

ANNÉE 2018

N° 18

THÈSE
Pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Delphine Robert

Présentée et soutenue publiquement le 15 juin 2018

Le développement de la vaccination peptidique en oncologie

Président : Mme Berthe-Marie IMBERT, Professeur de Virologie

Membres du jury : Mme Catherine RABU, Maître de Conférences en Pharmacologie
Mr Franck HALARY, Chercheur en Immunologie

Remerciements

Je remercie chaleureusement,

Madame Berthe-Marie IMBERT

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Madame Catherine RABU

Maitre de Conférences Universitaire

Pour avoir accepté de diriger ce travail de thèse, dont le sujet est largement inspiré du travail que j'ai pu réalisé dans son équipe. Egaleme nt pour sa bienveillance et sa disponibilité à mon égard lors de l'encadrement de cette thèse, et en particulier lors du stage de 5^{ème} année de Pharmacie, qui m'a imergé dans le monde passionnant de la vaccination thérapeutique.

Monsieur Franck HALARY

Chargé de Recherche 1^{ère} classe

Pour avoir gentilleme nt accepté de faire partie de ce jury, et pour m'avoir permis de faire mes premiers pas dans la recherche au sein de son équipe, qui ont été déterminants dans la suite de mon parcours.

Je remercie également,

Mes parents, pour m'avoir soutenu tout au long de mes études de Pharmacie et pour m'avoir permis de rédiger cette thèse dans des conditions optimales

Mes ami(e)s de la faculté de Pharmacie de Nantes grâce auxquels j'ai adoré mes années de fac (et on ne va pas s'arrêter en si bon chemin !)

Marie, Juliette et Tom, pour notre longue et précieuse amitié, qui je l'espère se prolongera jusqu'à une future coloc' en maison de retraite

Léo, pour tout le bonheur que tu m'apportes et l'avenir devant nous

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
APC	Cellule présentatrice d'antigène
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine Triphosphate
BCR	Récepteur des lymphocytes B
CAR-T	Chimeric Antigen Receptor Lymphocyte
CD28	Récepteur de costimulation exprimé par les lymphocytes T, ligand de CD80 et CD86
CD74 / li	Chaîne invariante impliquée dans la voie d'apprêtement CMHII
CD80	Molécule de costimulation exprimée par les DC, ligands de CD28 et CTLA4
CD86	Molécule de costimulation exprimée par les DC, ligands de CD28 et CTLA4
CEA	Antigène carcino-embryonnaire
CLIP	Peptide invariant associé au CMHII, issu de CD74/li
CMHI	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I
CMHII	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II
CpG-ODN	Ligand TLR9
CPP	Peptide pénétrant les cellules
CTLA4	Récepteur inhibiteur exprimé par les lymphocytes T, ligand de CD80, CD86
Cx43	Connexine 43
DAMPs	Danger Associated Molecular Patterns
DC	Cellules dendritiques
EGFRvIII	Variant du récepteur de classe III du facteur de croissance épithélial
ELISPOT	Enzyme like immunospot assay
EMA	Agence du médicament Européenne
ERAP	Aminopeptidase du reticulum endoplasmique
FAS	Protéine transmembranaire de la famille du TNF médiant la mort cellulaire
FASL	Ligand de FAS
GM-CSF	Facteur stimulant les colonies de granulocytes et macrophages
Gp100	Antigène de différenciation mélanocytaire
HER-2	Récepteur 2 au facteur de croissance épithélial
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPLC/MS	Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse
hTERT	Sous unité alpha de la télor
IFA	Adjuvant incomplet de Freund
IFN γ	Interféron gamma
IFN α	Interféron alpha
li-key	Fragment d'Ii impliqué dans la fixation sur le CMHII
IL-1	Interleukine 1, cytokine proinflammatoire
IL-12	Interleukine 12, induit la différenciation des TCD4+ en Th1
IL-2	Interleukine 2, facteur d'activation lymphocytaire
IL-4	Interleukine 4, cytokine favorisant la génération de Th2

IL-6	Interleukine 6, cytokine proinflammatoire
IM	Intramusculaire
IRAP	Aminopeptidase régulée par l'insuline
IV	Intraveineuse
KLH	Heyhole lymphlet protein
KLH	Keyhole Lymphet Protein
LCMV	Virus de la chorioméningite lymphocytaire
LMP2	Xénoantigène tumoral du virus Epstein Barr
LPS	Lipopolysaccharide
LRP1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
LTC	Lymphocyte T cytotoxique
MAGE	Antigènes associés aux mélanomes
MALT	Tissu lymphoïde commun aux muqueuses
MAPK	Mitogen Associated Protein kinase
MDSC	Cellules myéloïdes immunosuppressives
MelanA	Antigène tumoral, MART-1
MELOE	Antigène surexprimé dans les cellules de mélanome
MPLA	Ligand TLR4
MUC	Mucine 1 associée à la surface cellulaire
NK	Cellule tueuse naturelle
NLCSC	Cancer du poumon non à petites cellules
NY-ESO-1	Antigène tumoral du groupe cancer testis
p53	Proteine 53
PADRE	panDR epitope
Pam3Cys	Ligand TLR2
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PD1	Protéine programmant la mort cellulaire 1
PDL1	Ligand de PD1
PGE2	Prostaglandine E2
PLA	Acide polylactique
PLG	Acide polyglycolique
PLGA	Acide polylacticoglycolique
PolyICLC	Ligand TLR3
Pr3	Antigène tumoral
PRb	Protéine du rétinoblastome
PRR	Pattern Recognition Receptor
RAS	Protéine de la voie des MAPK
RE	Reticulum endoplasmique
SC	Sous cutané
SEREX	Serological analysis of recombinant expression libraries with autologous serum
T CD4+	Lymphocyte T CD4+
T CD8+	Lymphocyte T CD8+
TAP	Transporter Associated with Antigen presentation
TCR	Récepteur des lymphocytes T
TGF-B	Facteur de croissance tumoral B
Th	Lymphocyte T auxiliaires

TIL	Lymphocyte T infiltrant les tumeurs
TIM3	Antigène tumoral
TLR	Toll Like Receptor
TNF α	Tumor necrosis α
TRM	T mémoires résidants
UV1	Epitope universel CD4 d'hTERT
WT1	Wilm's Tumor 1

TABLE DES MATIERES

Introduction : Qu'est-ce qu'un cancer ?	9
Partie 1 : L'immunité antitumorale	14
1.1. Système immunitaire et cancer	14
1.1.1. Les acteurs de l'immunité antitumorale	14
1.1.2. L'immunosurveillance – immunoédition tumorale	19
1.2. Focus sur la présentation antigénique des antigènes tumoraux	23
1.2.1. Les antigènes tumoraux	23
1.2.1.1. Profil d'expression des antigènes tumoraux	23
1.2.1.2. Epitopes peptidiques et répertoire T	24
1.2.2. Les voies de présentation antigénique	26
1.2.2.1. Voies classiques de présentation des antigènes sur les CMHI et CMHII	26
1.2.2.2. Présentation croisée d'antigènes exogènes sur le CMHI	28
1.2.2.3. Compétition entre les voies de présentation	30
1.2.2.4. Autres modes de présentation antigénique	33
1.3 Les mécanismes d'échappement tumoraux	35
Partie 2 : La vaccination thérapeutique antitumorale	36
2.1 Place de la vaccination dans les traitements antitumoraux	36
2.1.1. Les grandes classes thérapeutiques antitumorales	36
2.1.2 Les immunothérapies	37
2.1.2.1. Les cytokines	37
2.1.2.2. Les anticorps monoclonaux	37
2.1.2.3. Les thérapies cellulaires	39
2.1.2.4. Les vaccins	41
2.2. La vaccination thérapeutique antitumorale	43
2.2.1. Historique de la vaccination	43
2.2.2. Les stratégies vaccinales antitumorales	45
2.2.2.1. Les vaccins « tumoraux »	45
2.2.2.2. Les vaccins nucléiques	46
2.2.2.3. Les vaccins peptidiques	46
2.2.2.4. Les vaccins cellulaires	46
2.2.3 Leçons et perspectives du développement de vaccins thérapeutiques antitumoraux	48

