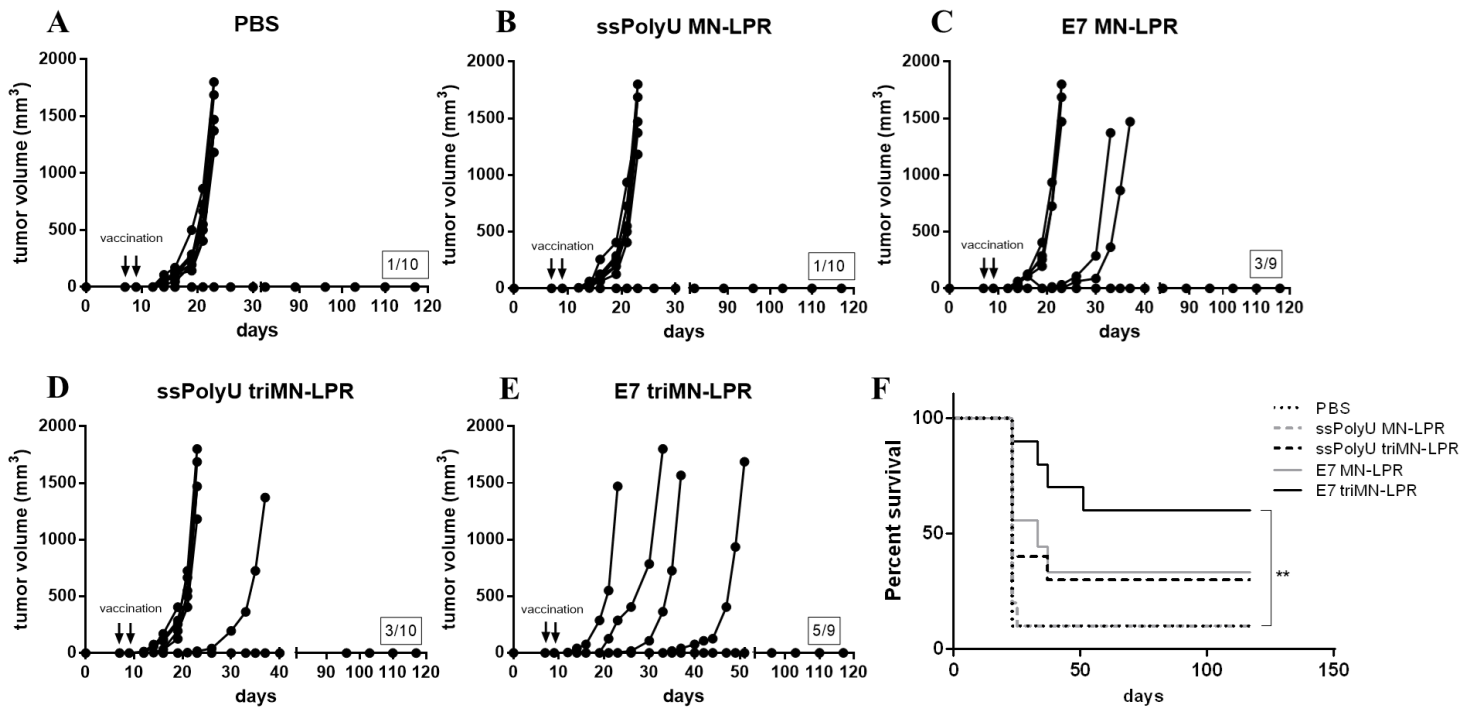


Figure 5: Anti-tumor effect of E7 mannoseylated LPR vaccinations using TC1 tumor model. C57BL/6 mice were subcutaneously injected on the back with 105 TC1 tumor cells, and vaccinated at day 7 and 9 after cells injection with PBS (A); MN-LPR containing non-coding ssPolyU RNA (ssPolyU MN-LPR) (B); MN-LPR containing E7-mRNA (E7 MN-LPR) (C); triMN-LPR containing non-coding ssPolyU RNA (ssPolyU triMN-LPR) (D); triMN-LPR containing E7-mRNA (E7 triMN-LPR) (E). Tumor development was monitored every two days. Results that represent the development of TC1 tumors were pooled from at least 2 separate experiments for a total number of 9-10 mice per group as indicated. F: Kaplan-Meier survival curve. Statistical analysis between each group of mice was performed using log-rank test: ns = non-statistically significant, $p > 0.05$; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

To confirm the benefit of triMN-LPR as a therapeutic vaccine, two other tumor models were tested: the melanoma model of MART1-expressing B16F0 cells, and the lymphoma model of OVA-expressing EG7 cells. Thus, mice bearing B16F0 tumors or EG7 tumors were vaccinated using either MART1 or OVA-coding triMN-LPR, or MART1 or

OVA-coding MN-LPR, or PBS. Results (Figure 6) showed that only MART1 and OVA-coding triMN-LPR trigger a significant delay in B16F0 and EG7 tumor growth, respectively. Thus, all these results allow us to consider that triMN-LPR would be an interesting strategy for anti-cancer vaccine therapies.

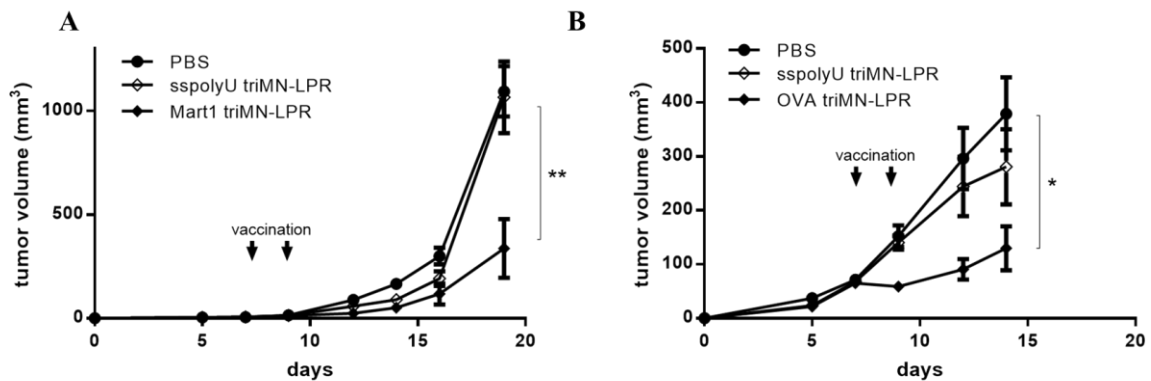


Figure 6: TriMN-LPR therapeutic vaccinations induce an early antitumoral effect in both MART1-B16F10 (A) and EG7-OVA (B) tumor models. C57BL/6 mice (n=10 per group) were subcutaneously injected on the back with (A): MART1 expressing B16F0 tumor cells (105 cells per mice) or (B): OVA-expressing EG7 tumor cells (106 cells per mice). Mice were vaccinated at day 7 and 9 after cell injection with PBS (●), ssPolyU triMN-LPR (◇) or triMN-LPR containing MART1 or OVA mRNA (◆). Tumor development was monitored every two days. Results represent the development of MART1-B16F10 (A) and EG7-OVA (B) tumors. Statistical analysis between each group of mice was performed using a log-rank test: ns = non-statistically significant, $p > 0.05$; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

Selective advantage of triMN-LPR to bind human dendritic cells, and to deliver an effective coding mRNA.

In order to demonstrate that triMN-LPR may have an advantage over MN-LPR to better fixate human antigen presenting cells and/or DCs, FITC-labeled MN- and triMN-LPR were co-cultured with human PBMCs for 3 hours. Then, the degree of fixation in term of percentages of FITC-positive cells within different gated cell subsets were analyzed by FACS. We first observed that monocytes and B cells as antigen presenting cells better fixate both triMN- and MN-LPR, with a slight advantage, but non-significant, for triMN-LPR, while other blood subsets likewise granulocytes, NK and T cells did almost not bind LPR (Figure 7A, left panel). Furthermore, we evaluated the fixation of LPR onto blood DCs defined as lineage-negative, HLA-DR⁺ cells. While blood DCs represent a very small population among other PBMC, we found that triMN-LPR significantly better fixates blood DCs than MN-LPR (Figure 7A, right panel).

In another set of experiments, human Mo-DCs were generated and also tested for their ability to bind mannosylated LPR. As shown in figure 7B, triMN-LPR significantly better fixates Mo-DCs than MN-LPR.

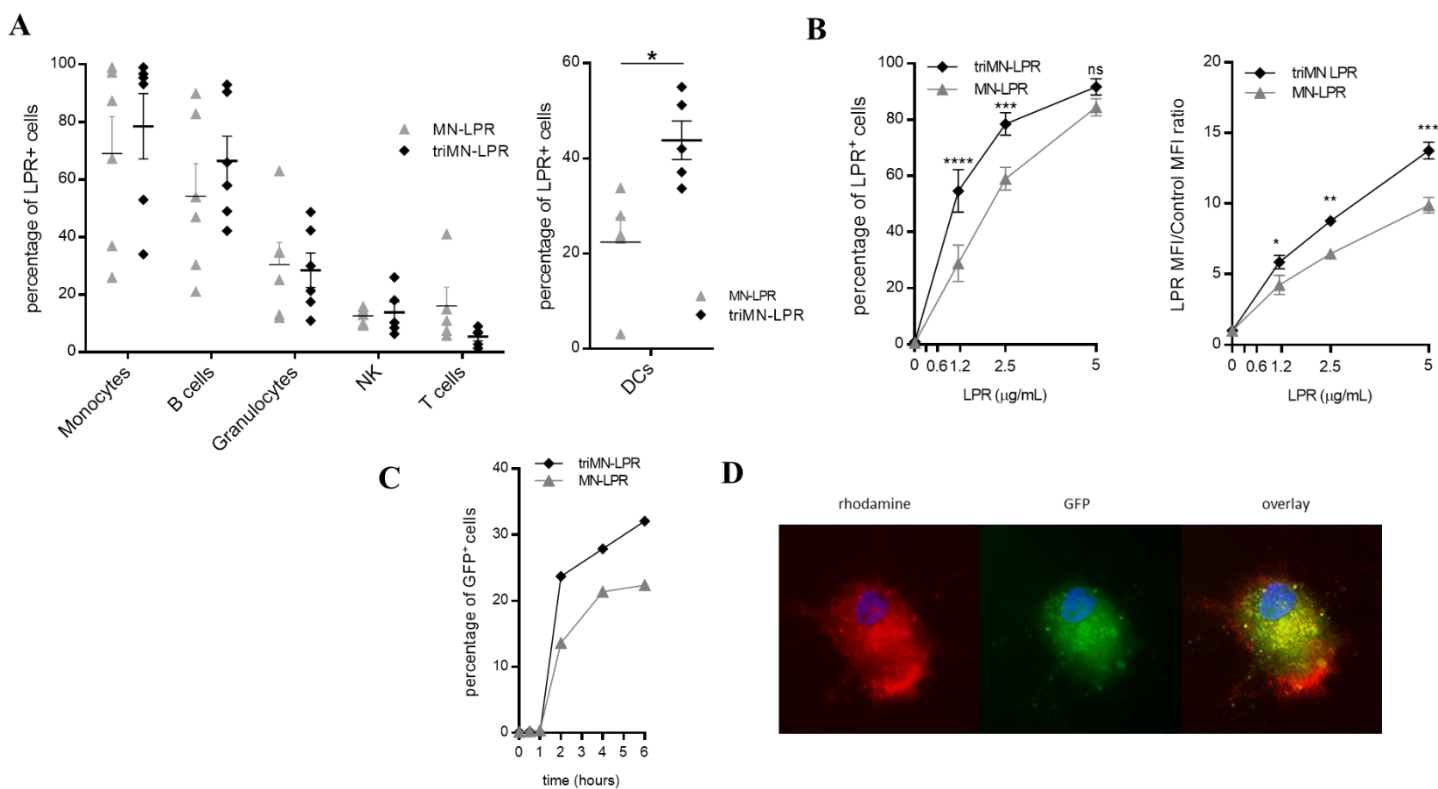


Figure 7: Fixation of mannosylated LPR on human blood cells (A), human dendritic cells (B), and antigen delivery (C, D). FITC-labeled MN- (▲) and triMN-LPR (◆) were incubated with **A**: human PBMCs (six independent experiments) at 2.5 µg/mL or **B**: human monocytes derived dendritic cells (Mo-DCs) at different concentrations (three independent experiments). The fixation of MN-LPR and triMN-LPR, based on FITC fluorescence, was analyzed by flow cytometry 3 hours after LPR incubation on **(A)** different blood subsets i.e monocytes (CD14+ cells), B cells (CD19+ cells), granulocytes (CD15+ cells) NK cells (CD3-CD56+ cells), T cells (CD3+ cells), and blood DCs (Lin-negative, HLA-DR+ cells), and on **(B)** Mo-DCs. Results, expressed as Mean ± SEM of different independent experiments, represent percentages of FITC-positive cells, and also for Mo-DCs as MFI ratio (MFI of cells incubated with LPR divided by MFI of cells incubated with PBS). Statistical analysis was performed using the Student t-test: ns = non-statistically significant, $p > 0.05$; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$; **** = $p < 0.0001$. **(C, D)**: Antigen (GFP) delivery after LPR fixation. Mo-DCs were incubated with rhodamine-labeled MN- (▲) or triMN-LPR (◆) carrying the GFP mRNA. **(C)** GFP and rhodamine fluorescence were detected at different time points using an epifluorescent microscope. Percentages of rhodamine+ GFP+ cells were estimated by counting at least 200 cells. A representative experiment is shown. **(D)** Representative photographs of rhodamine+ and GFP+ cells are shown (at 3 hours time point), nuclei being stained with Hoechst coloration.

To ensure the ability of triMN-LPR to deliver antigen-coding mRNA to human dendritic cells, Mo-DCs were incubated with rhodamine-labeled triMN-LPR carrying the GFP mRNA. Then, Mo-DCs were monitored by FACS in order to detect GFP-positive cells. As soon as 2 hours following LPR incubation, GFP⁺ cells could be detected with MN-LPR and triMN-LPR. Percentages of GFP⁺ cells increased in a time-dependent manner. As expected, significantly higher percentage of GFP⁺ Mo-DCs were detected by using triMN-LPR (Figure 7C). As illustrated in Figure 7D, triMN-LPR, once fixated onto Mo-DCs (red), are able to correctly translocate mRNA into the cytosol, mRNA being then translated into protein (green).

Our data show that the triMN-LPR have a selective advantage over MN-LPR to fixate human antigen-presenting cells and more particularly DCs and to appropriately deliver antigens to the targeted cells.

Discussion

In this paper, we have described a strategy of vaccination that is based on the use of triMN-LPR. We showed that triMN-LPR vaccination is associated with local inflammatory reactions, can induce antigen-specific CD8 immune responses, and results in therapeutic responses using three different tumor models. Thus, triMN-LPR vaccines appear as a valuable strategy for anti-cancer immunotherapy. Interestingly, the inflammatory reaction observed using triMN-LPR, that we have documented both at molecular and cellular levels, contributes to the therapeutic response, even in the absence of tumor-associated antigen (Figure 3). This strongly indicates that triMN-LPR have intrinsic adjuvant properties. The latter have not been described with other potential vaccines designed to target APCs or DCs such as Shiga toxin B-subunit constructs (26), DC-targeting antibodies constructs (27,28) or other mannosylated liposomes which need to be associated with TLR ligands as adjuvants to be efficient enough (29). Few years ago, Yang et al have developed engineered lentivector (LV) capable of targeting DCs for in vivo immunization (30). For this purpose, the viral glycoprotein from Sindbis virus was engineered to be DC-SIGN-specific. Although Sindbis-engineered LV can induce the maturation of DCs, inflammatory mechanisms were not deeply characterized. Because Sindbis viral glycoproteins are immunogenic, the risk of developing neutralizing antibodies directed against the vector itself (31) due to repeated immunizations cannot be

excluded. This point is crucial for the applicability of cancer vaccines. Thus, liposome-derived vectors such as triMN-LPR that are known to be non-immunogenic (32) let us to considerate them as a very interesting vaccine vector. Because any tumor-associated antigen can be virtually encoded into mRNA, the LPR approach introduced here may be regarded as an universally applicable novel vaccine class of cancer therapy. Importantly, mRNA is not considered by regulatory agencies as a transgenic drug. This makes LPR a very adaptable vaccine vector.

Even if our data showed that the triMN-LPR strategy was efficient to induce both immune and therapeutic response, the therapeutic effects we have obtained could be optimized. For this purpose, the vaccination schedule should be further investigated, but with caution. Indeed, by testing a more intensive vaccine regimen (3 vaccinations at 2-day intervals) using the TC1 tumor model, we unexpectedly observed a dramatic rebound of the tumor growth following the third triMN-LPR vaccinations, suggesting that intensive triMN-LPR vaccinations could induce anergy or activating induced cell death (AICD) on T cells (33). Thus, an appropriate vaccine schedule should be established for triMN-LPR vaccines.

Important recent advances have been made in cancer immunotherapy using immune checkpoint inhibitors (ICIs). Then, it might be interesting to combine ICIs with LPR vaccines. ICIs interact with tumor microenvironment and more particularly with T lymphocytes (34).