Partie 3 : Le développement des vaccins peptidiques	50
3.1. Détermination de la stratégie antigénique	50
3.1.1. Méthodes d'identification des antigènes tumoraux	50
3.1.1.1. Méthodes de screening génétiques	50
3.1.1.2. Approche protéomique par HPLC/MS	52
3.1.1.3. Vaccinologie inverse : Prédiction d'épitopes in silico	53
3.1.2. Rationnel de la stratégie antigénique vaccinale	54
3.1.3. Sources novatrices d'épitopes	57
3.1.3.1. Epitopes cryptiques	57
3.1.3.2. Epitopes de séquences géniques non codantes	58
3.2. Optimisation de la construction antigénique	59
3.2.1. Limites des « anciens » vaccins peptidiques	59
3.2.2.1. L'importance de la longueur du peptide	60
3.2.2.2. L'importance de multiples épitopes CD8/CD4	60
3.2.2. Les nouvelles constructions peptidiques	62
3.2.2.1. Amélioration de l'affinité sur le CMH I par modification d'acides aminés	63
3.2.2.2. Abolition de la restriction HLA par usage d'épitopes CD4 universels	65
3.2.2.3. Amélioration de la présentation CMH II par li-key	67
3.2.2.4. Amélioration de la génération d'épitopes par linker optimisé	68
3.3 Optimisation de la formulation vaccinale	69
3.3.1. L'importance de la formulation adjuvante	69
3.3.1.1. Les différents types d'adjuvants	69
3.3.1.2. Limites des « anciens » adjuvants	70
3.3.2. Polarisation vers une réponse cellulaire cytotoxique	72
3.3.2.1. Les ligands de TLR	72
3.3.2.2. Les cytokines	74
3.3.2.3. Combinaisons d'immunomodulateurs	75
3.3.3. Potentialisation de l'adressage aux DC	76
3.3.3.1. Les systèmes de délivrance particuliers	76
3.3.3.2 Les peptides pénétrant les cellules	78
3.4. Optimisation de l'administration	80
3.4.1. Voies d'administration novatrices	80
3.4.2. Mode d'administration	83
3.5. Etat des lieux des vaccins peptidiques en essais cliniques	84
3.5.1. Vaccins peptidiques en phase III	84
3.5.2. Vaccins peptidiques en phase I et II	85

Conclusion.....	89
Références.....	95

Introduction : Qu'est-ce qu'un cancer ?

Le cancer est un terme générique regroupant un large panel de pathologies ayant pour point commun la prolifération anormale de cellules mutées. Ces mutations peuvent être d'origine génétiques ou environnementales (facteurs physiques, chimiques ou biologiques). Un cancer peut se développer dans n'importe quel organe avec des conséquences variables en termes de morbi-mortalité selon sa localisation. Certains cancers sont très agressifs mais la plupart évoluent sur plusieurs années voire décennies avant de mettre en jeu le pronostic vital de l'individu.

Le cancer est la seconde cause de mortalité au niveau mondial, responsable d'1 mort sur 6. Plus de 60 % des cas de cancer dans le monde ont été diagnostiqués en Afrique, Asie, Amérique centrale et Amérique du sud. Le tabagisme constitue le facteur de risque de cancer le plus important et serait responsable d'environ 22% des décès par cancer dans le monde. La consommation d'alcool, le manque d'activité physique et une mauvaise alimentation sont les trois autres facteurs de risque principaux de cancers. Ainsi, on estime que 30 à 50% des cancers pourraient être prévenus en réduisant ces facteurs de risques.

Depuis 2004, le cancer constitue en France la première cause de mortalité prématurée (avant 65 ans). 400 000 cancers ont été nouvellement diagnostiqués et 150 000 décès par cancer ont été recensés au cours de l'année 2017 selon l'Institut National du Cancer. Les cancers du poumon, colorectal, du sein et de la prostate sont les plus fréquents. Du fait du vieillissement de la population mais aussi de l'amélioration des méthodes diagnostiques, le nombre de nouveaux cas de cancers est en augmentation depuis 30 ans.

La lutte contre le cancer est structurée en France autour de plans d'actions nationaux de Santé Publique concernant l'information, la prévention, le dépistage, les soins, le développement de nouveaux traitements, ainsi que l'accompagnement des patients et de leurs proches. Le premier Plan Cancer (2003-2007) a notamment permis la création de l'Institut National du Cancer ainsi que la mise en place de 7 cancéropoles régionaux pour dynamiser la recherche fondamentale translationnelle et clinique en cancérologie. Le second Plan Cancer (2009-2013) s'est majoritairement focalisé sur le renforcement de la qualité et de la sécurité des soins. Actuellement, le troisième Plan Cancer (2014-2019) a pour priorité principale la réduction des inégalités inter-individuelles de prises en charge et de pertes de chances face aux cancers, avec un accent sur le développement de la médecine personnalisée (analyse des spécificités génomiques et biologiques des tumeurs) et des innovations thérapeutiques.

Chaque cancer est unique de part sa localisation, son évolution, et son hôte. Cependant, un ensemble de caractéristiques communes aux cellules cancéreuses a été établi par la communauté scientifique (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011a).

Les cellules tumorales se caractérisent principalement un phénotype hyperprolifératif (autonomie de croissance, potentiel de réplication illimité) associé à une réponse au stress cellulaire non physiologique (insensibilité aux signaux d'inhibition de prolifération, échappement à la mort cellulaire, possibilité d'entrée dans un état de dormance réversible). Ce phénotype est responsable de leur prolifération rapide et incontrôlée. On parle de tumeur à partir de 100 000 cellules.

Initialement, il était établi que le développement cancéreux suivait un modèle clonal, où chaque cellule dédifférenciée prolifère en parallèle et peut être source de métastases (Nowell, 1976) (Figure 1). Plus récemment, des études suggèrent que la transformation tumorale, les métastases ainsi que la récurrence des cancers après traitement seraient imputables à une sous population minoritaire de cellules cancéreuses aux propriétés de cellules souches (Allegra et al., 2014). Ces cellules ont été identifiées dans diverses tumeurs solides (sein, poumon, colon, mélanome), généralement par l'association des marqueurs CD133, CD24 et CD44. Elles ont la capacité de s'autorenouveler mais aussi de se différencier en plusieurs lignées cellulaires, à l'inverse des cellules cancéreuses clonales dédifférenciées. Il n'est pas exclu que ces deux modèles de développement tumoral coexistent.

Du fait de la dysfonction de leurs systèmes de régulation biologique, les cellules tumorales possèdent une instabilité génomique intrinsèque responsable de leur hétérogénéité. On parle d'hétérogénéité inter-tumorale (selon le type de cancer et l'individu) et intra-tumorale (différentes populations de cellules cancéreuses, différentes populations du microenvironnement tumoral, chacune possédant différents phénotypes, et évolution de ces populations en fonction du temps, des traitements, et de la réponse immune). Cette hétérogénéité existe aussi au niveau des métastases (hétérogénéité inter et intra métastatique) (Jamal-Hanjani et al., 2015).

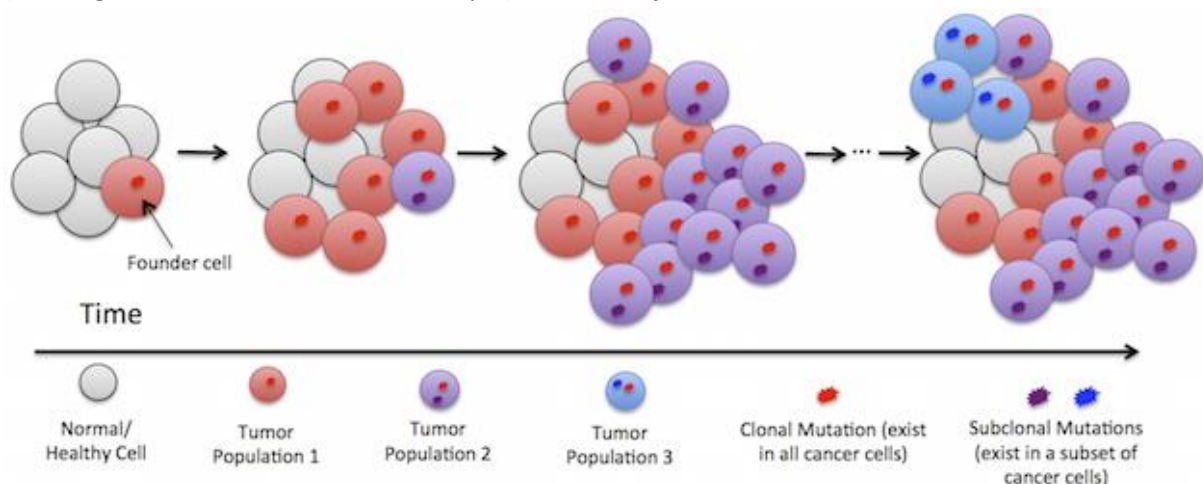


Figure 1 : Evolution cancéreuse selon le modèle clonal. D'après (Nowell, 1976).

Le microenvironnement tumoral joue également un rôle prépondérant dans le développement tumoral. La tumeur induit la prolifération de cellules stromales de soutien qui vont en retour lui fournir de nombreux facteurs de croissance et facteurs angiogéniques. En effet, les tumeurs sont généralement associées à un remodelage vasculaire local permettant l'apport de nutriments et d'oxygène nécessaires à leur croissance (Farnsworth et al., 2014). Pour autant, le sein de la tumeur est généralement hypoxique.

Ainsi, la tumeur et son microenvironnement sont également soumis à de profondes modifications métaboliques. En effet, une cellule produit physiologiquement de l'énergie à partir d'oxygène par un mécanisme nommé phosphorylation oxydative. En situation d'hypoxie, elle peut s'adapter en produisant de l'énergie par glycolyse, mais avec un rendement beaucoup plus faible (seulement 2 molécules d'ATP par molécule de glucose versus 34 ATP par molécule de dioxygène). De façon étonnante, il a été montré que les cellules cancéreuses produisaient préférentiellement de l'énergie par glycolyse, et ce même en présence d'oxygène (Warburg, 1925). Ce désavantage métabolique nommé « effet Warburg » serait compensé par une capture de glucose augmentée, et permettrait de générer des métabolites favorisant la croissance tumorale, notamment le lactate (substrat, facteur d'angiogenèse, immunosuppresseur) (Romero-Garcia et al., 2016). Cependant, son importance dans la croissance des tumeurs reste controversée (Liberti and Locasale, 2016).

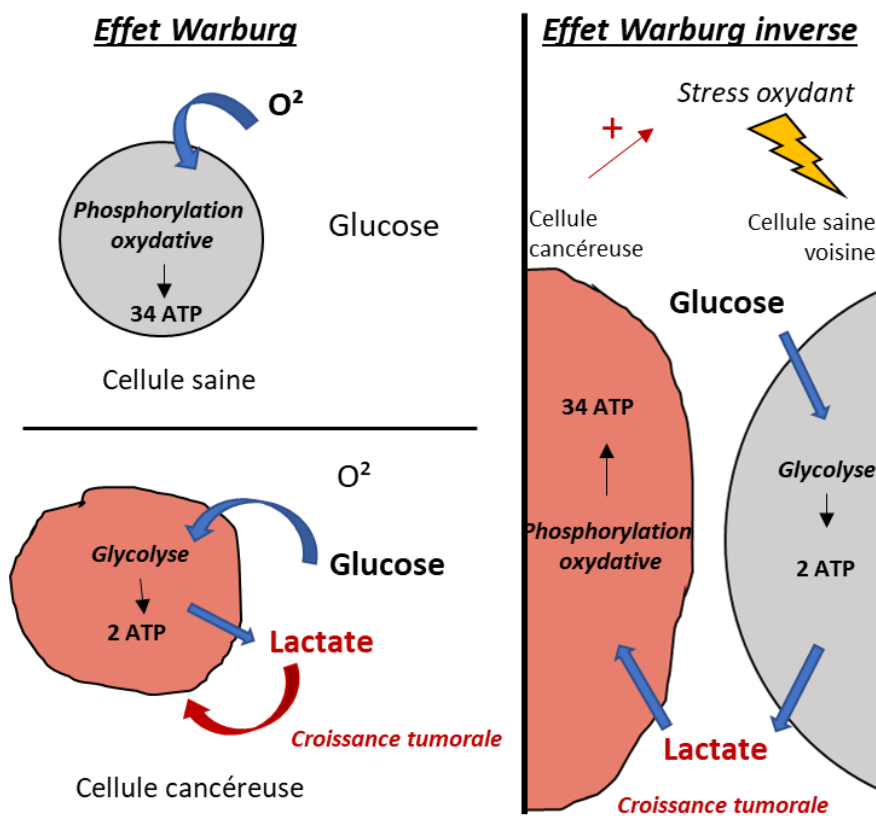


Figure 2 : Effet Warburg et effet Warburg inverse. Adapté d'après (Xu et al., 2015).

En outre, le métabolisme énergétique varierait selon le type de tumeurs, voire selon leur stade d'évolution, les gènes qui y sont exprimés et le micro-environnement tumoral. Récemment, il a également été mis en évidence un couplage métabolique entre les cellules tumorales et les cellules stromales environnantes, selon un « effet Warburg inverse » (Xu et al., 2015) : Le stress oxydant engendré par la tumeur orienterait les cellules stromales à utiliser la glycolyse, ce qui permettrait de fournir aux cellules tumorales une grande quantité de substrats métaboliques qu'elles utiliseraient par phosphorylation oxydative. L'effet Warburg inverse compléterait ainsi les possibilités d'adaptation des cellules cancéreuses (Figure 2).

Par ailleurs, les conséquences tissulaires du développement tumoral (hypoxie, nécrose tumorale) entraînent une inflammation locale, ainsi que la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale spécifique (cf. Partie 1). Cette réponse est contrée par les cellules tumorales qui mettent en place divers mécanismes d'échappement au système immunitaire et induisent un environnement immunosuppresseur local (Vesely et al., 2011).