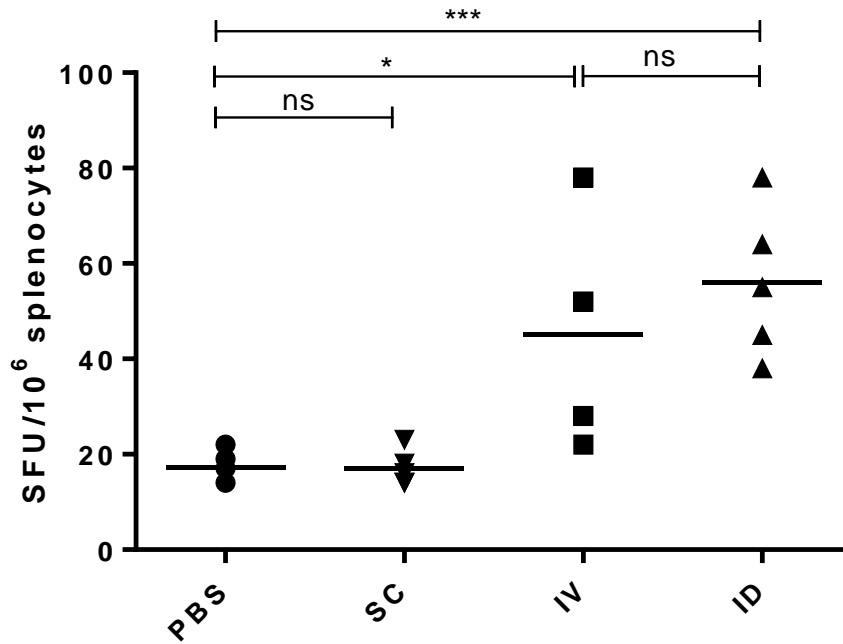
However, almost 70% of cancers do not have any T cells infiltrate, and responses to treatments may heavily depends on the immune contexture(35–37). Taking into account the fact that triMN-LPR vaccination, due to their adjuvants effects, will favor the recruitment of both innate and adaptive immune cells, one can expect that they may potentiate the efficacy of ICIs. Such an hypothesis should be validated using appropriate tumor models. Because LPR components can be also easily produced as clinical grade reagents, one could envision performing clinical trials in a very close future.



Tables

Gene	Primer	Sequence
CCR7	left	ACTCTCCATCCACCGAATTG
	right	CCTCATGTCAACCTGACTGG
CXCR4	left	TCCAGAATGTGTGGTAAATTGAA
	right	TCGGAATGAAGAGATTATGCAG
IL1 β	left	AGTTGACGGACCCCAAAG
	right	AGCTGGATGCTCTCATCAGG
MMP9	left	CCAGAGGTAACCCACGTCAG
	right	CTTCAAGTCGAATCTCCAGACA
PGE2R1	left	TGGCTTCATATTCAAGAAACCAG
	right	GGTACACGCGTGACTTTCG
TNF	left	TTGTCTTAATAACGCTGATTTGGT
	right	GGGAGCAGAGGTTCAGTGAT
β actin	left	AAGTCCCTCACCTCCCAAAAG
	right	AAGCAATGCTGTACCTTCCC
GAPDH	left	GTATTGGGCGCCTGGTCACC
	right	CGCTCCTGGAAGATGGTGATGG

Table 1: primers used for Sybergreen RT-qPCR analysis



Supplementary Figure 1: Analysis of antigen-specific immune responses after LPR immunizations using different vaccination routes

C57BL/6 mice (5 mice per group) were immunized at day 0, day 7 and day 14 with MN-LPR containing E7 mRNA injected either intravenously (IV), subcutaneously (SC, or intradermally (ID). For the IV route, MN-LPR containing 21 μ g of E7 RNA were injected; for the SC and ID routes, MN-LPR containing 7 μ g of E7 RNA were injected. As negative control, mice received PBS injected ID. At day 21, mice were euthanized and splenocytes were isolated. Antigen-specific T-cell response was measured by IFN γ -ELISpot after stimulating splenocytes with E7 peptide. Statistical analysis was performed using the Student

t-test: ns = non-statistically significant, $p > 0.05$; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$;

**** = $p < 0.0001$.

References

1. Karaki S, Anson M, Tran T, Giusti D, Blanc C, Oudard S, et al. Is There Still Room for Cancer Vaccines at the Era of Checkpoint Inhibitors. *Vaccines*. 2016;4:37.
2. Sabado RL, Balan S, Bhardwaj N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res*. 2017;27:74–95.
3. Vulink A, Radford KJ, Melief C, Hart DNJ. Dendritic Cells in Cancer Immunotherapy. *Adv Cancer Res* [Internet]. Elsevier; 2008 [cited 2017 Jan 16]. page 363–407. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065230X07990065>
4. Palucka K, Banchereau J. Human dendritic cell subsets in vaccination. *Curr Opin Immunol*. 2013;25:396–402.
5. Palucka K, Banchereau J, Mellman I. Designing Vaccines Based on Biology of Human Dendritic Cell Subsets. *Immunity*. 2010;33:464–78.

6. Shortman K, Lahoud MH, Caminschi I. Improving vaccines by targeting antigens to dendritic cells. *Exp Mol Med*. 2009;41:61–6.
7. Steinman RM, Pope M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *J Clin Invest*. 2002;109:1519–26.
8. Hoving JC, Wilson GJ, Brown GD. Signalling C-Type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell Microbiol*. 2014;16:185–94.
9. Sancho D, Reis e Sousa C. Signaling by Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Homeostasis. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:491–529.
10. Weide B, Garbe C, Rammensee H-G, Pascolo S. Plasmid DNA- and messenger RNA-based anti-cancer vaccination. *Immunol Lett*. 2008;115:33–42.
11. Rittig SM, Haentschel M, Weimer KJ, Heine A, Muller MR, Brugger W, et al. Intradermal vaccinations with RNA coding for TAA generate CD8+ and CD4+ immune responses and induce clinical benefit in vaccinated patients. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2011;19:990–9.

12. Weide B, Pascolo S, Scheel B, Derhovanessian E, Pflugfelder A, Eigentler TK, et al. Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. 2009;32:498–507.
13. Perche F, Benvegno T, Berchel M, Lebegue L, Pichon C, Jaffrès P-A, et al. Enhancement of dendritic cells transfection in vivo and of vaccination against B16F10 melanoma with mannosylated histidylated lipopolyplexes loaded with tumor antigen messenger RNA. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2011;7:445–53.
14. Barbeau J, Lemiègre L, Quelen A, Malard V, Gao H, Gonçalves C, et al. Synthesis of a trimannosylated-equipped archaeal diether lipid for the development of novel glycoliposomes. *Carbohydr Res*. 2016;435:142–148.
15. Lescaille G, Pitoiset F, Macedo R, Baillou C, Huret C, Klatzmann D, et al. Efficacy of DNA Vaccines Forming E7 Recombinant Retroviral Virus-Like Particles for the Treatment of Human Papillomavirus-Induced Cancers. *Hum Gene Ther*. 2013;24:533–44.
16. Dupuy FP, Mouly E, Mesel-Lemoine M, Morel C, Abriol J, Cherai M, et al. Lentiviral transduction of human hematopoietic cells by HIV-1- and SIV-based vectors containing a bicistronic cassette driven by various internal promoters. *J Gene Med*. 2005;7:1158–71.

17. Macedo R, Rochefort J, Guillot-Delost M, Tanaka K, Le Moignic A, Noizat C, et al. Intra-cheek immunization as a novel vaccination route for therapeutic vaccines of head and neck squamous cell carcinomas using plasmid virus-like particles. *OncoImmunology*. 2016;5:e1164363.
18. Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity*. 2000;12:71–81.
19. van den Berg TK, Brevé JJ, Damoiseaux JG, Döpp EA, Kelm S, Crocker PR, et al. Sialoadhesin on macrophages: its identification as a lymphocyte adhesion molecule. *J Exp Med*. 1992;176:647–55.
20. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*. 1999;99:23–33.
21. Kabashima K, Shiraishi N, Sugita K, Mori T, Onoue A, Kobayashi M, et al. CXCL12-CXCR4 Engagement Is Required for Migration of Cutaneous Dendritic Cells. *Am J Pathol*. 2007;171:1249–57.

22. Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:617–29.
23. Ren K, Torres R. Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *Brain Res Rev.* 2009;60:57–64.
24. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:986–1000.
25. León B, López-Bravo M, Ardavín C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity.* 2007;26:519–31.
26. Vingert B, Adotevi O, Patin D, Jung S, Shrikant P, Freyburger L, et al. The Shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity. *Eur J Immunol.* 2006;36:1124–35.
27. Caminschi I, Maraskovsky E, Heath WR. Targeting Dendritic Cells in vivo for Cancer Therapy. *Front Immunol* [Internet]. 2012 [cited 2015 Jun 26];3. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00013/abstract>

28. He L-Z, Weidlick J, Sisson C, Marsh HC, Keler T. Toll-like receptor agonists shape the immune responses to a mannose receptor-targeted cancer vaccine. *Cell Mol Immunol.* 2015;12:719–28.
29. Thomann J-S, Heurtault B, Weidner S, Brayé M, Beyrath J, Fournel S, et al. Antitumor activity of liposomal ErbB2/HER2 epitope peptide-based vaccine constructs incorporating TLR agonists and mannose receptor targeting. *Biomaterials.* 2011;32:4574–83.
30. Yang L, Yang H, Rideout K, Cho T, Joo KI, Ziegler L, et al. Engineered lentivector targeting of dendritic cells for in vivo immunization. *Nat Biotechnol.* 2008;26:326–34.
31. Larocca C, Schlom J. Viral Vector –based Therapeutic Cancer Vaccines. *Cancer J Sudbury Mass.* 2011;17:359–71.
32. Tros de Ilarduya C, Sun Y, Düzgüneş N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 2010;40:159–70.
33. Hailemichael Y, Dai Z, Jaffarad N, Ye Y, Medina MA, Huang X-F, et al. Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific CD8⁺ T cell sequestration, dysfunction and deletion. *Nat Med.* 2013;19:465–72.

34. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:252–64.
35. Becht E, Giraldo NA, Dieu-Nosjean M-C, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Cancer immune contexture and immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2016;39:7–13.
36. Salmon H, Idoyaga J, Rahman A, Leboeuf M, Remark R, Jordan S, et al. Expansion and Activation of CD103+ Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity*. 2016;44:924–38.
37. Teng MWL, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res*. 2015;75:2139–45.

Discussion

Mon travail de doctorat a permis d'évaluer l'intérêt des LPR selon leur degré de mannosylation pour cibler les cellules présentatrice d'antigènes et induire des réponses immunes et anti-tumorales dans des modèles de tumeurs pré-établies chez la souris. L'ensemble du travail permet d'envisager les LPR mannosylés comme stratégie de vaccination thérapeutique dans le cadre de pathologies cancéreuses.

Dans un premier temps, j'ai d'abord mis en évidence la capacité accrue des LPR trimannosylés à se fixer sur les cellules dendritiques. Cet avantage est observé *in vitro* sur différentes cellules dendritiques, qu'elles soient murines ou humaines, et elle est associée à une plus grande capacité de fixation des LPR trimannosylés sur les cellules exprimant les lectines de type C.

In vivo, j'ai montré que les LPR trimannosylés se fixent sur les cellules dendritiques et permettent l'induction d'une réponse inflammatoire locale, caractérisée par la surexpression de facteurs pro-inflammatoires tels que CCR7, CXCR4, IL1 β et MMP9 au niveau du site d'injection. Cette inflammation locale est associée à un recrutement important de cellules dendritiques, et plus particulièrement de cellules dendritiques inflammatoires, vers le ganglion drainant.

J'ai aussi montré que les LPR vectorisant l'ARNm de E7 comme antigène modèle permettent l'induction d'une réponse immune systémique spécifique d'E7, caractérisée par EliSpot IFN γ et par marquage de dextramères. Cette réponse est quantitativement supérieure pour les LPR trimannosylés.

Enfin, j'ai montré l'efficacité thérapeutique des LPR trimannosylés dans 3 modèles tumoraux différents : le modèle de carcinome TC1, le modèle de mélanome B16 et le modèle de lymphome EG7. Ces résultats sont particulièrement prometteurs, et nous permettent d'envisager l'utilisation des LPR trimannosylés comme nouvelle stratégie thérapeutique dans le cancer.

Quel est, par rapport aux autres stratégies vaccinales, l'avantage des LPR trimannosylés en termes de ciblage des DCs ?

J'ai montré dans ce travail que les LPR trimannosylés possèdent une excellente capacité de ciblage des DCs, comparativement aux LPR monomannosylés. Cette capacité est essentielle dans le cadre de notre stratégie puisque ce sont les DCs qui vont permettre la présentation de l'antigène vectorisé aux lymphocytes T.

Cette capacité à cibler les DCs dans leur globalité, sans se restreindre à une seule sous-population particulière, peut être un avantage par rapport aux autres stratégies de ciblage spécifiques. En effet, les constructions protéiques basées sur l'utilisation d'anticorps anti-lectines de type C, par exemple, sont certes hautement spécifiques de la lectine cible, mais ce ciblage est limité aux sous populations de DCs qui expriment cette lectine.

Dans certains cas, le ciblage d'une seule lectine peut toutefois offrir des résultats intéressants, comme c'est le cas pour les stratégies ciblant XCR1, lectine exprimée par les DCs CLEC9A+ XCR1+, qui sont spécialisées dans la cross-présentation et facilitent l'activation des lymphocytes T CD8, en leur permettant de recevoir plus facilement le signal « help » des lymphocytes T CD4 (Eickhoff et al., 2015). Nous n'avons pas pu démontrer clairement le ciblage de CLEC9A par les LPR trimannosylés mais CLEC9A faisant partie des lectines de type C, il semble important de mieux caractériser la manière dont cette lectine de type C est ciblée par les LPR trimannosylés.

Dans une autre stratégie, Yang *et al.* ont développé un vecteur lentiviral (LV) exprimant une glycoprotéine du virus *Sindbis* afin de cibler les DCs *via* leur récepteur DC-SIGN (Yang et al., 2008). Ce ciblage est tout à fait efficace pour DC-SIGN, mais il ne permet pas de cibler les autres populations de DCs, en particulier les cellules de Langerhans qui ne présentent pas DC-SIGN à leur surface. De plus, l'utilisation *in vivo* de particules lentivirales avec une glycoprotéine d'enveloppe virale telle que *Sindbis* risque d'entraîner l'apparition d'anticorps neutralisants après plusieurs injections du fait de l'immunogénicité de l'enveloppe (Larocca and Schlom, 2011). La possibilité de réaliser des injections répétées est pourtant un aspect

essential de l'applicabilité des vaccins thérapeutiques. De manière intéressante, les liposomes sont connus pour ne pas induire de réponse anticorps dirigé contre le vecteur lui-même (Tros de Ilarduya et al., 2010).

Au vu de toutes ces données, les LPR, et plus particulièrement les LPR trimannosylés, semblent particulièrement adaptés pour une stratégie de ciblage des DCs. Il serait donc pertinent d'aller plus loin encore dans la caractérisation de leurs capacités de ciblage des DCs, en particulier en caractérisant les différentes sous-populations de DCs ciblées ou non par les LPR, en fonction des récepteurs qu'elles expriment.

Quel est, par rapport aux autres stratégies vaccinales, l'avantage des LPR trimannosylés en termes d'induction de réponse immune inflammatoire ?

Il a par ailleurs été montré au cours de ce travail que les LPR trimannosylés permettent l'induction *in vivo* d'une réponse inflammatoire locale, visible sur les images d'immunohistochimie objectivant un recrutement inflammatoire au niveau du derme et un élargissement ganglionnaire. Cette réponse a par ailleurs été caractérisée au niveau cellulaire par le recrutement de DCs inflammatoires au niveau du ganglion drainant, et au niveau transcriptomique par la surexpression des messagers des facteurs pro-inflammatoires CCR7, CXCR4, IL1 β et MMP9 au niveau de la peau. Cette réponse n'est observée qu'avec les LPR trimannosylés, excluant probablement une implication de l'ARNm vectorisé, présent dans les trois types de formulations.

De manière intéressante, les LPR trimannosylés induisent une réponse thérapeutique dans le contexte tumoral TC1, même lorsqu'ils vectorisent un ARN non codant tel le sspolyU (30% de survie). Cette efficacité est plus faible que celle des LPR trimannosylés codant E7 (60% de survie), mais est comparable à celle des LPR monomannosylés codant E7. Elle montre que l'effet adjuvant intrinsèque des LPR trimannosylés est suffisant pour induire une réponse thérapeutique, même en l'absence d'ARN codant l'antigène.

Ces résultats sont à mettre en relation avec les données obtenues récemment par Kranz *et al.* avec des lipopolyplexes à ARNm, basés sur des liposomes non mannosylés. Ces LPR ont montré une capacité d'induction de mécanismes inflammatoires médiés par l'ARNm lui-même (Kranz et al., 2016), ce qui est cohérent avec les études montrant que l'ARNm est reconnu comme un signal de danger par la DCs (Benteyn et al., 2015; Lint et al., 2015). Dans notre modèle, on observe une très faible mobilisation inflammatoire chez les animaux traitées avec des LPR non mannosylés (données non publiées). Par contre, la trimannosylation augmente considérablement la réponse inflammatoire (caractérisée au niveau cellulaire et transcriptomique). Ces résultats montrent que la trimannosylation, telle qu'elle existe dans notre modèle, représente une force importante pour toute stratégie cherchant à mobiliser les DCs dans le but d'induire une réponse immunitaire.

Les travaux de Kranz *et al.* nous permettent donc de valider la capacité fondamentale des lipopolyplexes à ARNm à induire une réponse T spécifique chez l'Homme, mais surtout, ils nous poussent à aller plus loin dans l'évaluation des LPR-triMN, dont on connaît l'avantage qu'ils ont montré par rapport aux LPR non mannosylés, en terme de ciblage mais aussi en terme de qualité de réponse immune obtenue.