Enfin, les cellules tumorales vont acquérir des propriétés d'invasion, notamment par le mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse (Li and Li, 2015). Elles vont alors se disséminer par la circulation sanguine vers d'autres organes et y former des métastases, qui pourront évoluer en tumeurs secondaires. Ainsi, on distingue 4 stades d'évolution pour les cancers dits solides (par opposition aux tumeurs sanguines intrinsèquement diffuses) : (I) tumeur primaire, (II) tumeur primaire de volume important, (III) envahissement des tissus et ganglions locorégionaux, et (IV) présence de métastases dans l'organisme.

En résumé, tous les cancers possèdent des caractéristiques communes essentielles à leur développement, dont chacune est exploitable/exploitée au niveau thérapeutique (Figure 3). Néanmoins, les cancers représentent un ensemble extrêmement hétérogène rendant difficile la mise au point d'un traitement universel.

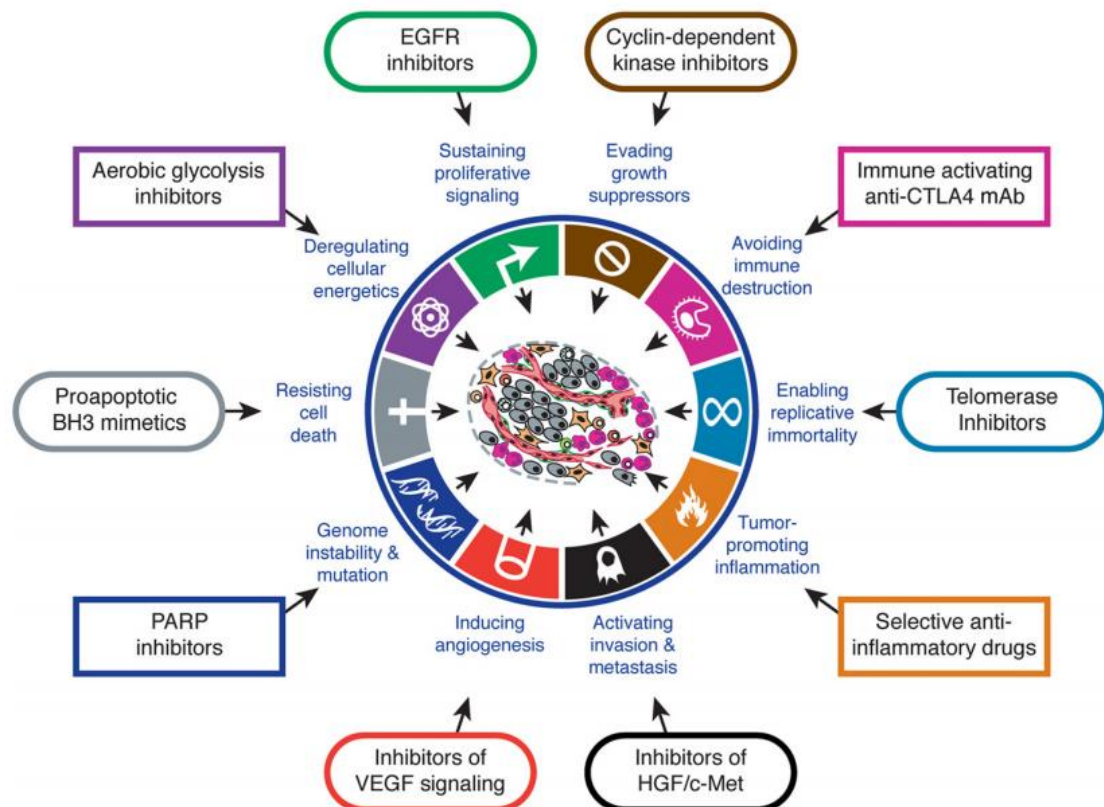


Figure 3 : Les principales caractéristiques des cellules cancéreuses et des exemples de ciblage au niveau thérapeutique (Hanahan and Weinberg, 2011b).

Partie 1 : L'immunité antitumorale

1.1. Système immunitaire et cancer

1.1.1. Les acteurs de l'immunité antitumorale

Le système immunitaire est un ensemble de cellules et de molécules dont la finalité est de défendre l'organisme contre les éléments pathogènes. Ces pathogènes peuvent être d'origine extérieure (virus, bactéries, parasites, champignons) ou bien appartenir au Soi, comme les cellules cancéreuses.

Les cellules de l'immunité dite innée et les cellules épithéliales possèdent à leur surface un panel de récepteurs membranaires et/ou endocytaires reconnaissant de manière non spécifique des motifs communs aux situations pathologiques (PRR, Pattern Recognition Receptor). Cela peut être des signaux d'infection (PAMPs, Pathogen associated molecular pattern) tels que des composants microbiens, ou des signaux de danger (DAMPs, Danger associated molecular pattern), tels que des composants physiologiquement intracellulaires (ADN, ARN, ATP, ...) qui se retrouvent dans le milieu extracellulaire. La reconnaissance de PAMPs ou de DAMPs par des PRR induit la sécrétion cellulaire de cytokines proinflammatoires (IL1, IL-6, TNF α) et de chimiokines, attirant diverses populations immunitaires innées.

Les neutrophiles et les macrophages vont phagocyter de manière non spécifique les agents pathogènes, particules étrangères ou débris cellulaires de la zone inflammée ; leur action est particulièrement efficace contre une menace extracellulaire (bactérie, poussière, ...).

Les cellules tueuses naturelles (NK, Natural Killer) à la fonction cytotoxique vont lyser de manière non spécifique les cellules reconnues comme pathologiques, soit parce qu'elles sont marquées par des anticorps, soit parce que leur expression du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de Classe I (CMHI) n'est pas physiologique (absence, diminution ou altération). Cela concerne les cellules du non Soi (autre individu), ou encore les cellules du Soi altéré (infection virale, cancer). En effet, l'expression « anormale » du CMHI est un mécanisme d'échappement fréquemment employé par les virus et les cellules cancéreuses ; Il permet d'éviter la reconnaissance par les cellules de l'immunité spécifique.

En résumé, la réponse innée est une réaction inflammatoire locale standardisée et physiologiquement transitoire.

Pour compléter cette réponse innée, nous possédons une immunité dite « spécifique » ou « adaptative » représentée par un large répertoire de lymphocytes T CD4+, T CD8+ et B, dont chacun porte à sa surface des récepteurs d'une seule spécificité antigénique donnée.

Chaque individu possède un répertoire unique de lymphocytes T et B qui évolue tout au long de sa vie, aussi bien qualitativement que quantitativement, en fonction des antigènes rencontrés. Ces lymphocytes sont essentiellement présents au niveau des ganglions lymphatiques secondaires. Après activation par reconnaissance de l'antigène en question, ils prolifèrent et se différencient en cellules effectrices, et dans une moindre mesure en cellules mémoires. Ces dernières permettent une réaction immunitaire plus prompte lors d'une rencontre ultérieure avec le même antigène.

Les lymphocytes B reconnaissent l'antigène sous forme native (protéine, sucre, lipide) via leur récepteur spécifique (BCR) et se différencient en plasmocytes producteurs d'anticorps spécifiques ; C'est la réponse immunitaire humorale. Les anticorps qui se fixent aux pathogènes vont former des complexes immuns qui seront ensuite dégradés par les cellules de l'immunité innée et le système du complément. Cette réponse est particulièrement adaptée aux pathogènes extra-cellulaires, tels que les bactéries et certains parasites. Comme mentionné précédemment, les anticorps peuvent aussi être à l'origine d'une cytotoxicité médiée par les NK, lorsqu'ils reconnaissent des antigènes présents à la surface d'une cellule infectée ou cancéreuse.

Les lymphocytes T CD4+ et T CD8+ reconnaissent l'antigène uniquement sous forme peptidique (séquence linéaire dénaturée de protéine) et complexée à une molécule du CMH de type I (pour les T CD8+) ou de type II (pour les T CD4+) via leur récepteur spécifique (TCR). Cette reconnaissance indirecte requiert l'intervention de cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA), dont les cellules dendritiques (DC) sont la principale population :

Les DC sont des cellules à l'interface entre l'immunité innée et adaptative principalement située au niveau cutané-muqueux. Elles ont à l'état immature une capacité de phagocytose qui leur permet de capturer des antigènes du milieu extracellulaire. Cela peut être des agents pathogènes, ou encore des corps nécrotiques issus de la dégradation de cellules infectées ou tumorales.

Ces antigènes vont être dénaturés puis chargés sur des molécules du CMH au niveau intracellulaire. Lorsque les DC sont activées par des DAMPs/PAMPs via leur PRR, elles vont devenir matures et acquérir une capacité de migration aux ganglions lymphatiques ainsi que l'expression des molécules de costimulation (CD80, CD86), la production de cytokines, et une capacité accrue de présentation antigénique (surexpression membranaire de complexes CMH-peptide).

L'activation des lymphocytes T par les DC aux ganglions dépend de 3 signaux (Figure 4) :

- 1) La reconnaissance du complexe CMH-peptide par un TCR spécifique
- 2) Un signal de costimulation tel que l'interaction entre CD80/86 de la DC et CD28 des LT
- 3) Un signal de prolifération tel que l'autoactivation du récepteur à l'IL-2 des LT par leur production d'IL-2 (facteur d'activation lymphocytaire).

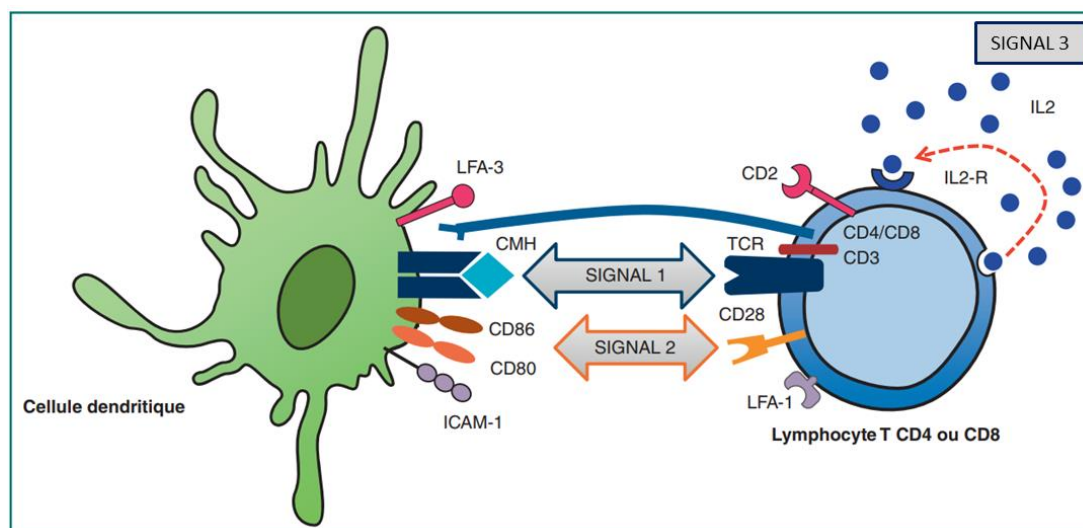


Figure 4 : Les signaux de l'activation lymphocytaire. Adapté d'après (Galaine et al., 2016).

Sans ces signaux 2 et 3, la présentation entraîne une anergie (désactivation) des T spécifiques. Dans le cas contraire, les T spécifiques vont proliférer et se différencier en cellules effectrices, qui vont quitter les ganglions lymphatiques et rejoindre la zone antigénique via la circulation sanguine.

Selon leur provenance tissulaire, les DC présentant l'antigène vont induire chez les lymphocytes T CD8⁺ et T CD4⁺ spécifiques activés l'expression de diverses chimiokines qui vont déterminer leur recrutement préférentiel au niveau du tissu d'activation initial de la DC (Campbell and Butcher, 2002; Johansson-Lindbom et al., 2003; Mikhak et al., 2013).

Les TCD8⁺ se différencient en lymphocytes T cytotoxiques (LTC) capables de tuer spécifiquement les cellules présentant ce même complexe CMHI-antigène ; c'est la réponse immune cellulaire. Cette réponse est particulièrement adaptée aux pathogènes intracellulaires, tels que les virus et les cellules cancéreuses. En effet, le CMHI est exprimé de manière ubiquitaire à la surface des cellules du Soï. L'infection d'une cellule par un virus entraîne l'expression de complexes peptide viral-CMHI à la membrane plasmique. De même, l'instabilité génomique et le phénotype biologique altéré des cellules cancéreuses fait qu'elles expriment à leur surface un panel de complexes CMHI-peptide différents des cellules saines, du fait d'une variation qualitative et/ou quantitative de leurs antigènes

endogènes (protéines mutées ou surexprimées). Sans « l'éducation » préalable des LTC spécifiques par les DC, cette réponse immune cellulaire n'a pas lieu.

Les TCD4⁺ se différencient en lymphocytes T auxiliaires ou helpers (Th) qui renforcent la réponse immunitaire et permettent le maintien d'une mémoire immunologique à long terme. Il existe différentes populations de Th qui vont permettre d'adapter la réponse immune au pathogène impliqué en privilégiant l'activation de certaines populations immunes au détriment d'autres. Les Th1 (inducteurs d'une réponse cellulaire), les Th2 (inducteurs d'une réponse humorale) et les T régulateurs (Treg, inducteurs d'une tolérance) en sont les principales populations. La différenciation des TCD4⁺ en une population particulière dépend des cytokines sécrétées par la DC, qui dépendent elles-mêmes du contexte initial d'activation de la DC (localisation, environnement cytokinique, PRR impliqués, ...). Les TCD4⁺ ont ainsi un rôle central dans l'efficacité de la protection immunitaire par sollicitation des acteurs immuns les plus appropriés.

En conclusion, le système immunitaire réagit dans un premier temps de façon standardisée à toute situation considérée comme pathogène. Une immunité spécifique et adaptée au contexte se met en place dans un second temps. L'immunité antitumorale est essentiellement cellulaire, par action cytotoxique des NK et des LTC (soutenue par les Th1) vis-à-vis des cellules tumorales (Figure 5).