Par ailleurs, cette capacité à induire une réponse inflammatoire locale est tout à fait inédite par rapport aux autres stratégies vaccinales élaborées dans le but de cibler les DCs *in vivo*, comme les protéines de fusion (Caminschi and Shortman, 2012; He et al., 2015) ou même les autres liposomes mannosylés (Thomann et al., 2011). Ces stratégies ont en effet besoin d'être associés à des adjuvants pour induire une réponse efficace.

En particulier, la sous-unité B de la toxine Shiga décrite par Vingert *et al.* montre certes une efficacité thérapeutique dépendante des DCs, mais seulement une très faible proportion de ces dernières présentent un phénotype mature après expression de l'OVA (Vingert et al., 2006). Le lentivirus développé par Yang *et al.* et exprimant une glycoprotéine du virus *Sindbis* montre une capacité de maturation des DCs *in vivo*. Cependant, les mécanismes inflammatoires sous-jacents n'ont pas été caractérisés (Yang et al., 2008).

Par rapport à toutes ces stratégies déjà étudiées, les LPR-triMN se placent donc de manière très compétitive puisqu'ils possèdent une excellente capacité de ciblage des DCs, associée à une capacité inédite d'induction d'une réponse inflammatoire locale.

Comment pourrait-on optimiser la réponse thérapeutique ?

Cependant, même si les résultats thérapeutiques obtenus avec les LPR-triMN dans le modèle TC1 sont très encourageants, les effets observés dans les modèles B16 et EG7 restent relativement modestes. Par ailleurs, aucune réponse mémoire n'a pu être observée dans le modèle TC1 près de 6 mois après la première inoculation tumorale, et aucun des animaux n'a survécu à un deuxième challenge tumoral de cellules TC1.

Schéma vaccinal

Pour optimiser la réponse thérapeutique, nous avons d'abord cherché à optimiser la cinétique de vaccination. Nos résultats préliminaires montrant que la vaccination de souris naïves avec 3 injections (J0, J7 et J9) induit une meilleure réponse que celle avec 2 injections (J0 et J7), nous avons donc ajouté une 3^e injection au schéma de vaccination thérapeutique dans le contexte TC1. Malheureusement, alors qu'à J7 (jour de la 3^e injection) les tumeurs des souris vaccinées avec les LPR trimannosylés E7 étaient significativement plus petites, leur volume a considérablement augmenté suite à la 3^e injection, jusqu'à devenir plus important que celui des souris contrôles.

Ce phénomène de progression fulgurante pourrait être dû à une sur-stimulation des lymphocytes spécifiques d'E7, conduisant à leur anergie ou leur mort par AICD (Activation Induced Cell-Death). En effet, il a été montré que la durée et l'intensité de l'activation clonale jouent un rôle dans l'induction de l'anergie. Plus précisément, les lymphocytes T préalablement activés avec des faibles doses d'antigènes sont plus sensibles à une anergie par sur-activation ultérieure (Yamamoto et al., 2007).

Ces données pourraient expliquer la différence de réponse observée entre les souris naïves (pour qui la 3^e injection est bénéfique) et les souris porteuses de tumeurs (pour qui la 3^e

injection est délétère), pour lesquelles les lymphocytes T ont déjà été activés. En effet, l'injection de TC1 induit à elle seule une réponse CD8 (ELISPOT IFN γ) dirigée contre E7 (Macedo et al., 2016). Cette réponse basale peut, par ailleurs, diminuer le seuil du niveau d'antigène à partir duquel les mécanismes d'AICD se mettent en place. Pour surmonter ce problème, la troisième injection pourrait être proposée de façon plus tardive, ou bien associée à des LPR monomannosylés dont les capacités de stimulation de la réponse immunitaire semblent plus faibles, tout cela dans le but de moduler la réponse immune, afin qu'elle soit la plus efficace possible.

Etude de l'effet de la vaccination sur le microenvironnement tumoral

La mise en exergue des différences de réponse immune entre les souris naïves et les souris porteuses de tumeur soulignent à quel point il est essentiel d'étudier la réponse vaccinale dans le contexte tumoral. Pour cela, il serait judicieux de monitorer l'impact de la vaccination LPR sur chacune des composantes cellulaires et moléculaires du microenvironnement tumoral, surtout ceux qui, comme les T CD8, sont connus pour avoir une valeur pronostic importante (Gao et al., 2007b). De plus, cette étude permettrait de mieux caractériser les mécanismes d'action des LPR trimannosylés, en particulier en termes d'activation et de modulation de l'état de maturation des DCs au sein du contexte tumoral.

Choix de l'antigène

Au-delà de l'optimisation de la vaccination, la réponse thérapeutique peut aussi être améliorée en choisissant des antigènes contre lesquels le système immunitaire sera plus apte à répondre, même au sein du microenvironnement tumoral. Les néoantigènes privés, par exemple, répondent parfaitement à cette double exigence de spécificité et d'immunogénicité. Ils sont en effet hautement spécifiques de la tumeur, et sont sélectionnés pour leur immunogénicité par l'identification de lymphocytes T spécifiques dans le sang du patient (Cohen et al., 2015). Ils permettent la mise en place d'immunothérapies personnalisées. Comme indiqué précédemment, un des principaux avantages de la vaccination LPR réside dans sa grande adaptabilité antigénique, puisqu'à priori tous les antigènes doivent pouvoir être transcrits en ARNm, et encapsulés dans les LPR. Il serait donc tout à fait envisageable

d'intégrer à la vaccination LPR des ARNm issus des néoantigènes, isolés lors du séquençage comparatif sur lequel repose l'identification des néoantigènes privés.

Quantité d'antigène disponible

La quantité d'antigène délivrée peut elle aussi permettre d'optimiser la réponse thérapeutique. Dans notre stratégie vaccinale, et pour se placer dans les mêmes conditions que les premiers travaux l'équipe de P. Midoux, l'antigène d'intérêt était toujours associé à un antigène conjugué, qui consistait en l'antigène d'intérêt fusionné avec la séquence signal de la protéine DC-LAMP. Le but de cette conjugaison est d'adresser l'antigène aux endosomes, pour favoriser la cross-présentation antigénique. Toujours pour se placer dans les mêmes conditions que les premiers travaux l'équipe de P. Midoux, qui avait montré que cette association améliorait la réponse préventive obtenue (Perche et al., 2011), ces deux antigènes étaient associés dans un ratio de 1/1. Cependant, l'équilibre entre ces deux formes de l'antigène est supposé pouvoir modifier la qualité de la réponse obtenue et plus précisément l'orientation Th1 ou Th2. En effet, si la forme libre de l'antigène doit plutôt activer la réponse T CD8, la forme conjuguée avec DC-LAMP est supposée initier une réponse T CD4 (Saint-Vis et al., 1998). Afin de mieux caractériser cet effet, et d'optimiser la réponse obtenue, il sera judicieux de définir clairement quel ratio antigène libre/antigène conjugué induit la meilleure réponse cytotoxique possible. Pour définir ce ratio, il faudra, par exemple, utiliser les modèles de souris OTI et OTII, qui permettent le monitoring respectif des réponses T CD8 et T CD4 (Barnden et al., 1998; Clarke et al., 2000; Robertson et al., 2000).

Voies et sites d'injection

La voie et le site d'injection jouent eux aussi un rôle essentiel dans la mise en place de la réponse immunitaire thérapeutique. Ils déterminent entre autres, la nature des populations de DCs ciblées.

J'ai déjà montré que la vaccination par voie intra-dermique permettait une meilleure réponse systémique, ce qui est tout à fait cohérent avec les études récentes appuyant sur le rôle des DCs du derme dans la mise en place de la réponse systémique (Levin et al., 2014). Cependant, une optimisation de la réponse est envisageable en multipliant et en alternant les sites d'injection au sein du même schéma vaccinal, afin de mobiliser un plus grand nombre de DCs, et de limiter la persistance antigénique sur le site d'injection, qui peut orienter le système immunitaire vers une réponse tolérogène (Challa et al., 2016).

Combinaisons thérapeutiques

Une autre optimisation possible de l'efficacité thérapeutique des LPR consiste en son association avec d'autres stratégies d'immunothérapies. Chez l'Homme, les immunothérapies les plus étudiées sont les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires, qui montrent une efficacité clinique dans près de 30% des cancers étudiés (Karaki et al., 2016). Comme décrit dans l'introduction, les inhibiteurs de points de contrôle interagissent avec le microenvironnement tumoral, et particulièrement avec les lymphocytes cytotoxiques, dans le but de les stimuler et/ou de limiter leur inhibition par la tumeur. Cependant, de récents travaux ont montré que près de 70% des cancers humains ne présentent pas ou peu d'infiltrat CD8 (Teng et al., 2015). Dans ce contexte, il semble particulièrement intéressant de coupler la vaccination thérapeutique aux inhibiteurs de checkpoints, puisqu'elle permet d'induire un recrutement inflammatoire qui potentialiserait l'effet des inhibiteurs de *checkpoints*. De plus, il a été montré que la vaccination thérapeutique induit l'expression de PD-1 par les lymphocytes T infiltrant la tumeur (Badoual et al., 2013; Fourcade et al., 2014). Dans ce contexte, c'est l'effet de la vaccination thérapeutique qui serait potentialisé par les inhibiteurs de *checkpoints*.

On voit ici que les inhibiteurs de points de contrôle et la vaccination thérapeutique ont un potentiel de synergie très important, de par leurs mécanismes de fonctionnement. De nombreux travaux précliniques étudient cette combinaison, et rapportent des résultats très encourageants (Kleponis et al., 2015; Madan et al., 2012).

Vu le potentiel d'efficacité montré par la stratégie LPR en tant que vaccination thérapeutique, il serait très intéressant de la coupler à différents inhibiteurs de points de contrôle pour induire la meilleure réponse thérapeutique possible.

En dehors des anti PD-1, PDL-1 et CTLA-4, de nouveaux inhibiteurs de checkpoints sont étudiés comme le récepteur OX40 qui a un impact différent sur les lymphocytes T effecteurs et les lymphocytes T régulateurs (Curti et al., 2013). Cette approche est très complémentaire de la vaccination LPR puisqu'elle potentialiserait la réponse T effectrice induite par les LPR, tout en limitant l'action des lymphocytes T régulateurs. Il serait donc tout à fait pertinent d'étudier l'association de ces deux stratégies.

Il existe très peu d'essais cliniques rapportant l'utilisation d'une combinaison vaccination/inhibiteurs de checkpoints. Une étude pilote étudiant l'association d'une vaccination basée sur la thérapie cellulaire de cellules dendritiques avec le nivolumab administré la veille de la vaccination a montré deux réponses partielles sur sept patients atteints de cancer du pancréas métastatique (Nesselhut et al., 2016). Un essai de phase 2 a justement étudié l'association entre l'ipilimumab et un vaccin cellulaire nommé « TriMixDC-MEL » (MoDCs transfectées avec de l'ARNm de protéine MAGE, de tyrosinase ou de gp100 comme antigène). Les résultats obtenus sont encourageants car l'association des traitements est très bien tolérée.

Par ailleurs, l'association de la stratégie LPR avec les thérapies classiques de chimio- ou radio-thérapie est aussi une perspective à étudier puisqu'il a été montré que ces thérapies permettent l'induction d'une mort immunogénique (Kroemer et al., 2013), qui peut potentialiser l'effet de la vaccination.

Caractérisation de la réponse immunitaire induite sur cellules humaines

L'étude des mécanismes immunitaires mis en œuvre par la vaccination LPR dans les modèles murins ne peut se suffire à elle-même, car les mécanismes propres à l'Homme sont nombreux, et nécessaires à appréhender avant d'envisager un essai clinique.

De manière très préliminaire, nous avons donc cherché à caractériser la réponse immunitaire induite par les LPR sur des cellules humaines. Pour cela, nous avons cultivé des PBMCs préalablement marqués au CFSE en présence de LPR mono- ou tri-mannosylés spécifiques de l'antigène humain MART1 (Fig. 8), et nous les avons maintenus en culture durant 7 jours.

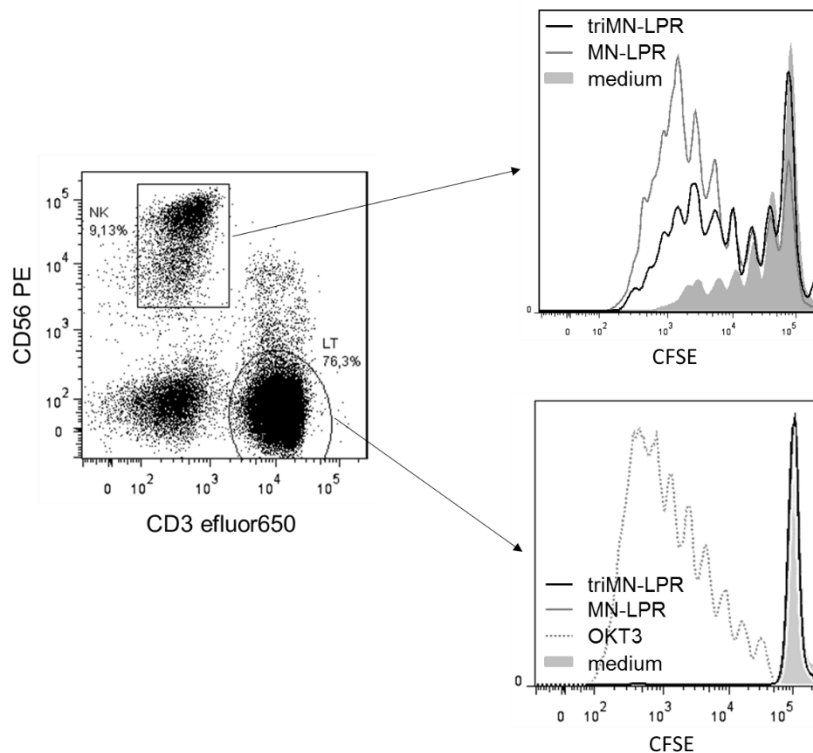


Fig. 8 : prolifération de cellules NK en réponse aux LPR. 10⁷ PBMCs totaux préalablement marqués au CFSE ont été cultivés en présence de LPR MN ou triMN codant pour l'antigène MART1. Après 8 jours de culture, les cellules ont été marquées avec un marqueur de viabilité ainsi qu'avec des anticorps anti CD3, anti CD4, anti CD8 et anti CD56. Les différentes sous-populations ont été analysées en terme de prolifération.

Les résultats obtenus sont surprenants puisqu'ils relèvent une prolifération de cellules NK, et une absence de division de lymphocytes T CD3. Si l'apparente absence de prolifération T peut s'expliquer par un nombre trop restreint de PBMCs initiaux, limitant la représentativité des clones spécifiques de MART1 dans chaque puit, la prolifération de NK est quant à elle tout à fait intéressante à noter. Elle est par ailleurs associée à une forte sécrétion d'IFN γ , mesurée par EliSpot à l'issue des 7 jours de culture, et indépendante de l'agent de restimulation utilisé (concanavalineA, peptide MART1, ou même absence de stimulant).

Le rôle des NK dans la cytotoxicité antitumorale est essentiel, et de nombreuses études cliniques montrent que l'efficacité des immunothérapies peut être associée à une mobilisation des cellules NK (Terme et al., 2008).

Il est tout à fait intéressant de noter que les LPR sont capables d'induire leur prolifération. Cependant, il existe plusieurs sous-population de cellules NK, et les cellules NK ayant des capacités de prolifération représentent seulement 10% des NK. Elles sont caractérisées par la forte expression du marqueur CD56 et l'absence d'expression de CD16 (CD56^{bright}CD16⁻) et sont spécialisées dans la production de cytokines, en particulier d'IL12 et d'IFN γ , ce qui est tout à fait cohérent avec la forte sécrétion d'IFN γ , que j'ai pu mesurer par EliSpot.

Toutefois, il est intéressant de noter que ces cellules NK prolifératives peuvent se différencier en cellules NK cytotoxiques CD56^{dim}CD16⁺ (Chan et al., 2007), dans certaines conditions cytokiniques.

La supposée activation de ces cellules NK pose beaucoup de questions, en particulier au niveau des mécanismes qui permettent aux LPR de les activer. Dans les précédentes expériences de fixation de LPR sur PBMCs humains, nous avons montré que ces derniers se fixaient assez peu sur les cellules NK, mais nous n'avons pas caractérisé les différences de fixation entre les sous-populations de NK. Nous ne pouvons donc pas conclure quant à la capacité des LPR à activer directement ces dernières.

Par contre, nous savons que les LPR se fixent de manière importante sur les DCs. De manière intéressante, il a été montré que les cellules NK peuvent être directement activées par les DCs (Fernandez et al., 1999), indiquant que les vaccination thérapeutiques ciblant les cellules dendritiques ne se contentent pas d'activer la réponse T spécifique, mais ont bien une action directe sur la réponse NK cytotoxique et cytokinique. Malheureusement, rares sont les publications étudiant la réponse NK dans le contexte de la vaccination thérapeutique, la grande majorité d'entre elles se concentrant sur la réponse T induite. Cependant, quelques travaux mettent en évidence cette réponse NK, et montrent qu'elle permet l'induction d'une meilleure réponse T cytotoxique, grâce à un rétrocontrôle positif des NKs sur les DCs, leur permettant d'induire plus efficacement une réponse T spécifique, et de sécréter de plus grandes quantités d'IL12 (Anguille et al., 2011; Kalinski et al., 2005).