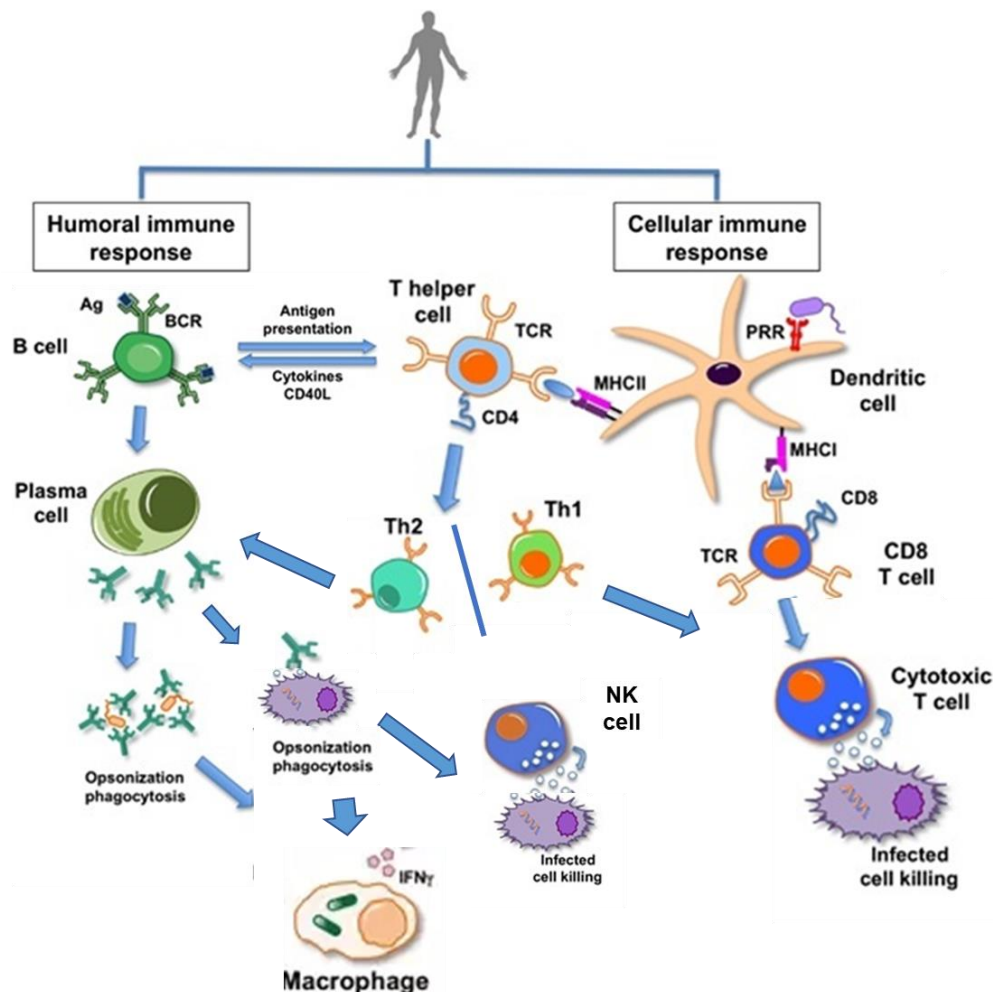


Figure 5 : Schéma simplifié des réponses humorales et cellulaires.

Figure adaptée d'après (Mortellaro and Ricciardi-Castagnoli, 2011).

1.1.2. L'immunosurveillance – immunoédition tumorale

La démonstration de l'existence d'un lien entre système immunitaire et cancer peut être attribuée au Dr. américain William Coley en 1891 (McCarthy, 2006) : À la suite de l'observation de plusieurs cas de guérisons spontanées de sarcomes lors d'infections bactériennes, il décida d'injecter des bactéries inactivées directement au niveau de la tumeur chez ses patients, avec succès. Il postula donc que la stimulation du système immunitaire permettait d'obtenir une régression tumorale. Nommées ultérieurement toxines de Coley, cette préparation bactérienne lui permis de traiter de nombreux patients tout au long de sa vie. Néanmoins, cette technique fut délaissée par la communauté scientifique et médicale au profit de l'apparition de la radiothérapie et de sa simplicité d'utilisation et d'industrialisation.

S'inspirant des travaux de Coley, un scientifique allemand nommé Paul Ehrlich émet l'hypothèse en 1909 que la présence de notre système immunitaire permet de réduire la fréquence de survenue de cancers. Cette théorie sera ultérieurement reprise par Burnet (Burnet, 1970) et Thomas (Thomas, 1982) sous le nom d'immunosurveillance des cancers. Ainsi, notre système immunitaire nous protégerait du développement spontané de nombreux cancers tout au long de notre vie, sans que l'on observe de signes biologiques et/ou cliniques de cette lutte. Le développement d'une tumeur serait donc le résultat d'une défaillance du système immunitaire. La découverte du premier antigène tumoral par Thierry Boon et son équipe dans des cellules de mélanomes humains, nommé melanoma antigen 1 (MAGE-1), confirme l'existence d'une immunité antitumorale spécifique (van der Bruggen et al., 1991) (Figure 6) :

En contexte cancéreux, la mort cellulaire résultant du stress métabolique et de l'hyperprolifération tumorale va libérer dans le milieu extracellulaire de nombreux DAMPs et antigènes tumoraux. Les DC vont capturer l'antigène, s'activer, et migrer aux ganglions lymphatiques. La présentation antigénique associée aux molécules de costimulation et à la sécrétion de cytokines telles que l'IL-12 et l'IFN α par la DC va induire la différenciation des TCD4⁺ en Th1, et des TCD8⁺ en LTC.

Les LTC ont été identifiées comme les cellules effectrices les plus puissantes de la réponse immunitaire anti-tumorale (Benchetrit et al., 2003). Elles vont lyser les cellules cancéreuses via la voie perforine-granzyme et l'interaction Fas/FasL.

Les Th1 expriment CD40L qui par interaction avec CD40 à la surface des DC va renforcer l'amorçage de la réponse CD8 cytotoxique. De plus, les Th1 sécrètent de l'IL-2 qui favorise leur prolifération ainsi que celle des LTC. Enfin, les Th1 vont favoriser le recrutement des LTC au niveau du site tumoral (Bos and Sherman, 2010). Ils exercent également un effet anti-tumoral et anti-angiogénique direct via les cytokines qu'ils sécrètent (Qin and Blankenstein, 2000).

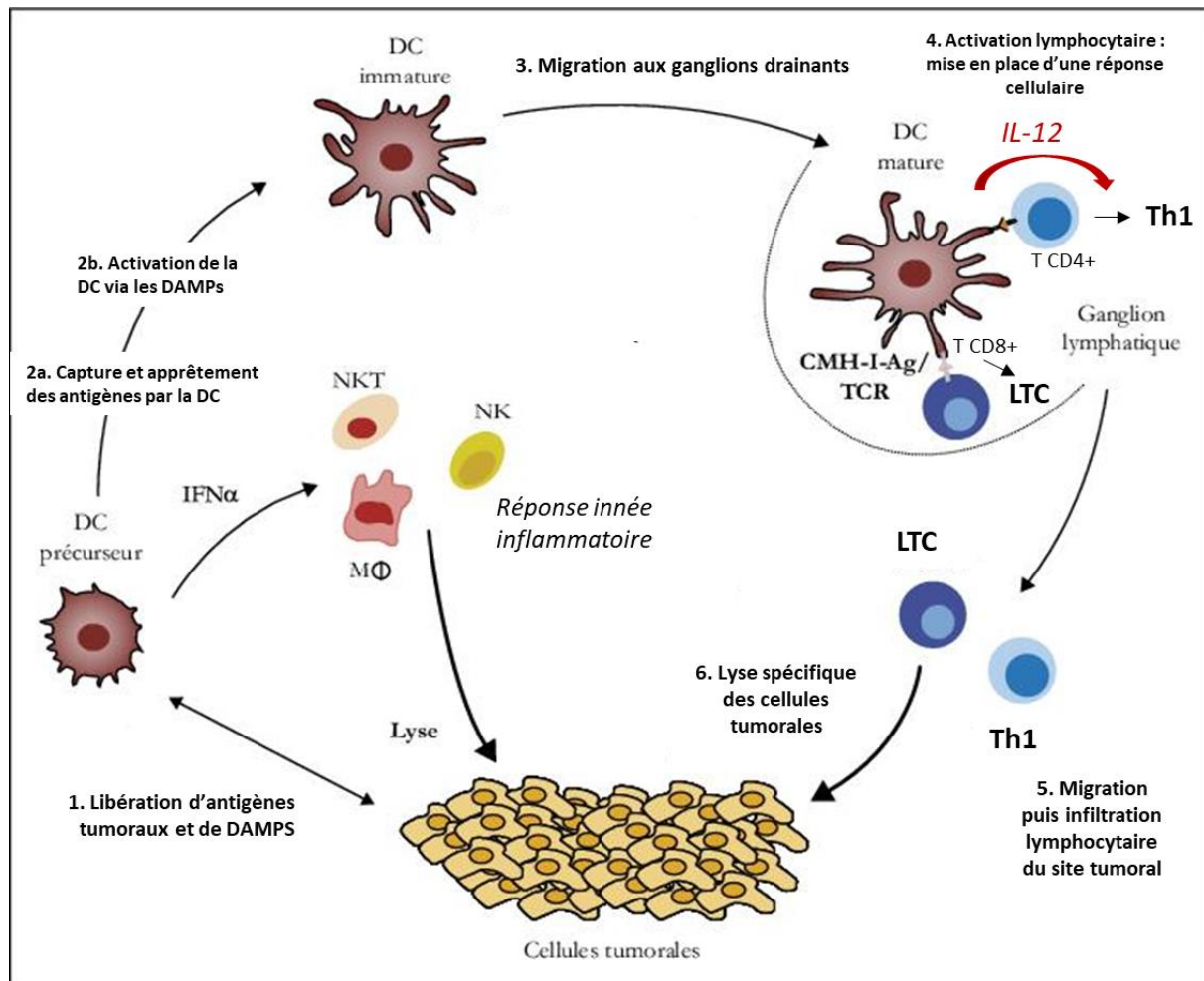


Figure 6 : Mise en place de la réponse antitumorale spécifique.

Adapté d'après (Hage et al., 2008)

Un large faisceau d'arguments épidémiologiques et cliniques démontrent l'importance de cette immunosurveillance antitumorale. Ainsi, le syndrome de Chediak-Higashi, responsable d'un déficit de granules cytotoxiques des NK et lymphocytes T cytotoxiques, augmente la propabilité de développer un cancer par 200 (Kobayashi, 1985). De même, une faible activité cytotoxique CD8 et NK est associée avec une incidence accrue de cancers (Imai et al., 2000). Des mutations du gène de la perforine et un polymorphisme du gène de FasL augmentent également la fréquence de certains cancers (Clementi et al., 2005) (Sun et al., 2005).

En outre, une infiltration lymphocytaire (TIL, Tumor Infiltrating Lymphocytes) est mise en évidence dans de nombreux types cancéreux et associée à un bon pronostic clinique (Miwa, 1984), ce qui suggère que le système immunitaire peut également jouer un rôle thérapeutique dans les tumeurs déjà en place.

La réponse antitumorale favorise la libération d'autres DAMPs et d'antigènes tumoraux qui vont renforcer la réponse immune déjà en place ; on parle de mort immunologique des cellules tumorales (Kroemer et al., 2013). Ces antigènes tumoraux peuvent être différents de ceux contre lesquels la réponse immune est dirigée. En étant eux-mêmes présentés aux lymphocytes T par les DC activées, ils vont permettre d'élargir le champ d'action de la réponse immunitaire ; on parle d'antigène spreading (Gulley et al., 2017). Ainsi, un cercle vertueux se met en place (Figure 6).

Cependant, cette réponse antitumorale exerce une pression sélective qui permet le développement de cellules cancéreuses résistantes : On parle d'immuno-édition de la tumeur (Dunn et al., 2004).

En effet, toutes les cellules tumorales ne portent pas les mêmes antigènes tumoraux ; les populations les moins immunogènes sont peu impactées par le système immunitaire. De plus, les cellules tumorales vont développer de nombreux mécanismes cellulaires d'échappement au système immunitaire et favoriser l'induction d'un microenvironnement immunosuppresseur (Bhatia and Kumar, 2014). Il y aurait alors une phase d'équilibre entre réponse immunitaire et tumeur, et le développement effectif d'un cancer surviendrait lorsque cette immunité devient insuffisante pour contenir la croissance et l'invasion tumorale (Figure 7).