De manière très intéressante, plusieurs travaux précliniques portant sur l'évaluation d'une stratégie de vaccination par cellules dendritiques montrent que l'injection contrôlée de DCs non chargées par un antigène spécifique est capable d'induire une réponse NK (Lion et al., 2012). De même, Rodriguez-Calvillo *et al.* ont montré que le rejet tumoral associé au vaccin par DCs est dépendant de la sécrétion d'IL12 et d'IFN γ (Rodríguez-Calvillo et al., 2002).

Chez l'Homme, Di Nicola *et al.* ont mis en évidence une corrélation positive entre l'augmentation des cellules NK et l'efficacité de la réponse clinique dans un contexte de vaccination par DCs chez des patients atteints de lymphomes B indolents (Di Nicola et al., 2009).

Enfin, Besse *et al.* ont récemment montré lors d'un essai de phase 2 que l'utilisation d'exosomes dérivés de DCs (Dex), qui consistent en des vésicules de petites tailles, sécrétées par les DCs et présentant à leur surface de nombreuses molécules de co-stimulation (CD40, CD86), de présentation antigénique (CMH I/II), et d'adhésion (ICAM), permettait une activation de cellules NK, médiée par le récepteur activateur NKp30 (Besse et al., 2015). Ces résultats sont très intéressants car ils confirment que des dérivés non cellulaires de DCs, mimant les signaux 1 et 2 d'activation sont suffisant pour induire une réponse NK.

Ces résultats ne doivent pas être négligés car les cellules NK représentent un pan très important de la réponse immune cytotoxique, et elles sont moins sensibles que les lymphocytes T au contexte immunosuppresseur. Ce sont des cellules à ne pas négliger dans le contexte tumoral. Nous avons donc prévu de continuer l'évaluation de la réponse immune induite par les LPR sur des cellules humaines, en étudiant en plus de la réponse T spécifique, la réponse NK induite, ainsi que la réponse humorale.

Conclusion

En conclusion, les LPR trimannosylés sont une approche particulièrement intéressante dans le contexte de la vaccination thérapeutique puisque, comparativement aux autres stratégies vaccinales récemment étudiées, ils permettent un ciblage efficace des sous-populations de DCs, ainsi que l'induction d'une réponse inflammatoire de type adjuvant. Ces capacités intrinsèques sont associées dans le modèle murin à une bonne efficacité thérapeutique, qui peut encore toutefois être améliorée par différentes pistes comme l'optimisation du schéma vaccinal, de choix de l'antigène, ou des combinaisons thérapeutiques.

Conclusion

Dans le contexte actuel, où les apparitions de cancers sont de plus en plus nombreuses et face à des échecs thérapeutiques fréquents, il est essentiel de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques antitumorales. Mon travail de doctorat a participé à l'élaboration d'une nouvelle stratégie de vaccination thérapeutique basée sur l'utilisation de LPR permettant le ciblage des cellules dendritiques.

J'ai pu montrer que les LPR trimannosylés étaient les plus efficaces pour se fixer sur les cellules dendritiques, et qu'ils permettaient *in vivo* l'activation d'une réponse inflammatoire locale ainsi que d'une réponse T spécifique de l'antigène vectorisé. Dans trois modèles de cancers, les LPR trimannosylés montrent une efficacité thérapeutique.

Ces résultats nous encouragent à continuer l'investigation de l'efficacité des LPR trimannosylés comme stratégie de vaccination thérapeutique, et pourraient nous conduire à envisager un essai clinique de phase 1. Cette stratégie pourrait aussi être couplée à d'autres immunothérapies telles que les inhibiteurs de checkpoints, qui ont déjà montré une efficacité clinique propre, et dont les effets sont potentiellement synergiques avec ceux de la vaccination thérapeutique.

Bibliographie

Abediankenari, S., Janbabaei Mollae, G., Ghasemi, M., Yousefzadeh, Y., Bahrami, M., and Alimoghaddam, K. (2013). Vaccination of diffuse large B- cell lymphoma patients with antigen-primed dendritic cells. *Acta Med. Iran.* *51*, 284–288.

Adams, S., Kozhaya, L., Martiniuk, F., Meng, T.-C., Chiriboga, L., Liebes, L., Hochman, T., Shuman, N., Axelrod, D., Speyer, J., et al. (2012). Topical TLR7 agonist imiquimod can induce immune-mediated rejection of skin metastases in patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 6748–6757.

Ahrens, S., Zelenay, S., Sancho, D., Hanč, P., Kjær, S., Feest, C., Fletcher, G., Durkin, C., Postigo, A., Skehel, M., et al. (2012). F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity* *36*, 635–645.

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 499–511.

Alexander, R.B., Brady, F., Leffell, M.S., Tsai, V., and Celis, E. (1998). Specific T cell recognition of peptides derived from prostate-specific antigen in patients with prostate cancer. *Urology* *51*, 150–157.

Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A.J.R., Behjati, S., Biankin, A.V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A.-L., et al. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* *500*, 415–421.

Algarra, I., Collado, A., and Garrido, F. (1997). Altered MHC class I antigens in tumors. *Int. J. Clin. Lab. Res.* *27*, 95–102.

Altman, J.B., Benavides, A.D., Das, R., and Bassiri, H. (2015). Antitumor Responses of Invariant Natural Killer T Cells. *J. Immunol. Res.* *2015*, e652875.

Alva, A., Daniels, G.A., Wong, M.K.K., Kaufman, H.L., Morse, M.A., McDermott, D.F., Clark, J.I., Agarwala, S.S., Miletello, G., Logan, T.F., et al. (2016). Contemporary experience with high-dose interleukin-2 therapy and impact on survival in patients with metastatic melanoma and metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* CII.

Amato, R.J., Hawkins, R.E., Kaufman, H.L., Thompson, J.A., Tomczak, P., Szczylik, C., McDonald, M., Eastty, S., Shingler, W.H., de Belin, J., et al. (2010). Vaccination of metastatic renal cancer patients with MVA-5T4: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 5539–5547.

Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D.C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* 3, 917–921.

Anderson, A.C. (2014). Tim-3: An Emerging Target in the Cancer Immunotherapy Landscape. *Cancer Immunol. Res.* 2, 393–398.

Anguille, S., Lion, E., Smits, E., Berneman, Z.N., and van Tendeloo, V.F.I. (2011). Dendritic cell vaccine therapy for acute myeloid leukemia: questions and answers. *Hum. Vaccin.* 7, 579–584.

Ansell, S.M., Lesokhin, A.M., Borrello, I., Halwani, A., Scott, E.C., Gutierrez, M., Schuster, S.J., Millenson, M.M., Cattray, D., Freeman, G.J., et al. (2015). PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 372, 311–319.

Anson, M., Crain-Denoyelle, A.-M., Baud, V., Chereau, F., Gougelet, A., Terris, B., Yamagoe, S., Colnot, S., Viguier, M., Perret, C., et al. (2012). Oncogenic β -catenin triggers an inflammatory response that determines the aggressiveness of hepatocellular carcinoma in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 586–599.

Aranda, F., Vacchelli, E., Eggermont, A., Galon, J., Sautès-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013). Trial Watch. *OncoImmunology* 2, e26621.

Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., Ryu, B., Rosty, C., Goggins, M., Wilentz, R.E.,

Murugesan, S.R., Leach, S.D., Jaffee, E., Yeo, C.J., et al. (2001). Mesothelin is overexpressed in the vast majority of ductal adenocarcinomas of the pancreas: identification of a new pancreatic cancer marker by serial analysis of gene expression (SAGE). *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 3862–3868.

Atkins, D., Breuckmann, A., Schmahl, G.E., Binner, P., Ferrone, S., Krummenauer, F., Störkel, S., and Seliger, B. (2004). MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma. *Int. J. Cancer* 109, 265–273.

Badoual, C., Hans, S., Merillon, N., Ryswick, C.V., Ravel, P., Benhamouda, N., Levionnois, E., Nizard, M., Si-Mohamed, A., Besnier, N., et al. (2013). PD-1–Expressing Tumor-Infiltrating T Cells Are a Favorable Prognostic Biomarker in HPV-Associated Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* 73, 128–138.

Bakker, A.B., Schreurs, M.W., de Boer, A.J., Kawakami, Y., Rosenberg, S.A., Adema, G.J., and Figdor, C.G. (1994). Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 179, 1005–1009.

Balkwill, F., Charles, K.A., and Mantovani, A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7, 211–217.

Barbeau, J., Lemiègre, L., Quelen, A., Malard, V., Gao, H., Gonçalves, C., Berchel, M., Jaffrès, P.-A., Pichon, C., Midoux, P., et al. (2016). Synthesis of a trimannosylated-equipped archaeal diether lipid for the development of novel glycoliposomes. *Carbohydr. Res.* 435, 142–148.

di Bari, M.G., Lutsiak, M.E.C., Takai, S., Mostböck, S., Farsaci, B., Semnani, R.T., Wakefield, L.M., Schlom, J., and Sabzevari, H. (2009). TGF-beta modulates the functionality of tumor-infiltrating CD8+ T cells through effects on TCR signaling and Spred1 expression. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 58, 1809–1818.

Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (1998). Defective TCR

expression in transgenic mice constructed using cDNA-based α - and β -chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* 76, 34–40.

Bath-Hextall, F., Ozolins, M., Armstrong, S.J., Colver, G.B., Perkins, W., Miller, P.S.J., Williams, H.C., and Surgery versus Imiquimod for Nodular Superficial basal cell carcinoma (SINS) study group (2014). Surgical excision versus imiquimod 5% cream for nodular and superficial basal-cell carcinoma (SINS): a multicentre, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 15, 96–105.

Bei, R., Guptill, V., Masuelli, L., Kashmiri, S.V., Muraro, R., Frati, L., Schlom, J., and Kantor, J. (1998). The use of a cationic liposome formulation (DOTAP) mixed with a recombinant tumor-associated antigen to induce immune responses and protective immunity in mice. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 21, 159–169.

Belharazem, D., Schalke, B., Gold, R., Nix, W., Vitacolonna, M., Hohenberger, P., Roessner, E., Schulze, T.J., Saruhan-Direskeneli, G., Yilmaz, V., et al. (2015). cFLIP overexpression in T cells in thymoma-associated myasthenia gravis. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2, 894–905.

Benteyn, D., Heirman, C., Bonehill, A., Thielemans, K., and Breckpot, K. (2015). mRNA-based dendritic cell vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 14, 161–176.

Berinstein, N.L., Karkada, M., Oza, A.M., Odunsi, K., Vilella, J.A., Nemunaitis, J.J., Morse, M.A., Pejovic, T., Bentley, J., Buyse, M., et al. (2015). Survivin-targeted immunotherapy drives robust polyfunctional T cell generation and differentiation in advanced ovarian cancer patients. *Oncoimmunology* 4, e1026529.

Besse, B., Charrier, M., Lapierre, V., Dansin, E., Lantz, O., Planchard, D., Le Chevalier, T., Livartoski, A., Barlesi, F., Laplanche, A., et al. (2015). Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. *Oncoimmunology* 5.

Besser, M.J., Shapira-Frommer, R., Itzhaki, O., Treves, A.J., Zippel, D.B., Levy, D.,
139

Kubi, A., Shoshani, N., Zikich, D., Ohayon, Y., et al. (2013). Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma: intent-to-treat analysis and efficacy after failure to prior immunotherapies. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 4792–4800.

Bharadwaj, U., Li, M., Zhang, R., Chen, C., and Yao, Q. (2007). Elevated interleukin-6 and G-CSF in human pancreatic cancer cell conditioned medium suppress dendritic cell differentiation and activation. *Cancer Res.* *67*, 5479–5488.

Birnbaum, D.J., Finetti, P., Lopresti, A., Gilabert, M., Poizat, F., Turrini, O., Raoul, J.-L., Delpero, J.-R., Moutardier, V., Birnbaum, D., et al. (2016). Prognostic value of PDL1 expression in pancreatic cancer. *Oncotarget*.

Blankenstein, T. (2007). Do autochthonous tumors interfere with effector T cell responses? *Semin. Cancer Biol.* *17*, 267–274.

Blankenstein, T., Coulie, P.G., Gilboa, E., and Jaffee, E.M. (2012). The determinants of tumour immunogenicity. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 307–313.

Bloy, N., Buqué, A., Aranda, F., Castoldi, F., Eggermont, A., Cremer, I., Sautès-Fridman, C., Fucikova, J., Galon, J., Spisek, R., et al. (2015). Trial watch: Naked and vectored DNA-based anticancer vaccines. *Oncoimmunology* *4*.

Boissel, N., Rousselot, P., Raffoux, E., Cayuela, J.-M., Maarek, O., Charron, D., Degos, L., Dombret, H., Toubert, A., and Rea, D. (2004). Defective blood dendritic cells in chronic myeloid leukemia correlate with high plasmatic VEGF and are not normalized by imatinib mesylate. *Leukemia* *18*, 1656–1661.

Bol, K.F., Mensink, H.W., Aarntzen, E.H.J.G., Schreiber, G., Keunen, J.E.E., Coulie, P.G., de Klein, A., Punt, C.J.A., Paridaens, D., Figdor, C.G., et al. (2014). Long overall survival after dendritic cell vaccination in metastatic uveal melanoma patients. *Am. J. Ophthalmol.* *158*, 939–947.

Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2002). Efficient Targeting of Protein Antigen to the Dendritic Cell Receptor DEC-205 in the Steady State Leads to Antigen Presentation on Major Histocompatibility Complex Class I Products and Peripheral CD8+ T Cell Tolerance. *J. Exp. Med.* 196, 1627–1638.

Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D.R., Steins, M., Ready, N.E., Chow, L.Q., Vokes, E.E., Felip, E., Holgado, E., et al. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 373, 1627–1639.

Boyd-Tressler, A., Penuela, S., Laird, D.W., and Dubyak, G.R. (2014). Chemotherapeutic Drugs Induce ATP Release via Caspase-gated Pannexin-1 Channels and a Caspase/Pannexin-1-independent Mechanism. *J. Biol. Chem.* 289, 27246–27263.

Boyer, J.D., Cohen, A.D., Ugen, K.E., Edgeworth, R.L., Bennett, M., Shah, A., Schumann, K., Nath, B., Javadian, A., Bagarazzi, M.L., et al. (2000). Therapeutic immunization of HIV-infected chimpanzees using HIV-1 plasmid antigens and interleukin-12 expressing plasmids. *AIDS Lond. Engl.* 14, 1515–1522.

Brichard, V., Van Pel, A., Wölfel, T., Wölfel, C., De Plaen, E., Lethé, B., Coulie, P., and Boon, T. (1993). The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* 178, 489–495.

Bronte, V., and Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 641–654.

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

Burnet, F.M. (1971). Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant. Rev.* 7, 3–25.

Burnet, M. (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br.* 141

Med. J. 1, 779–786.

Burstein, N.A., and Law, L.W. (1971). Neonatal thymectomy and non-viral mammary tumours in mice. *Nature* 231, 450–452.

Caminschi, I., and Shortman, K. (2012). Boosting antibody responses by targeting antigens to dendritic cells. *Trends Immunol.* 33, 71–77.

Caminschi, I., Maraskovsky, E., and Heath, W.R. (2012). Targeting Dendritic Cells in vivo for Cancer Therapy. *Front. Immunol.* 3.

Cao, J., Jin, Y., Li, W., Zhang, B., He, Y., Liu, H., Xia, N., Wei, H., and Yan, J. (2013). DNA vaccines targeting the encoded antigens to dendritic cells induce potent antitumor immunity in mice. *BMC Immunol.* 14, 39.

Carpentier, A., Metellus, P., Ursu, R., Zohar, S., Lafitte, F., Barrié, M., Meng, Y., Richard, M., Parizot, C., Laigle-Donadey, F., et al. (2010). Intracerebral administration of CpG oligonucleotide for patients with recurrent glioblastoma: a phase II study. *Neuro-Oncol.* 12, 401–408.

Castriconi, R., Cantoni, C., Della Chiesa, M., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2003). Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4120–4125.

Chabrol, E., Thépaut, M., Dezutter-Dambuyant, C., Vivès, C., Marcoux, J., Kahn, R., Valladeau-Guilemond, J., Vachette, P., Durand, D., and Fieschi, F. (2015). Alteration of the langerin oligomerization state affects Birbeck granule formation. *Biophys. J.* 108, 666–677.

Challa, D.K., Mi, W., Lo, S.-T., Ober, R.J., and Ward, E.S. (2016). Antigen dynamics govern the induction of CD4(+) T cell tolerance during autoimmunity. *J. Autoimmun.* 72, 84–94.

Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Vincent, J., Bruchard, M., Remy-Martin, J.-P., Boireau, W., Rouleau, A., Simon, B., Lanneau, D., et al. (2010). Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J. Clin. Invest.* *120*, 457–471.

Chan, A., Hong, D.-L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A.D., Buckley, C.D., McMichael, A., Enver, T., and Bowness, P. (2007). CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *179*, 89–94.

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

Charles, J., Di Domizio, J., Salameire, D., Bendriss-Vermare, N., Aspord, C., Muhammad, R., Lefebvre, C., Plumas, J., Leccia, M.-T., and Chaperot, L. (2010). Characterization of circulating dendritic cells in melanoma: role of CCR6 in plasmacytoid dendritic cell recruitment to the tumor. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 1646–1656.

Chen, Q., Zhang, X.H.-F., and Massagué, J. (2011). Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs. *Cancer Cell* *20*, 538–549.

Chen, Y.-T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Türeci, Ö., Gure, A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L.J. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 1914–1918.

Chiari, R., Hames, G., Stroobant, V., Texier, C., Maillère, B., Boon, T., and Coulie, P.G. (2000). Identification of a tumor-specific shared antigen derived from an Eph receptor and presented to CD4 T cells on HLA class II molecules. *Cancer Res.* *60*, 4855–4863.

Clarke, S.Rm., Barnden, M., Kurts, C., Carbone, F.R., Miller, J.F., and Heath, W.R. (2000). Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunol. Cell Biol.* *78*, 110–117.

Cohen, C.J., Gartner, J.J., Horovitz-Fried, M., Shamalov, K., Trebska-McGowan, K., Bliskovsky, V.V., Parkhurst, M.R., Ankri, C., Prickett, T.D., Crystal, J.S., et al. (2015a). Isolation of neoantigen-specific T cells from tumor and peripheral lymphocytes. *J. Clin. Invest.* *125*, 3981–3991.

Cohen, C.J., Gartner, J.J., Horovitz-Fried, M., Shamalov, K., Trebska-McGowan, K., Bliskovsky, V.V., Parkhurst, M.R., Ankri, C., Prickett, T.D., Crystal, J.S., et al. (2015b). Isolation of neoantigen-specific T cells from tumor and peripheral lymphocytes. *J. Clin. Invest.* *125*, 3981–3991.

Coley, W.B. (1906). II. The Radical Cure of Femoral Hernia. *Ann. Surg.* *44*, 519–528.

Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* *420*, 860–867.

Cummings, R.D., and McEver, R.P. (2009). C-type Lectins. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.

Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* *10*, 942–949.

Curti, B.D., Kovacsovics-Bankowski, M., Morris, N., Walker, E., Chisholm, L., Floyd, K., Walker, J., Gonzalez, I., Meeuwesen, T., Fox, B.A., et al. (2013). OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. *Cancer Res.* *73*, 7189–7198.

Dadaglio, G., Fayolle, C., Zhang, X., Ryffel, B., Oberkamp, M., Felix, T., Hervas-

Stubbs, S., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D., et al. (2014). Antigen targeting to CD11b+ dendritic cells in association with TLR4/TRIF signaling promotes strong CD8+ T cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 1787–1798.

Davidson, M.G., Alonso, M.N., Kenkel, J.A., Suhoski, M.M., González, J.C., Yuan, R., and Engleman, E.G. (2013). In Vivo T Cell Activation Induces the Formation of CD209+ PDL-2+ Dendritic Cells. *PLOS ONE* *8*, e76258.

De Palma, M. (2012). Partners in crime: VEGF and IL-4 conscript tumour-promoting macrophages. *J. Pathol.* *227*, 4–7.

Della Bella, S., Gennaro, M., Vaccari, M., Ferraris, C., Nicola, S., Riva, A., Clerici, M., Greco, M., and Villa, M.L. (2003). Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer* *89*, 1463–1472.

Della Porta, M., Danova, M., Rigolin, G.M., Brugnattelli, S., Rovati, B., Tronconi, C., Fraulini, C., Russo Rossi, A., Riccardi, A., and Castoldi, G. (2005). Dendritic cells and vascular endothelial growth factor in colorectal cancer: correlations with clinicobiological findings. *Oncology* *68*, 276–284.

Deng, L., Gyorffy, B., Na, F., Chen, B., Lan, J., Xue, J., Zhou, L., and Lu, Y. (2015). Association of PDCD1 and CTLA-4 Gene Expression with Clinicopathological Factors and Survival in Non-Small-Cell Lung Cancer: Results from a Large and Pooled Microarray Database. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *10*, 1020–1026.

Dharmapuri, S., Peruzzi, D., and Aurisicchio, L. (2009). Engineered adenovirus serotypes for overcoming anti-vector immunity. *Expert Opin. Biol. Ther.* *9*, 1279–1287.

Dhodapkar, M.V., Sznol, M., Zhao, B., Wang, D., Carvajal, R.D., Keohan, M.L., Chuang, E., Sanborn, R.E., Lutzky, J., Powderly, J., et al. (2014). Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. *Sci. Transl. Med.* *6*, 232ra51.

Di Nicola, M., Zappasodi, R., Carlo-Stella, C., Mortarini, R., Pupa, S.M., Magni, M., Devizzi, L., Matteucci, P., Baldassari, P., Ravagnani, F., et al. (2009). Vaccination with autologous tumor-loaded dendritic cells induces clinical and immunologic responses in indolent B-cell lymphoma patients with relapsed and measurable disease: a pilot study. *Blood* 113, 18–27.

Diaz-Montero, C.M., Salem, M.L., Nishimura, M.I., Garrett-Mayer, E., Cole, D.J., and Montero, A.J. (2009). Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 58, 49–59.

Dumitriu, I.E., Dunbar, D.R., Howie, S.E., Sethi, T., and Gregory, C.D. (2009). Human dendritic cells produce TGF-beta 1 under the influence of lung carcinoma cells and prime the differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 182, 2795–2807.

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

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

Eder, J.P., Kantoff, P.W., Roper, K., Xu, G.X., Buble, G.J., Boyden, J., Gritz, L., Mazzara, G., Oh, W.K., Arlen, P., et al. (2000). A phase I trial of a recombinant vaccinia virus expressing prostate-specific antigen in advanced prostate cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6, 1632–1638.

Eickhoff, S., Brewitz, A., Gerner, M.Y., Klauschen, F., Komander, K., Hemmi, H., Garbi, N., Kaisho, T., Germain, R.N., and Kastenmüller, W. (2015). Robust Anti-viral Immunity Requires Multiple Distinct T Cell-Dendritic Cell Interactions. *Cell* 162, 1322–1337.

Enzler, T., Gillessen, S., Manis, J.P., Ferguson, D., Fleming, J., Alt, F.W., Mihm, M., 146

and Dranoff, G. (2003). Deficiencies of GM-CSF and Interferon γ Link Inflammation and Cancer. *J. Exp. Med.* *197*, 1213–1219.

Erdman, S.E., Poutahidis, T., Tomczak, M., Rogers, A.B., Cormier, K., Plank, B., Horwitz, B.H., and Fox, J.G. (2003). CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Lymphocytes Inhibit Microbially Induced Colon Cancer in Rag2-Deficient Mice. *Am. J. Pathol.* *162*, 691–702.

Failli, A., Legitimo, A., Orsini, G., Romanini, A., and Consolini, R. (2013). Numerical defect of circulating dendritic cell subsets and defective dendritic cell generation from monocytes of patients with advanced melanoma. *Cancer Lett.* *337*, 184–192.

Fehres, C.M., Kalay, H., Bruijns, S.C.M., Musaafir, S.A.M., Ambrosini, M., van Bloois, L., van Vliet, S.J., Storm, G., Garcia-Vallejo, J.J., and van Kooyk, Y. (2015). Cross-presentation through langerin and DC-SIGN targeting requires different formulations of glycan-modified antigens. *J. Controlled Release* *203*, 67–76.

Fernandez, N.C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E., and Zitvogel, L. (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* *5*, 405–411.

Figlin, R.A., Pierce, W.C., Kaboo, R., Tso, C.L., Moldawer, N., Gitlitz, B., deKernion, J., and Belldegrun, A. (1997). Treatment of metastatic renal cell carcinoma with nephrectomy, interleukin-2 and cytokine-primed or CD8(+) selected tumor infiltrating lymphocytes from primary tumor. *J. Urol.* *158*, 740–745.

Finn, O.J., Jerome, K.R., Henderson, R.A., Pecher, G., Domenech, N., Magarian-Blander, J., and Barratt-Boyes, S.M. (1995). MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol. Rev.* *145*, 61–89.

Fishelson, Z., Donin, N., Zell, S., Schultz, S., and Kirschfink, M. (2003). Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol. Immunol.* *40*, 109–123.

Fisk, B., Blevins, T.L., Wharton, J.T., and Ioannides, C.G. (1995). Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J. Exp. Med.* *181*, 2109–2117.

Folli, S., Épèlegrin, A., Chalandon, Y., Yao, X., Buchegger, F., Lienard, D., Lejeune, F., and Mach, J.-P. (1993). Tumor-necrosis factor can enhance radio-antibody uptake in human colon carcinoma xenografts by increasing vascular permeability. *Int. J. Cancer* *53*, 829–836.

Fourcade, J., Sun, Z., Pagliano, O., Chauvin, J.-M., Sander, C., Janjic, B., Tarhini, A.A., Tawbi, H.A., Kirkwood, J.M., Moschos, S., et al. (2014). PD-1 and Tim-3 regulate the expansion of tumor antigen-specific CD8⁺ T cells induced by melanoma vaccines. *Cancer Res.* *74*, 1045–1055.

Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 298–306.

Gabrilovich, D.I., Chen, H.L., Girgis, K.R., Cunningham, H.T., Meny, G.M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., and Carbone, D.P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* *2*, 1096–1103.

Gallo, P.M., and Gallucci, S. (2013). The Dendritic Cell Response to Classic, Emerging, and Homeostatic Danger Signals. Implications for Autoimmunity. *Front. Immunol.* *4*.

Gao, Q., Qiu, S.-J., Fan, J., Zhou, J., Wang, X.-Y., Xiao, Y.-S., Xu, Y., Li, Y.-W., and Tang, Z.-Y. (2007a). Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *25*, 2586–2593.

Gao, Q., Qiu, S.-J., Fan, J., Zhou, J., Wang, X.-Y., Xiao, Y.-S., Xu, Y., Li, Y.-W., and Tang, Z.-Y. (2007b). Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated

with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 2586–2593.

Gao, X., Zhu, Y., Li, G., Huang, H., Zhang, G., Wang, F., Sun, J., Yang, Q., Zhang, X., and Lu, B. (2012). TIM-3 Expression Characterizes Regulatory T Cells in Tumor Tissues and Is Associated with Lung Cancer Progression. *PLOS ONE* 7, e30676.

Garranzo-Asensio, M., Guzman-Aranguez, A., Povés, C., Fernández-Aceñero, M.J., Torrente-Rodríguez, R.M., Ruiz-Valdepeñas Montiel, V., Domínguez, G., Frutos, L.S., Rodríguez, N., Villalba, M., et al. (2016). Toward Liquid Biopsy: Determination of the Humoral Immune Response in Cancer Patients Using HaloTag Fusion Protein-Modified Electrochemical Bioplatfoms. *Anal. Chem.* 88, 12339–12345.

Gastl, G., Spizzo, G., Obrist, P., Dünser, M., and Mikuz, G. (2000). Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. *Lancet Lond. Engl.* 356, 1981–1982.

Gaur, P., Singh, A.K., Shukla, N.K., and Das, S.N. (2014). Inter-relation of Th1, Th2, Th17 and Treg cytokines in oral cancer patients and their clinical significance. *Hum. Immunol.* 75, 330–337.

Gazi, U., and Martinez-Pomares, L. (2009). Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology* 214, 554–561.

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

Geller, M.A., Cooley, S., Judson, P.L., Ghebre, R., Carson, L.F., Argenta, P.A., Jonson, A.L., Panoskaltsis-Mortari, A., Curtsinger, J., McKenna, D., et al. (2011). A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy* 13, 98–107.

Gérard, C., Baudson, N., Ory, T., and Louahed, J. (2014). Tumor mouse model

confirms MAGE-A3 cancer immunotherapeutic as an efficient inducer of long-lasting anti-tumoral responses. *PloS One* 9, e94883.

Ghalamfarsa, G., Hosseini, S.V., Hamidinia, M., Ghaderi, A., Mahmoudi, M., and Mojtahedi, Z. (2017). Differential Immune Reactivity Pattern of SW48 and SW1116 Colorectal Cancer Cell Lines with Colorectal Cancer Patients Sera. *Adv. Biomed. Res.* 6, 6.

Ghiringhelli, F., Puig, P.E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B., and Zitvogel, L. (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J. Exp. Med.* 202, 919–929.

Giaccone, G., Punt, C.J.A., Ando, Y., Ruijter, R., Nishi, N., Peters, M., Blomberg, B.M.E. von, Scheper, R.J., Vliet, H.J.J. van der, Eertwegh, A.J.M. van den, et al. (2002). A Phase I Study of the Natural Killer T-Cell Ligand α -Galactosylceramide (KRN7000) in Patients with Solid Tumors. *Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 3702–3709.

Gill, D.M., Stenehjem, D.D., Parikh, K., Merriman, J., Sendilnathan, A., Agarwal, A.M., Hahn, A.W., Gupta, S., Tantravahi, S.K., Samlowski, W.E., et al. (2016). Conditional survival of metastatic renal cell carcinoma patients treated with high-dose interleukin-2. *Ecancermedicalsecience* 10, 676.

Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A.C., Durand, I., Olive, D., et al. (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* 69, 2000–2009.

Goc, J., Fridman, W.-H., Hammond, S.A., Sautès-Fridman, C., and Dieu-Nosjean, M.-C. (2014). Tertiary lymphoid structures in human lung cancers, a new driver of antitumor immune responses. *Oncoimmunology* 3, e28976.

Graff, J.N., and Chamberlain, E.D. (2015). Sipuleucel-T in the treatment of prostate cancer: an evidence-based review of its place in therapy. *Core Evid.* 10, 1–10.

Grant, G.A., and Miller, J.F. (1965). Effect of neonatal thymectomy on the induction of sarcomata in C57 BL mice. *Nature* 205, 1124–1125.

Grimmig, T., Moench, R., Kreckel, J., Haack, S., Rueckert, F., Rehder, R., Tripathi, S., Ribas, C., Chandraker, A., Germer, C.T., et al. (2016). Toll Like Receptor 2, 4, and 9 Signaling Promotes Autoregulative Tumor Cell Growth and VEGF/PDGF Expression in Human Pancreatic Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 17.

Grohmann, U., Fallarino, F., and Puccetti, P. (2003). Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol.* 24, 242–248.

Gulich, A.E., van Leeuwen, M.T., Falster, M.O., and Vajdic, C.M. (2007). Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *The Lancet* 370, 59–67.

Guo, J., Li, G., Tang, J., Cao, X.-B., Zhou, Q.-Y., Fan, Z.-J., Zhu, B., and Pan, X.-H. (2013). HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes from human hepsin as novel targets for prostate cancer immunotherapy. *Scand. J. Immunol.* 78, 248–257.

Guo, Q., Jin, Z., Yuan, Y., Liu, R., Xu, T., Wei, H., Xu, X., He, S., Chen, S., Shi, Z., et al. (2016). New Mechanisms of Tumor-Associated Macrophages on Promoting Tumor Progression: Recent Research Advances and Potential Targets for Tumor Immunotherapy. *J. Immunol. Res.* 2016.

Gupta, D.K., Singh, N., and Sahu, D.K. (2014). TGF- β Mediated Crosstalk Between Malignant Hepatocyte and Tumor Microenvironment in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Growth Metastasis* 7, 1–8.

Guy, B. (2007). The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 505–517.

Gwak, J.M., Jang, M.H., Kim, D.I., Seo, A.N., and Park, S.Y. (2015). Prognostic value of tumor-associated macrophages according to histologic locations and hormone receptor

status in breast cancer. *PloS One* *10*, e0125728.

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

Hargadon, K.M. (2013). Tumor-Altered Dendritic Cell Function: Implications for Anti-Tumor Immunity. *Front. Immunol.* *4*.

Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* *194*, 769–779.

He, L.-Z., Weidlick, J., Sisson, C., Marsh, H.C., and Keler, T. (2015). Toll-like receptor agonists shape the immune responses to a mannose receptor-targeted cancer vaccine. *Cell. Mol. Immunol.* *12*, 719–728.

van Herpen, C.M., Looman, M., Zonneveld, M., Scharenborg, N., de Wilde, P.C., van de Locht, L., Merks, M.A.W., Adema, G.J., and de Mulder, P.H. (2004). Intratumoral administration of recombinant human interleukin 12 in head and neck squamous cell carcinoma patients elicits a T-helper 1 profile in the locoregional lymph nodes. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *10*, 2626–2635.

Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *363*, 711–723.

Hole, N., and Stern, P.L. (1990). Isolation and characterization of 5T4, a tumour-associated antigen. *Int. J. Cancer* *45*, 179–184.

Hu, W., Qian, Y., Yu, F., Liu, W., Wu, Y., Fang, X., and Hao, W. (2015). Alternatively activated macrophages are associated with metastasis and poor prognosis in prostate adenocarcinoma. *Oncol. Lett.* *10*, 1390–1396.

Huber, M.L., Haynes, L., Parker, C., and Iversen, P. (2012). Interdisciplinary Critique of Sipuleucel-T as Immunotherapy in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *104*, 273–279.

Hwang, S.L., Chung, N.P.-Y., Chan, J.K.-Y., and Lin, C.-L.S. (2005). Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) is essential for dendritic cell activation and chemotactic responsiveness to chemokines. *Cell Res.* *15*, 167–175.

Idoyaga, J., Moreno, J., and Bonifaz, L. (2007). Tumor cells prevent mouse dendritic cell maturation induced by TLR ligands. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII 56*, 1237–1250.

Igney, F.H., and Krammer, P.H. (2005). Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer Immunol. Immunother.* *54*, 1127–1136.

Ikeda, H., Lethé, B., Lehmann, F., van Baren, N., Baurain, J.F., de Smet, C., Chambost, H., Vitale, M., Moretta, A., Boon, T., et al. (1997). Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* *6*, 199–208.

Iliopoulou, E.G., Kountourakis, P., Karamouzis, M.V., Doufexis, D., Ardavanis, A., Baxevanis, C.N., Rigatos, G., Papamichail, M., and Perez, S.A. (2010). A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII 59*, 1781–1789.

Inoue, K., Sugiyama, H., Ogawa, H., Nakagawa, M., Yamagami, T., Miwa, H., Kita, K., Hiraoka, A., Masaoka, T., and Nasu, K. (1994). WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* *84*, 3071–3079.

Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S., and Aikou, T. (2000). Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* *88*, 577–583.

Ishikawa, A., Motohashi, S., Ishikawa, E., Fuchida, H., Higashino, K., Otsuji, M., Iizasa, T., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Fujisawa, T. (2005). A Phase I Study of α -Galactosylceramide (KRN7000)–Pulsed Dendritic Cells in Patients with Advanced and Recurrent Non–Small Cell Lung Cancer. *Am. Assoc. Cancer Res. 11*, 1910–1917.

Ito, D., Visus, C., Hoffmann, T.K., Balz, V., Bier, H., Appella, E., Whiteside, T.L., Ferris, R.L., and DeLeo, A.B. (2007). Immunological characterization of missense mutations occurring within cytotoxic T cell-defined p53 epitopes in HLA-A*0201+ squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int. J. Cancer 120*, 2618–2624.

Jaramillo, A., Majumder, K., Manna, P.P., Fleming, T.P., Doherty, G., Dipersio, J.F., and Mohanakumar, T. (2002). Identification of HLA-A3-restricted CD8+ T cell epitopes derived from mammaglobin-A, a tumor-associated antigen of human breast cancer. *Int. J. Cancer 102*, 499–506.

Jerome, K.R., Barnd, D.L., Bendt, K.M., Boyer, C.M., Taylor-Papadimitriou, J., McKenzie, I.F., Bast, R.C., and Finn, O.J. (1991). Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. *Cancer Res. 51*, 2908–2916.

Johnson, T.S., Mahnke, K., Storn, V., Schönfeld, K., Ring, S., Nettelbeck, D.M., Haisma, H.J., Gall, F.L., Kontermann, R.E., and Enk, A.H. (2008). Inhibition of Melanoma Growth by Targeting of Antigen to Dendritic Cells via an Anti-DEC-205 Single-Chain Fragment Variable Molecule. *Clin. Cancer Res. 14*, 8169–8177.

Joshi, N.S., Akama-Garren, E.H., Lu, Y., Lee, D.-Y., Chang, G.P., Li, A., DuPage, M., Tammela, T., Kerper, N.R., Farago, A.F., et al. (2015). Regulatory T Cells in Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures Suppress Anti-tumor T Cell Responses. *Immunity 43*, 579–590.

Kalinski, P., Giermasz, A., Nakamura, Y., Basse, P., Storkus, W.J., Kirkwood, J.M., and Mailliard, R.B. (2005). Helper role of NK cells during the induction of anticancer

responses by dendritic cells. *Mol. Immunol.* *42*, 535–539.

Kang, Y.J., Zeng, W., Song, W., Reinhold, B., Choi, J., Brusica, V., Yamashita, T., Munshi, A., Li, C., Minvielle, S., et al. (2013). Identification of human leucocyte antigen (HLA)-A*0201-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes derived from HLA-DO β as a novel target for multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* *163*, 343–351.

Kantoff, P.W., Schuetz, T.J., Blumenstein, B.A., Glode, L.M., Bilhartz, D.L., Wyand, M., Manson, K., Panicali, D.L., Laus, R., Schlom, J., et al. (2010). Overall Survival Analysis of a Phase II Randomized Controlled Trial of a Poxviral-Based PSA-Targeted Immunotherapy in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* *28*, 1099–1105.

Kantoff, P.W., Gulley, J.L., and Pico-Navarro, C. (2016). Revised Overall Survival Analysis of a Phase II, Randomized, Double-Blind, Controlled Study of PROSTVAC in Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* *35*, 124–125.

Kantor, J., Irvine, K., Abrams, S., Kaufman, H., DiPietro, J., and Schlom, J. (1992). Antitumor activity and immune responses induced by a recombinant carcinoembryonic antigen-vaccinia virus vaccine. *J. Natl. Cancer Inst.* *84*, 1084–1091.

Karaki, S., Anson, M., Tran, T., Giusti, D., Blanc, C., Oudard, S., and Tartour, E. (2016). Is There Still Room for Cancer Vaccines at the Era of Checkpoint Inhibitors. *Vaccines* *4*, 37.

Karin, M., Lawrence, T., and Nizet, V. (2006). Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* *124*, 823–835.

Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* *441*, 101–105.

Kawakami, Y., Eliyahu, S., Sakaguchi, K., Robbins, P.F., Rivoltini, L., Yannelli, J.R.,

Appella, E., and Rosenberg, S.A. (1994). Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* *180*, 347–352.

Kawakami, Y., Robbins, P.F., Wang, R.F., Parkhurst, M., Kang, X., and Rosenberg, S.A. (1998). The use of melanosomal proteins in the immunotherapy of melanoma. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* *21*, 237–246.

Kim, J.R., Moon, Y.J., Kwon, K.S., Bae, J.S., Wagle, S., Kim, K.M., Park, H.S., Lee, H., Moon, W.S., Chung, M.J., et al. (2013). Tumor infiltrating PD1-positive lymphocytes and the expression of PD-L1 predict poor prognosis of soft tissue sarcomas. *PloS One* *8*, e82870.

Klade, C.S., Dohnal, A., Fürst, W., Sommergruber, W., Heider, K.-H., Gharwan, H., Ratschek, M., and Adolf, G.R. (2002). Identification and characterization of 9D7, a novel human protein overexpressed in renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer* *97*, 217–224.

Klechevsky, E., Flamar, A.-L., Cao, Y., Blanck, J.-P., Liu, M., O'Bar, A., Agouna-Deciat, O., Klucar, P., Thompson-Snipes, L., Zurawski, S., et al. (2010). Cross-priming CD8+ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood* *116*, 1685–1697.

Kleponis, J., Skelton, R., and Zheng, L. (2015). Fueling the engine and releasing the break: combinational therapy of cancer vaccines and immune checkpoint inhibitors. *Cancer Biol. Med.* *12*, 201–208.

Kochenderfer, J.N., Dudley, M.E., Kassim, S.H., Somerville, R.P.T., Carpenter, R.O., Stetler-Stevenson, M., Yang, J.C., Phan, G.Q., Hughes, M.S., Sherry, R.M., et al. (2015). Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *33*, 540–549.

Kohrt, H.E., Thielens, A., Marabelle, A., Sagiv-Barfi, I., Sola, C., Chanuc, F., Fuseri, N., Bonnafous, C., Czerwinski, D., Rajapaksa, A., et al. (2014). Anti-KIR antibody enhancement of anti-lymphoma activity of natural killer cells as monotherapy and in

combination with anti-CD20 antibodies. *Blood* 123, 678–686.

Konopitzky, R., König, U., Meyer, R.G., Sommergruber, W., Wölfel, T., and Schweighoffer, T. (2002). Identification of HLA-A*0201-restricted T cell epitopes derived from the novel overexpressed tumor antigen calcium-activated chloride channel 2. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169, 540–547.

Kranz, L.M., Diken, M., Haas, H., Kreiter, S., Loquai, C., Reuter, K.C., Meng, M., Fritz, D., Vascotto, F., Hefesha, H., et al. (2016). Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature* 534, 396–401.

Krause, S.W., Gastpar, R., Andreesen, R., Gross, C., Ullrich, H., Thonigs, G., Pfister, K., and Multhoff, G. (2004). Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase i trial. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 3699–3707.

Krishnadas, D.K., Shusterman, S., Bai, F., Diller, L., Sullivan, J.E., Cheerva, A.C., George, R.E., and Lucas, K.G. (2015). A phase I trial combining decitabine/dendritic cell vaccine targeting MAGE-A1, MAGE-A3 and NY-ESO-1 for children with relapsed or therapy-refractory neuroblastoma and sarcoma. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 64, 1251–1260.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., and Zitvogel, L. (2013). Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 51–72.

Kufe, D. (2010). Oncogenic function of the MUC1 receptor subunit in gene regulation. *Oncogene* 29, 5663–5666.

Kunii, N., Horiguchi, S., Motohashi, S., Yamamoto, H., Ueno, N., Yamamoto, S., Sakurai, D., Taniguchi, M., Nakayama, T., and Okamoto, Y. (2009). Combination therapy of in vitro-expanded natural killer T cells and α -galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma. *Cancer Sci.* 100, 1092–1098.

Kurtenkov, O., Klaamas, K., Mensdorff-Pouilly, S., Miljukhina, L., Shljapnikova, L., and Chuzmarov, V. (2007). Humoral immune response to MUC1 and to the Thomsen-Friedenreich (TF) glycotope in patients with gastric cancer: relation to survival. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* *46*, 316–323.

Lahoud, M.H., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Wan, S.S., Vremec, D., Lee, C.-N., Phipson, B., Shi, W., Smyth, G.K., Lew, A.M., et al. (2011). Targeting Antigen to Mouse Dendritic Cells via Clec9A Induces Potent CD4 T Cell Responses Biased toward a Follicular Helper Phenotype. *J. Immunol.* *187*, 842–850.

Lanier, L.L. (2005). Nk Cell Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 225–274.

Larocca, C., and Schlom, J. (2011). Viral Vector –based Therapeutic Cancer Vaccines. *Cancer J. Sudbury Mass* *17*, 359–371.

Lee, S., and Margolin, K. (2011). Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers* *3*, 3856–3893.

Lee, J.-C., Lee, K.-M., Kim, D.-W., and Heo, D.S. (2004). Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 7335–7340.

Leffers, N., Gooden, M.J.M., de Jong, R.A., Hoogeboom, B.-N., ten Hoor, K.A., Hollema, H., Boezen, H.M., van der Zee, A.G.J., Daemen, T., and Nijman, H.W. (2009). Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *58*, 449–459.

Levin, C., Perrin, H., and Combadiere, B. (2014). Tailored immunity by skin antigen-presenting cells. *Hum. Vaccines Immunother.* *11*, 27–36.

Li, H., and Shi, B. (2015). Tolerogenic dendritic cells and their applications in transplantation. *Cell. Mol. Immunol.* *12*, 24–30.

Li, Y., Sun, B.-S., Pei, B., Li, C.-G., Zhang, Z.-F., Yin, Y.-S., and Wang, C.-L. (2015). Osteopontin-expressing macrophages in non-small cell lung cancer predict survival. *Ann. Thorac. Surg.* *99*, 1140–1148.

Lin, E.Y., Gouon-Evans, V., Nguyen, A.V., and Pollard, J.W. (2002). The Macrophage Growth Factor CSF-1 in Mammary Gland Development and Tumor Progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *7*, 147–162.

Linehan, S.A., Martínez-Pomares, L., da Silva, R.P., and Gordon, S. (2001). Endogenous ligands of carbohydrate recognition domains of the mannose receptor in murine macrophages, endothelial cells and secretory cells; potential relevance to inflammation and immunity. *Eur. J. Immunol.* *31*, 1857–1866.

Linette, G.P., Stadtmauer, E.A., Maus, M.V., Rapoport, A.P., Levine, B.L., Emery, L., Litzky, L., Bagg, A., Carreno, B.M., Cimino, P.J., et al. (2013). Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* *122*, 863–871.

Lint, S.V., Renmans, D., Broos, K., Dewitte, H., Lentacker, I., Heirman, C., Breckpot, K., and Thielemans, K. (2015). The ReNAissanCe of mRNA-based cancer therapy. *Expert Rev. Vaccines* *14*, 235–251.

Lion, E., Smits, E.L.J.M., Berneman, Z.N., and Tendeloo, V.F.I.V. (2012). NK Cells: Key to Success of DC-Based Cancer Vaccines? *The Oncologist* *17*, 1256–1270.

Lissoni, P. (2016). Therapy implications of the role of interleukin-2 in cancer. *Expert Rev. Clin. Immunol.* *0*, 1–8.

Liu, C.-Y., Xu, J.-Y., Shi, X.-Y., Huang, W., Ruan, T.-Y., Xie, P., and Ding, J.-L. (2013). M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *93*, 844–854.

Liu, Q., Zhang, C., Sun, A., Zheng, Y., Wang, L., and Cao, X. (2009). Tumor-Educated CD11b^{high}Ialow Regulatory Dendritic Cells Suppress T Cell Response through Arginase I. *J. Immunol.* *182*, 6207–6216.

Liu, X., Hou, M., and Liu, Y. (2016). TIGIT, A Novel Therapeutic Target for Tumor Immunotherapy. *Immunol. Invest.* *0*, 1–11.

Lu, W., Qiu, L., Yan, Z., Lin, Z., Cao, M., Hu, C., Wang, Z., Wang, J., Yu, Y., Cheng, X., et al. (2015). Cytotoxic T cell responses are enhanced by antigen design involving the presentation of MUC1 peptide on cholera toxin B subunit. *Oncotarget* *6*, 34537–34548.

Lukesova, E., Boucek, J., Rotnaglova, E., Salakova, M., Koslabova, E., Grega, M., Eckschlager, T., Rihova, B., Prochazka, B., Klozar, J., et al. (2014). High level of Tregs is a positive prognostic marker in patients with HPV-positive oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *BioMed Res. Int.* *2014*, 303929.

Lundgren, S., Warfvinge, C.F., Elebro, J., Heby, M., Nodin, B., Krzyzanowska, A., Bjartell, A., Leandersson, K., Eberhard, J., and Jirström, K. (2016). The Prognostic Impact of NK/NKT Cell Density in Periampullary Adenocarcinoma Differs by Morphological Type and Adjuvant Treatment. *PloS One* *11*, e0156497.

Lyman, M.A., Aung, S., Biggs, J.A., and Sherman, L.A. (2004). A spontaneously arising pancreatic tumor does not promote the differentiation of naive CD8⁺ T lymphocytes into effector CTL. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 6558–6567.

Lynch, D.H., Andreasen, A., Maraskovsky, E., Whitmore, J., Miller, R.E., and Schuh, J.C.L. (1997). Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* *3*, 625–631.

Macedo, R., Rochefort, J., Guillot-Delost, M., Tanaka, K., Le Moignic, A., Noizat, C., Baillou, C., Mateo, V., Carpentier, A.F., Tartour, E., et al. (2016). Intra-cheek immunization as a novel vaccination route for therapeutic vaccines of head and neck squamous cell carcinomas using plasmid virus-like particles. *OncoImmunology* *5*, e1164363.

Madan, R.A., Heery, C.R., and Gulley, J.L. (2012). Combination of vaccine and immune checkpoint inhibitor is safe with encouraging clinical activity. *Oncoimmunology* *1*, 1167–1168.

Maeda, H., and Shiraishi, A. (1996). TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *156*, 73–78.

Mandruzzato, S., Brasseur, F., Andry, G., Boon, T., and van der Bruggen, P. (1997). A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J. Exp. Med.* *186*, 785–793.

Marshall, J.L., Hoyer, R.J., Toomey, M.A., Faraguna, K., Chang, P., Richmond, E., Pedicano, J.E., Gehan, E., Peck, R.A., Arlen, P., et al. (2000). Phase I study in advanced cancer patients of a diversified prime-and-boost vaccination protocol using recombinant vaccinia virus and recombinant nonreplicating avipox virus to elicit anti-carcinoembryonic antigen immune responses. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *18*, 3964–3973.

Martinez-Pomares, L. (2012). The mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.* *92*, 1177–1186.

Martins, I., Tesniere, A., Kepp, O., Michaud, M., Schlemmer, F., Senovilla, L., S ror, C., M tivier, D., Perfettini, J.-L., Zitvogel, L., et al. (2009). Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle Georget. Tex* *8*, 3723–3728.

Matzner, P., Sorski, L., Shaashua, L., Elbaz, E., Lavon, H., Melamed, R., Rosenne, E., Gotlieb, N., Benbenishty, A., Reed, S.G., et al. (2016). Perioperative treatment with the new synthetic TLR-4 agonist GLA-SE reduces cancer metastasis without adverse effects. *Int. J. Cancer* *138*, 1754–1764.

Mc Dermott, R., Ziylan, U., Spehner, D., Bausinger, H., Lipsker, D., Mommaas, M., Cazenave, J.-P., Raposo, G., Goud, B., de la Salle, H., et al. (2002). Birbeck granules are subdomains of endosomal recycling compartment in human epidermal Langerhans cells, which form where Langerin accumulates. *Mol. Biol. Cell* *13*, 317–335.

McCarter, M.D., Baumgartner, J., Escobar, G.A., Richter, D., Lewis, K., Robinson, W., Wilson, C., Palmer, B.E., and Gonzalez, R. (2007). Immunosuppressive dendritic and regulatory T cells are upregulated in melanoma patients. *Ann. Surg. Oncol.* *14*, 2854–2860.

McCoy, K.D., and Le Gros, G. (1999). The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunol. Cell Biol.* *77*, 1–10.

McDonnell, A.M., Prosser, A.C., van Bruggen, I., Robinson, B.W.S., and Currie, A.J. (2010). CD8alpha+ DC are not the sole subset cross-presenting cell-associated tumor antigens from a solid tumor. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1617–1627.

McGranahan, N., Furness, A.J.S., Rosenthal, R., Ramskov, S., Lyngaa, R., Saini, S.K., Jamal-Hanjani, M., Wilson, G.A., Birkbak, N.J., Hiley, C.T., et al. (2016). Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* *351*, 1463–1469.

Medema, J.P., Jong, J. de, Peltenburg, L.T.C., Verdegaal, E.M.E., Gorter, A., Bres, S.A., Franken, K.L.M.C., Hahne, M., Albar, J.P., Melief, C.J.M., et al. (2001). Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 11515–11520.

Menetrier-Caux, C., Montmain, G., Dieu, M.C., Bain, C., Favrot, M.C., Caux, C., and Blay, J.Y. (1998). Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* *92*, 4778–4791.

Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 563–604.

Meyer-Wentrup, F., Benitez-Ribas, D., Tacke, P.J., Punt, C.J.A., Figdor, C.G., Vries, I.J.M. de, and Adema, G.J. (2008). Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells

results in antigen presentation and inhibits IFN- α production. *Blood* *111*, 4245–4253.

Midoux, P., and Pichon, C. (2015). Lipid-based mRNA vaccine delivery systems. *Expert Rev. Vaccines* *14*, 221–234.

Morse, M.A., Bradley, D.A., Keler, T., Laliberte, R.J., Green, J.A., Davis, T.A., and Inman, B.A. (2011). CDX-1307: a novel vaccine under study as treatment for muscle-invasive bladder cancer. *Expert Rev. Vaccines* *10*, 733–742.

Morvan, M.G., and Lanier, L.L. (2016). NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 7–19.

Nair, S., Archer, G.E., and Tedder, T.F. (2012). ISOLATION AND GENERATION OF HUMAN DENDRITIC CELLS. *Curr. Protoc. Immunol.* Ed. John E Coligan A1 0 7, Unit7.32.

Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., and Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *J. Biosci.* *31*, 137–155.

Naugler, W.E., Sakurai, T., Kim, S., Maeda, S., Kim, K., Elsharkawy, A.M., and Karin, M. (2007). Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* *317*, 121–124.

Neeland, M.R., Elhay, M.J., Meeusen, E.N.T., and de Veer, M.J. (2014). Vaccination with liposomal poly(I:C) induces discordant maturation of migratory dendritic cell subsets and anti-viral gene signatures in afferent lymph cells. *Vaccine* *32*, 6183–6192.

Nesselhut, J., Marx, D., Lange, H., Regalo, G., Cillien, N., Chang, R.Y., and Nesselhut, T. (2016). Systemic treatment with anti-PD-1 antibody nivolumab in combination with vaccine therapy in advanced pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* *34*.

Nguyen, L.T., Elford, A.R., Murakami, K., Garza, K.M., Schoenberger, S.P., Odermatt, B., Speiser, D.E., and Ohashi, P.S. (2002). Tumor growth enhances cross-

presentation leading to limited T cell activation without tolerance. *J. Exp. Med.* 195, 423–435.

Ni, L., Gayet, I., Zurawski, S., Duluc, D., Flamar, A.-L., Li, X.-H., O'Bar, A., Clayton, S., Palucka, A.K., Zurawski, G., et al. (2010). Concomitant activation and antigen uptake via human Dectin-1 results in potent antigen-specific CD8⁺ T cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 3504–3513.

Nishimura, T., Togashi, Y., Goto, M., Yagi, H., Uchiyama, Y., and Hashimoto, Y. (1986). Augmentation of the therapeutic efficacy of adoptive tumor immunotherapy by in vivo administration of slowly released recombinant interleukin 2. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 21, 12–18.

O'Hagan, D.T., and Fox, C.B. (2015). New generation adjuvants – From empiricism to rational design. *Vaccine* 33, *Supplement 2*, B14–B20.

Ohm, J.E., Gabrilovich, D.I., Sempowski, G.D., Kisseleva, E., Parman, K.S., Nadaf, S., and Carbone, D.P. (2003). VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* 101, 4878–4886.

O'Keeffe, M., Mok, W.H., and Radford, K.J. (2015). Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 4309–4325.

Olson, B.M., Frye, T.P., Johnson, L.E., Fong, L., Knutson, K.L., Disis, M.L., and McNeel, D.G. (2010). HLA-A2-restricted T-cell epitopes specific for prostatic acid phosphatase. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 59, 943–953.

Ormandy, L.-A., Farber, A., Cantz, T., Petrykowska, S., Wedemeyer, H., Horning, M., Lehner, F., Manns, M.-P., Korangy, F., and Greten, T.-F. (2006). Direct ex vivo analysis of dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 12, 3275–3282.

Orsini, G., Legitimo, A., Failli, A., Ferrari, P., Nicolini, A., Spisni, R., Miccoli, P., and Consolini, R. (2014). Quantification of blood dendritic cells in colorectal cancer patients

during the course of disease. *Pathol. Oncol. Res. POR* 20, 267–276.

Palucka, K., and Banchereau, J. (2013). Dendritic cell-based cancer therapeutic vaccines. *Immunity* 39, 38–48.

Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 12, 252–264.

Parkhurst, M.R., Riley, J.P., Dudley, M.E., and Rosenberg, S.A. (2011). Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 6287–6297.

Passoni, L., and Gambacorti-Passerini, C. (2003). ALK a novel lymphoma-associated tumor antigen for vaccination strategies. *Leuk. Lymphoma* 44, 1675–1681.

Pedra, J.H., Cassel, S.L., and Sutterwala, F.S. (2009). Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 10–16.

Péguet-Navarro, J., Sportouch, M., Popa, I., Berthier, O., Schmitt, D., and Portoukalian, J. (2003). Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 3488–3494.

Peoples, G.E., Goedegebuure, P.S., Smith, R., Linehan, D.C., Yoshino, I., and Eberlein, T.J. (1995). Breast and ovarian cancer-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER2/neu-derived peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 432–436.

Perche, F., Benvegna, T., Berchel, M., Lebegue, L., Pichon, C., Jaffrès, P.-A., and Midoux, P. (2011). Enhancement of dendritic cells transfection in vivo and of vaccination against B16F10 melanoma with mannosylated histidylated lipopolyplexes loaded with tumor antigen messenger RNA. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 7, 445–453.

Picco, G., Beatson, R., Taylor-Papadimitriou, J., and Burchell, J.M. (2014). Targeting DNNGR-1 (CLEC9A) with antibody/MUC1 peptide conjugates as a vaccine for carcinomas. *Eur. J. Immunol.* *44*, 1947–1955.

Pol, J., Bloy, N., Buqué, A., Eggermont, A., Cremer, I., Sautès-Fridman, C., Galon, J., Tartour, E., Zitvogel, L., Kroemer, G., et al. (2015). Trial Watch: Peptide-based anticancer vaccines. *OncoImmunology* *4*, e974411.

Prehn, R.T. (1975). Relationship of tumor immunogenicity to concentration of the oncogen. *J. Natl. Cancer Inst.* *55*, 189–190.

Prehn, R.T., and Main, J.M. (1957). Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.* *18*, 769–778.

Prica, A., Baldassarre, F., Hicks, L.K., Imrie, K., Kouroukis, T., and Cheung, M. Rituximab in Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukaemia: A Practice Guideline. *Clin. Oncol.*

Probst, H.C., Lagnel, J., Kollias, G., and van den Broek, M. (2003). Inducible Transgenic Mice Reveal Resting Dendritic Cells as Potent Inducers of CD8⁺ T Cell Tolerance. *Immunity* *18*, 713–720.

Probst, H.C., McCoy, K., Okazaki, T., Honjo, T., and van den Broek, M. (2005). Resting dendritic cells induce peripheral CD8⁺ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat. Immunol.* *6*, 280–286.

Qian, B.-Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L.R., Kaiser, E.A., Snyder, L.A., and Pollard, J.W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* *475*, 222–225.

Qin, Z., and Blankenstein, T. (2004). A cancer immunosurveillance controversy. *Nat. Immunol.* *5*, 3–4.

Ratta, M., Rondelli, D., Fortuna, A., Curti, A., Fogli, M., Fagnoni, F., Martinelli, G., Terragna, C., Tura, S., and Lemoli, R.M. (1998). Generation and functional characterization of human dendritic cells derived from CD34 cells mobilized into peripheral blood: comparison with bone marrow CD34+ cells. *Br. J. Haematol.* *101*, 756–765.

Ratta, M., Fagnoni, F., Curti, A., Vescovini, R., Sansoni, P., Oliviero, B., Fogli, M., Ferri, E., Della Cuna, G.R., Tura, S., et al. (2002). Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood* *100*, 230–237.

Remark, R., Lupo, A., Alifano, M., Biton, J., Ouakrim, H., Stefani, A., Cremer, I., Goc, J., Régnard, J.-F., Dieu-Nosjean, M.-C., et al. (2016). Immune contexture and histological response after neoadjuvant chemotherapy predict clinical outcome of lung cancer patients. *Oncoimmunology* *5*, e1255394.

Robbins, P.F., El-Gamil, M., Li, Y.F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., and Rosenberg, S.A. (1996). A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* *183*, 1185–1192.

Robert, C., Schachter, J., Long, G.V., Arance, A., Grob, J.J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C., Lotem, M., et al. (2015). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *372*, 2521–2532.

Robertson, J.M., Jensen, P.E., and Evavold, B.D. (2000). DO11.10 and OT-II T Cells Recognize a C-Terminal Ovalbumin 323–339 Epitope. *J. Immunol.* *164*, 4706–4712.

Rodríguez-Calvillo, M., Duarte, M., Tirapu, I., Berraondo, P., Mazzolini, G., Qian, C., Prieto, J., and Melero, I. (2002). Upregulation of natural killer cells functions underlies the efficacy of intratumorally injected dendritic cells engineered to produce interleukin-12. *Exp. Hematol.* *30*, 195–204.

Rosenberg, S.A., Tong-On, P., Li, Y., Riley, J.P., El-Gamil, M., Parkhurst, M.R., and Robbins, P.F. (2002). Identification of BING-4 cancer antigen translated from an alternative open reading frame of a gene in the extended MHC class II region using lymphocytes from a

patient with a durable complete regression following immunotherapy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 2402–2407.

Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Phan, G.Q., Citrin, D.E., Restifo, N.P., Robbins, P.F., Wunderlich, J.R., et al. (2011). Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *17*, 4550–4557.

Roybal, K.T., Rupp, L.J., Morsut, L., Walker, W.J., McNally, K.A., Park, J.S., and Lim, W.A. (2016). Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell* *164*, 770–779.

Rüegg, C., Yilmaz, A., Bieler, G., Bamat, J., Chaubert, P., and Lejeune, F.J. (1998). Evidence for the involvement of endothelial cell integrin $\alpha V\beta 3$ in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN- γ . *Nat. Med.* *4*, 408–414.

Saadoun, D., Rosenzweig, M., Joly, F., Six, A., Carrat, F., Thibault, V., Sene, D., Cacoub, P., and Klatzmann, D. (2011). Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N. Engl. J. Med.* *365*, 2067–2077.

Sabado, R.L., Balan, S., and Bhardwaj, N. (2017). Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res.* *27*, 74–95.

Saint-Vis, B. de, Vincent, J., Vandenabeele, S., Vanbervliet, B., Pin, J.-J., Ait-Yahia, S., Patel, S., Mattei, M.-G., Banchereau, J., Zurawski, S., et al. (1998). A Novel Lysosome-Associated Membrane Glycoprotein, DC-LAMP, Induced upon DC Maturation, Is Transiently Expressed in MHC Class II Compartment. *Immunity* *9*, 325–336.

Sakakura, K., Chikamatsu, K., Takahashi, K., Whiteside, T.L., and Furuya, N. (2006). Maturation of circulating dendritic cells and imbalance of T-cell subsets in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *55*, 151–159.

Salazar-Onfray, F., Nakazawa, T., Chhajlani, V., Petersson, M., Kärre, K., Masucci, G., Celis, E., Sette, A., Southwood, S., Appella, E., et al. (1997). Synthetic peptides derived from the melanocyte-stimulating hormone receptor MC1R can stimulate HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes that recognize naturally processed peptides on human melanoma cells. *Cancer Res.* *57*, 4348–4355.

Sancho, D., and Reis e Sousa, C. (2013). Sensing of cell death by myeloid C-type lectin receptors. *Curr. Opin. Immunol.* *25*, 46–52.

Sancho, D., Mourão-Sá, D., Joffre, O.P., Schulz, O., Rogers, N.C., Pennington, D.J., Carlyle, J.R., and Sousa, C.R. e (2008). Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J. Clin. Invest.* *118*, 2098–2110.

Sancho, D., Joffre, O.P., Keller, A.M., Rogers, N.C., Martínez, D., Hernanz-Falcón, P., Rosewell, I., and Reis e Sousa, C. (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* *458*, 899–903.

Scarlett, U.K., Rutkowski, M.R., Rauwerdink, A.M., Fields, J., Escovar-Fadul, X., Baird, J., Cubillos-Ruiz, J.R., Jacobs, A.C., Gonzalez, J.L., Weaver, J., et al. (2012). Ovarian cancer progression is controlled by phenotypic changes in dendritic cells. *J. Exp. Med.* *209*, 495–506.

Schalper, K.A., Carvajal-Hausdorf, D., McLaughlin, J., Altan, M., Velcheti, V., Gaule, P., Sanmamed, M.F., Chen, L., Herbst, R.S., and Rimm, D.L. (2016). Differential expression and significance of PD-L1, IDO-1 and B7-H4 in human lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*

Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* *348*, 69–74.

Sciarra, A., Lichtner, M., Autran, G.A., Mastroianni, C., Rossi, R., Mengoni, F., Cristini, C., Gentilucci, A., Vullo, V., and Di Silverio, F. (2007). Characterization of circulating blood dendritic cell subsets DC123+ (lymphoid) and DC11C+ (myeloid) in

prostate adenocarcinoma patients. *The Prostate* 67, 1–7.

Segal, N.H., Logan, T.F., Hodi, F.S., McDermott, D.F., Melero, I., Hamid, O., Schmidt, H., Robert, C., Chiarion-Sileni, V., Ascierto, P.A., et al. (2016). Results From an Integrated Safety Analysis of Urelumab, an Agonist Anti-CD137 Monoclonal Antibody. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*

Segura, E., and Amigorena, S. (2013). Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* 34, 440–445.

Segura, E., and Amigorena, S. (2015). Chapter One - Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells. In *Advances in Immunology*, F.W. Alt, ed. (Academic Press), pp. 1–31.

Seo, Y., Matozaki, T., Tsuda, M., Hayashi, Y., Itoh, H., and Kasuga, M. (1997). Overexpression of SAP-1, a transmembrane-type protein tyrosine phosphatase, in human colorectal cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 705–711.

Seymour, M.T., Brown, S.R., Middleton, G., Maughan, T., Richman, S., Gwyther, S., Lowe, C., Seligmann, J.F., Wadsley, J., Maisey, N., et al. (2013). Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): a prospectively stratified randomised trial. *Lancet Oncol.* 14, 749–759.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107–1111.

Shaw, A.T., Kim, D.-W., Nakagawa, K., Seto, T., Crinó, L., Ahn, M.-J., De Pas, T., Besse, B., Solomon, B.J., Blackhall, F., et al. (2013). Crizotinib versus Chemotherapy in Advanced ALK-Positive Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 368, 2385–2394.

Shen, L., Higuchi, T., Tubbe, I., Voltz, N., Krummen, M., Pektor, S., Montermann, E.,
170

Rausch, K., Schmidt, M., Schild, H., et al. (2013). A trifunctional dextran-based nanovaccine targets and activates murine dendritic cells, and induces potent cellular and humoral immune responses in vivo. *PLoS One* 8, e80904.

Shevach, E.M. (2009). Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity* 30, 636–645.

Shi, M., Chen, X., Ye, K., Yao, Y., and Li, Y. (2016). Application potential of toll-like receptors in cancer immunotherapy. *Medicine (Baltimore)* 95.

Shortman, K., and Heath, W.R. (2010). The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.* 234, 18–31.

Shortman, K., Sathe, P., Vremec, D., Naik, S., and O’Keeffe, M. (2013). Plasmacytoid dendritic cell development. *Adv. Immunol.* 120, 105–126.

Singh, S.K., Streng-Ouwehand, I., Litjens, M., Kalay, H., Burgdorf, S., Saeland, E., Kurts, C., Unger, W.W., and van Kooyk, Y. (2011). Design of neo-glycoconjugates that target the mannose receptor and enhance TLR-independent cross-presentation and Th1 polarization. *Eur. J. Immunol.* 41, 916–925.

Slingluff, C.L. (2011). The Present and Future of Peptide Vaccines for Cancer: Single or Multiple, Long or Short, Alone or in Combination? *Cancer J. Sudbury Mass* 17, 343–350.

Smith, H.A., and McNeel, D.G. (2010). The SSX Family of Cancer-Testis Antigens as Target Proteins for Tumor Therapy. *J. Immunol. Res.* 2010.

Smorodin, E., Sergeyev, B., Klaamas, K., Chuzmarov, V., and Kurtenkov, O. (2013). The Relation of the Level of Serum Anti-TF, -Tn and -Alpha-Gal IgG to Survival in Gastrointestinal Cancer Patients. *Int. J. Med. Sci.* 10, 1674.

So, T., Takenoyama, M., Mizukami, M., Ichiki, Y., Sugaya, M., Hanagiri, T., Sugio, K., and Yasumoto, K. (2005). Haplotype Loss of HLA Class I Antigen as an Escape

Mechanism from Immune Attack in Lung Cancer. *Cancer Res.* 65, 5945–5952.

Soda, M., Choi, Y.L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., et al. (2007). Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448, 561–566.

Souders, N.C., Sewell, D.A., Pan, Z.-K., Hussain, S.F., Rodriguez, A., Wallecha, A., and Paterson, Y. (2007). Listeria-based vaccines can overcome tolerance by expanding low avidity CD8⁺ T cells capable of eradicating a solid tumor in a transgenic mouse model of cancer. *Cancer Immun. J. Acad. Cancer Immunol.* 7.

Spano, J.-P. (2005). Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann. Oncol.* 16, 102–108.

Stutman, O. (1975). Immunodepression and malignancy. *Adv. Cancer Res.* 22, 261–422.

Sullivan, B.A., Nagarajan, N.A., Wingender, G., Wang, J., Scott, I., Tsuji, M., Franck, R.W., Porcelli, S.A., Zajonc, D.M., and Kronenberg, M. (2010). Mechanisms for Glycolipid Antigen-Driven Cytokine Polarization by V α 14i NKT Cells. *J. Immunol.* 184, 141–153.

Surget, S., Khoury, M.P., and Bourdon, J.-C. (2013). Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective.

Svajger, U., Anderluh, M., Jeras, M., and Obermajer, N. (2010). C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell. Signal.* 22, 1397–1405.

Takayama, H., Nishimura, K., Tsujimura, A., Nakai, Y., Nakayama, M., Aozasa, K., Okuyama, A., and Nonomura, N. (2009). Increased infiltration of tumor associated macrophages is associated with poor prognosis of bladder carcinoma in situ after intravesical bacillus Calmette-Guerin instillation. *J. Urol.* 181, 1894–1900.

Tamura, T., Ohira, M., Tanaka, H., Muguruma, K., Toyokawa, T., Kubo, N., Sakurai, K., Amano, R., Kimura, K., Shibutani, M., et al. (2015). Programmed Death-1 Ligand-1 (PDL1) Expression Is Associated with the Prognosis of Patients with Stage II/III Gastric Cancer. *Anticancer Res.* 35, 5369–5376.

Tanchot, C., Terme, M., Pere, H., Tran, T., Benhamouda, N., Strioga, M., Banissi, C., Galluzzi, L., Kroemer, G., and Tartour, E. (2013). Tumor-infiltrating regulatory T cells: phenotype, role, mechanism of expansion in situ and clinical significance. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* 6, 147–157.

Teng, M.W.L., Ngiow, S.F., Ribas, A., and Smyth, M.J. (2015). Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* 75, 2139–2145.

Terme, M., Ullrich, E., Delahaye, N.F., Chaput, N., and Zitvogel, L. (2008). Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat. Immunol.* 9, 486–494.

Tesniere, A., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2009). The Immune System: Taming and Unleashing Cancer. *Discov. Med.* 6, 211–216.

Thomann, J.-S., Heurtault, B., Weidner, S., Brayé, M., Beyrath, J., Fournel, S., Schuber, F., and Frisch, B. (2011). Antitumor activity of liposomal ErbB2/HER2 epitope peptide-based vaccine constructs incorporating TLR agonists and mannose receptor targeting. *Biomaterials* 32, 4574–4583.

Thomas, L. (1982). On immunosurveillance in human cancer. *Yale J. Biol. Med.* 55, 329–333.

Thomas, D.A., and Massagué, J. (2005). TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8, 369–380.

Thompson, R.H., Gillett, M.D., Cheville, J.C., Lohse, C.M., Dong, H., Webster, W.S., Krejci, K.G., Lobo, J.R., Sengupta, S., Chen, L., et al. (2004). Costimulatory B7-H1 in renal

cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 17174–17179.

Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W.-H., Pagès, F., et al. (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* *71*, 1263–1271.

Touloukian, C.E., Leitner, W.W., Robbins, P.F., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (2001). Mining the melanosome for tumor vaccine targets: P.polypeptide is a novel tumor-associated antigen. *Cancer Res.* *61*, 8100–8104.

Touloukian, C.E., Leitner, W.W., Schnur, R.E., Robbins, P.F., Li, Y., Southwood, S., Sette, A., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (2003). Normal tissue depresses while tumor tissue enhances human T cell responses in vivo to a novel self/tumor melanoma antigen, OA1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 1579–1585.

Toussaint, B., Chauchet, X., Wang, Y., Polack, B., and Le Gouëllec, A. (2013). Live-attenuated bacteria as a cancer vaccine vector. *Expert Rev. Vaccines* *12*, 1139–1154.

Trimble, C.L., Morrow, M.P., Kraynyak, K.A., Shen, X., Dallas, M., Yan, J., Edwards, L., Parker, R.L., Denny, L., Giffear, M., et al. (2015). Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet Lond. Engl.* *386*, 2078–2088.

Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A., et al. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* *259*, 1745–1749.

Uyttenhove, C., Pilotte, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B.J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism

based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* 9, 1269–1274.

Vacchelli, E., Martins, I., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Sautès-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2012). Trial watch. *OncoImmunology* 1, 1557–1576.

Vacchelli, E., Eggermont, A., Sautès-Fridman, C., Galon, J., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013). Trial Watch: Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2, e25238.

Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., et al. (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12, 71–81.

Vasquez-Dunddel, D., Pan, F., Zeng, Q., Gorbounov, M., Albesiano, E., Fu, J., Blosser, R.L., Tam, A.J., Bruno, T., Zhang, H., et al. (2013). STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. *J. Clin. Invest.* 123, 1580–1589.

van der Veen, A.H., de Wilt, J.H.W., Eggermont, A.M.M., van Tiel, S.T., Seynhaeve, A.L.B., and ten Hagen, T.L.M. (2000). TNF- α augments intratumoural concentrations of doxorubicin in TNF- α -based isolated limb perfusion in rat sarcoma models and enhances anti-tumour effects. *Br. J. Cancer* 82, 973–980.

Vici, P., Pizzuti, L., Mariani, L., Zampa, G., Santini, D., Di Lauro, L., Gamucci, T., Natoli, C., Marchetti, P., Barba, M., et al. (2016). Targeting immune response with therapeutic vaccines in premalignant lesions and cervical cancer: hope or reality from clinical studies. *Expert Rev. Vaccines* 15, 1327–1336.

Villegas, F.R., Coca, S., Villarrubia, V.G., Jiménez, R., Chillón, M.J., Jareño, J., Zuñil, M., and Callol, L. (2002). Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 35, 23–28.

Vingert, B., Adotevi, O., Patin, D., Jung, S., Shrikant, P., Freyburger, L., Eppolito, C., Sapoznikov, A., Amessou, M., Quintin-Colonna, F., et al. (2006). The Shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity. *Eur. J. Immunol.* *36*, 1124–1135.

Vonderheide, R.H. (2002). Telomerase as a universal tumor-associated antigen for cancer immunotherapy. *Oncogene* *21*, 674–679.

Wagner, S., Wittekindt, C., Reuschenbach, M., Hennig, B., Thevarajah, M., Würdemann, N., Prigge, E.-S., von Knebel Doeberitz, M., Dreyer, T., Gattenlöhner, S., et al. (2016). CD56-positive lymphocyte infiltration in relation to human papillomavirus association and prognostic significance in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* *138*, 2263–2273.

Waisman, A., Lukas, D., Clausen, B.E., and Yogev, N. (2016). Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. *Semin. Immunopathol.* 1–11.

Waldhauer, I., and Steinle, A. (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* *27*, 5932–5943.

Waldmann, T.A. (2015). The shared and contrasting roles of interleukin-2 (IL-2) and IL-15 in the life and death of normal and neoplastic lymphocytes: implications for cancer therapy. *Cancer Immunol. Res.* *3*, 219–227.

Walton, S.M., Gerlinger, M., de la Rosa, O., Nuber, N., Knights, A., Gati, A., Laumer, M., Strauss, L., Exner, C., Schäfer, N., et al. (2006). Spontaneous CD8 T cell responses against the melanocyte differentiation antigen RAB38/NY-MEL-1 in melanoma patients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 8212–8218.

Wandall, H.H., Blixt, O., Tarp, M.A., Pedersen, J.W., Bennett, E.P., Mandel, U., Ragupathi, G., Livingston, P.O., Hollingsworth, M.A., Taylor-Papadimitriou, J., et al. (2010). Cancer Biomarkers Defined by Autoantibody Signatures to Aberrant O-Glycopeptide Epitopes. *Cancer Res.* *70*, 1306–1313.

Wang, R.-F., and Wang, H.Y. (2017). Immune targets and neoantigens for cancer immunotherapy and precision medicine. *Cell Res.* 27, 11–37.

Wang, R.F., Appella, E., Kawakami, Y., Kang, X., and Rosenberg, S.A. (1996). Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 184, 2207–2216.

Wang, S., Sun, M., Gu, C., Wang, X., Chen, D., Zhao, E., Jiao, X., and Zheng, J. (2014). Expression of CD163, interleukin-10, and interferon-gamma in oral squamous cell carcinoma: mutual relationships and prognostic implications. *Eur. J. Oral Sci.* 122, 202–209.

Wang, W., Epler, J., Salazar, L.G., and Riddell, S.R. (2006). Recognition of breast cancer cells by CD8+ cytotoxic T-cell clones specific for NY-BR-1. *Cancer Res.* 66, 6826–6833.

Wang, Y., Deng, B., Tang, W., Liu, T., and Shen, X. (2013). TGF- β 1 secreted by hepatocellular carcinoma induces the expression of the Foxp3 gene and suppresses antitumor immunity in the tumor microenvironment. *Dig. Dis. Sci.* 58, 1644–1652.

Wilgenhof, S., Van Nuffel, A.M.T., Corthals, J., Heirman, C., Tuyaerts, S., Benteyn, D., De Coninck, A., Van Riet, I., Verfaillie, G., Vandeloos, J., et al. (2011). Therapeutic vaccination with an autologous mRNA electroporated dendritic cell vaccine in patients with advanced melanoma. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* 34, 448–456.

Willimsky, G., and Blankenstein, T. (2005). Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* 437, 141–146.

Winerdal, M.E., Marits, P., Winerdal, M., Hasan, M., Rosenblatt, R., Tolf, A., Selling, K., Sherif, A., and Winqvist, O. (2011). FOXP3 and survival in urinary bladder cancer. *BJU Int.* 108, 1672–1678.

Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wölfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Büschenfelde, K.H., and Beach, D. (1995). A p16INK4a-

insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269, 1281–1284.

Wollenberg, A., Opperl, T., Schottdorf, E.-M., Günther, S., Moderer, M., and Mommaas, M. (2002). Expression and Function of the Mannose Receptor CD206 on Epidermal Dendritic Cells in Inflammatory Skin Diseases. *J. Invest. Dermatol.* 118, 327–334.

Wood, L.M., and Paterson, Y. (2014). Attenuated *Listeria monocytogenes*: a powerful and versatile vector for the future of tumor immunotherapy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4.

Yamamoto, T., Hattori, M., and Yoshida, T. (2007). Induction of T-cell activation or anergy determined by the combination of intensity and duration of T-cell receptor stimulation, and sequential induction in an individual cell. *Immunology* 121, 383–391.

Yamamoto, T., Yanagimoto, H., Satoi, S., Toyokawa, H., Yamao, J., Kim, S., Terakawa, N., Takahashi, K., and Kwon, A.-H. (2012). Circulating myeloid dendritic cells as prognostic factors in patients with pancreatic cancer who have undergone surgical resection. *J. Surg. Res.* 173, 299–308.

Yang, B., Jeang, J., Yang, A., Wu, T.C., and Hung, C.-F. (2015). DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Hum. Vaccines Immunother.* 10, 3153–3164.

Yang, J.C., Hughes, M., Kammula, U., Royal, R., Sherry, R.M., Topalian, S.L., Suri, K.B., Levy, C., Allen, T., Mavroukakis, S., et al. (2007). Ipilimumab (Anti-CTLA4 Antibody) Causes Regression of Metastatic Renal Cell Cancer Associated With Enteritis and Hypophysitis. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 30, 825–830.

Yang, L., Yang, H., Rideout, K., Cho, T., Joo, K.I., Ziegler, L., Elliot, A., Walls, A., Yu, D., Baltimore, D., et al. (2008). Engineered lentivector targeting of dendritic cells for in vivo immunization. *Nat. Biotechnol.* 26, 326–334.

Yeo, B., Kotsori, K., Mohammed, K., Walsh, G., and Smith, I.E. (2015). Long-term outcome of HER2 positive metastatic breast cancer patients treated with first-line

trastuzumab. *Breast Edinb. Scotl.* 24, 751–757.

Yogev, N., Frommer, F., Lukas, D., Kautz-Neu, K., Karram, K., Ielo, D., von Stebut, E., Probst, H.-C., van den Broek, M., Riethmacher, D., et al. (2012). Dendritic cells ameliorate autoimmunity in the CNS by controlling the homeostasis of PD-1 receptor(+) regulatory T cells. *Immunity* 37, 264–275.

Yu, M., Zhan, Q., and Finn, O.J. (2002). Immune recognition of cyclin B1 as a tumor antigen is a result of its overexpression in human tumors that is caused by non-functional p53. *Mol. Immunol.* 38, 981–987.

Zarour, H.M., DeLeo, A., Finn, O.J., and Storkus, W.J. (2003). Categories of Tumor Antigens.

Zhang, J.-G., Czabotar, P.E., Policheni, A.N., Caminschi, I., Wan, S.S., Kitsoulis, S., Tullett, K.M., Robin, A.Y., Brammananth, R., van Delft, M.F., et al. (2012). The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments. *Immunity* 36, 646–657.

Zhang, Q., Qin, J., Zhong, L., Gong, L., Zhang, B., Zhang, Y., and Gao, W.-Q. (2015a). CCL5-Mediated Th2 Immune Polarization Promotes Metastasis in Luminal Breast Cancer. *Cancer Res.* 75, 4312–4321.

Zhang, Q.-A., Chen, Z.-Q., Chen, M.-H., and Xu, Z.-D. (2014). The number of regular T cells and immature dendritic cells involved in mycosis fungoides is linked to the tumor stage. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 18, 553–558.

Zhang, X., Sharma, P.K., Peter Goedegebuure, S., and Gillanders, W.E. Personalized cancer vaccines: Targeting the cancer mutanome. *Vaccine*.

Zhang, X.-F., Pan, K., Weng, D.-S., Chen, C.-L., Wang, Q.-J., Zhao, J.-J., Pan, Q.-Z., Liu, Q., Jiang, S.-S., Li, Y.-Q., et al. (2016). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 expression in esophageal carcinoma: implications for prognosis. *Oncotarget* 7, 26670–26679.

Zhang, Z., Huang, J., Zhang, C., Yang, H., Qiu, H., Li, J., Liu, Y., Qin, L., Wang, L., Hao, S., et al. (2015b). Infiltration of dendritic cells and T lymphocytes predicts favorable outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Gene Ther.* 22, 198–206.

Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 715–727.

(2003). Tolerogenic Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 685–711.

Peptide Database | Cancer Immunity.

[Développement d'une stratégie de vaccination thérapeutique antitumorale basée sur l'utilisation de lipopolyplexes à ARN ciblant les cellules dendritiques]

Résumé :

L'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire repose sur la capacité des cellules dendritiques à correctement présenter l'antigène aux cellules effectrices. Nous avons donc développé une stratégie de vaccination thérapeutique basée sur des lipopolyplexes à ARNm (LPRs) : l'ARNm codant pour l'antigène est associé à un complexe de polylysine histidylée, et incorporé dans un liposome trimannosylé afin de mieux cibler les cellules dendritiques. En effet, les cellules dendritiques expriment largement les lectines de type C, qui sont des récepteurs reconnaissant principalement des résidus mannose. Dans le travail présenté ici, nous montrons que les LPR trimannosylés sont capables de fixer les cellules dendritiques humaines et murines. De manière très intéressante, nous montrons aussi que les LPR trimannosylés injectés chez la souris induisent le recrutement et l'activation de cellules dendritiques dans le ganglion drainant. De plus, quand les LPR trimannosylés vectorisent un ARNm codant pour l'antigène tumoral E7, ils sont capables d'induire une réponse T spécifique d'E7 au niveau systémique. Enfin, les LPRs trimannosylés permettent une réponse thérapeutique lorsqu'ils sont utilisés dans trois différents modèles de tumeurs : le modèle TC1 de carcinome exprimant E7, le modèle B16 de mélanome exprimant MART1 et le modèle EG7 de lymphome exprimant OVA. Cette stratégie apparaît donc prometteuse comme thérapie innovante anti-cancer.

Mots clés : [vaccination thérapeutique, cancer, immunothérapie, cellule dendritique, lipopolyplexe à ARNm, LPR]

[Preclinical Evaluation of Trimannosylated mRNA Lipopolyplexes as Therapeutic Cancer Vaccines Targeting Dendritic-Cells]

Abstract:

Elimination of cancer cells requires an efficient cytotoxic immune response. In order to obtain such a response, antigens need to be uptaken by dendritic cells (DCs) and correctly presented to effector cells. We developed a strategy based on RNA lipopolyplexes (LPRs): antigenic mRNA is associated with a histidine-polylysine polyplex and incorporated in a trimannosylated liposome to better target dendritic cells (DCs) in vivo, as DCs express several C-Type lectin receptors that preferentially bind to mannose. Here, we report that trimannosylated LPRs are efficient to target both human and murine DCs. Interestingly, in vivo experiments reveal that trimannosylated LPRs not only target DCs but also induce their recruitment and activation in draining lymph nodes. Furthermore, when combined with mRNA encoding E7 oncoprotein from HPV16, trimannosylated LPRs trigger specific T-cell response against E7. Finally, when used as therapeutic vaccines in three different tumors models, LPRs promote curative therapeutic responses in E7-expressing TC1 tumor, in OVA-expressing EG7 lymphoma and in MART-1-expressing B16 melanoma, when combined with E7, OVA or MART-1 mRNA, respectively. Altogether, these results comfort us to considerate the use of this strategy for anti-cancer vaccine therapies.

Keywords: [therapeutic vaccination, cancer, immunotherapies, dendritic cell, mRNA lipopolyplexes, LPR]