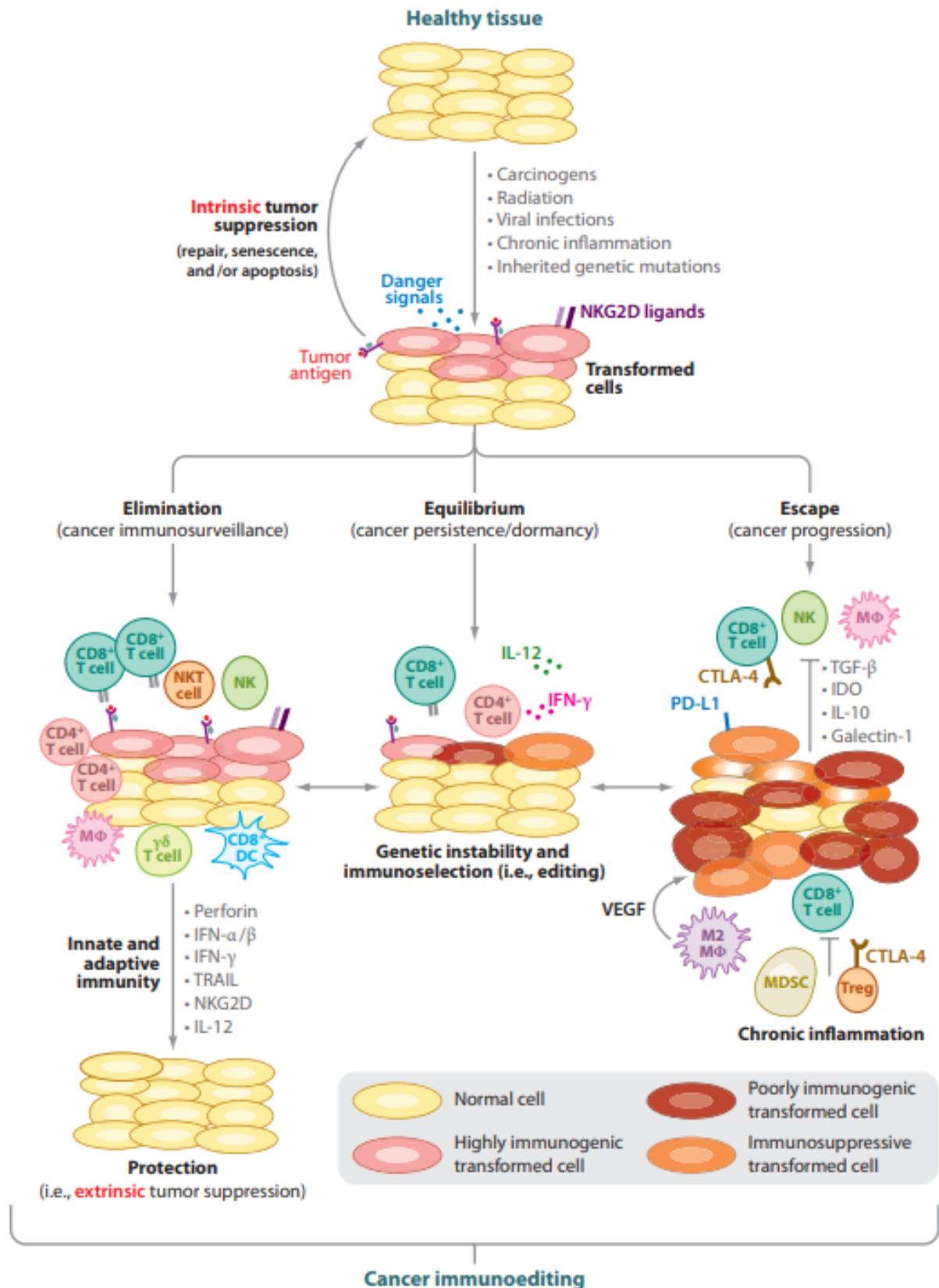


Figure 7 : L'Immunoédition tumorale et la théorie des 3 E (Elimination, Equilibre, Echappement) D'arpsè (Vesely et al., 2011).

1.2. Focus sur la présentation antigénique des antigènes tumoraux

1.2.1. Les antigènes tumoraux

1.2.1.1. Profil d'expression des antigènes tumoraux

On désigne par antigène toute espèce moléculaire naturelle ou synthétique spécifiquement reconnue par le système immunitaire. Il est dit immunogène si sa reconnaissance engendre une réponse immunitaire (et non une tolérance immune). La grande majorité des antigènes sont de nature protéique. Le pouvoir immunogène d'un antigène dépend de l'individu auquel il est exposé (variabilité génétique de la réponse inter individu et au cours de la vie), de la façon dont il est exposé (stratégie d'immunisation), mais aussi de sa nature (degré d'altérité, poids moléculaire, distance phylogénétique).

Depuis la découverte du premier antigène tumoral, plus de 400 déterminants antigéniques humain de nature protéique ont été identifiés, notamment grâce à l'amélioration des connaissances en génie génétique (Vita et al., 2015).

Les antigènes tumoraux peuvent être classés en plusieurs catégories selon leur profil d'expression (Figure 8) :

D'une part, les antigènes spécifiques des cancers ou « néoantigènes » : Inexistants physiologiquement, ils apparaissent sur les cellules cancéreuses du fait de l'instabilité génomique et de la dysrégulation de la biologie cellulaire. Certains sont partagés et d'autres propres à un patient.

D'autre part, les antigènes associés aux cancers, subdivisés en 4 groupes :

(1) Les antigènes du groupe cancer testis : Ils sont exprimés spécifiquement par la tumeur ainsi que par les cellules germinales. Cependant ces dernières sont dans un statut de privilège immunitaire (physiologiquement inaccessibles au système immunitaire).

(2) Les antigènes surexprimés : Ils sont issus de protéines ubiquitaires dont la production est accrue au sein des cellules à phénotype cancéreux.

(3) Les antigènes de différenciation : Leur expression est restreinte à un type cellulaire donné et ils sont surexprimés par les cellules cancéreuses du même type.

(4) Les antigènes de pathogènes infectieux inducteurs de cancers : 15-20% des cancers sont associés à des agents infectieux pathogènes (virus, bactéries, parasites), qui sont également source d'antigènes.

Il faut garder à l'esprit que l'expression d'un antigène tumoral donné est à pondérer par l'édition immunologique continue de la tumeur et son instabilité génomique intrinsèque.

Catégories	Antigènes associés aux tumeurs (TAA)				Antigènes spécifiques des tumeurs
Types	Antigènes de surexprimés	Antigènes surexprimés	Antigènes du groupe <i>cancer testis</i>	Xénoantigènes	Néoantigènes
Expression	Cellules tumorales (+++) Cellules saines (+)	Cellules tumorales (+++) Cellules saines d'un même tissu (+)	Cellules tumorales (+++) Cellules germinales (mais privilège immunitaire)	Cellules infectées par des agents pathogènes oncogènes	Cellules tumorales après mutagenèse
Exemples	Gp100 (mélanome) PSA (cancer de la prostate)	HER2 (cancer du sein,...) MUC1 (adénocarcinomes)	MAGE-3 (mélanome, cancer de la vessie,...) NY-ESO1 (mélanome, cancer de l'ovaire)	E6 et E7 du papillomavirus (cancer du col de l'utérus, ...)	P53 mutée (50% des cancers) RAS muté : (15-20% des cancers)

Gp100 : glycoprotéine 100 ; PSA : antigène prostatique spécifique ; HER2 : récepteur 2 du facteur de croissance épidermique ; MUC1 : mucine 1 ; MAGE-3 : antigène 3 associé au mélanome ; p53 : protéine tumorale 53 ; RAS : protéine impliquée dans la voie des MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*)

Figure 8 : Les différents profils d'expression des antigènes tumoraux.

Adapté d'après (Blanc et al., 2017).

Les antigènes du groupe cancer testis, les antigènes surexprimés et les antigènes de différenciation appartiennent au Soi. Ils ont donc été soumis aux mécanismes de tolérance centraux et par conséquent sont associés à une déletion de cellules T et un répertoire déficient de mémoire T. A l'inverse, les néoantigènes tumoraux possèdent comme les xénoantigènes un fort potentiel immunogène car sont inconnus du système immunitaire, mais la problématique principale reste leur identification.

Parmi les antigènes surexprimés, on retrouve les antigènes dits « universels » de part leur surexpression commune à de nombreux types cancéreux, ainsi que la faculté de leurs épitopes à liés différents polymorphisme CMHII. En particulier, l'antigène hTERT, sous unité transcriptase inverse de la télomérase, est une cible particulièrement intéressante. hTERT est surexprimé dans de nombreux cancers et sa surexpression est associée avec un mauvais pronostic (Li et al., 2016). En outre, hTERT joue un rôle primordial dans l'immortalité des cellules cancéreuses et la transition épithélio-mésenchymateuse (Zanetti, 2017).

1.2.1.2. Epitopes peptidiques et répertoire T

On a vu précédemment que l'antigène est reconnu par les lymphocytes T sous forme dénaturée et complexée à une molécule du CMH de type I (pour les T CD8+) ou du CMH de type II (pour les T CD4+) présentée par une cellule présentatrice d'antigène (cf. 1.1).

Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), nommé HLA (Human Leucocyte Complex) chez l'Homme, est composé pour chaque individu d'une combinaison de gènes (ou haplotype) provenant de chacun de ses parents. Les molécules HLA de classe I se subdivisent en 3 groupes (HLA-A, HLA-B et HLA-C), tout comme les molécules HLA de classe II (HLA-DQ $\alpha\beta$, HLA-DP- $\alpha\beta$, HLA-DR $\alpha\beta$).

L'expression de ces gènes est extrêmement polymorphe et confère une carte d'identité biologique à chaque individu. En effet, l'expression ubiquitaire des molécules du CMHI sur l'ensemble des cellules nucléées constitue un marqueur du Soi et permet d'empêcher leur lyse par les cellules tueuses naturelles (NK). La reconnaissance de molécules du CMHI et CHMII (exprimées uniquement sur les CPA) comme appartenant au Soi est également requise pour permettre la présentation antigénique.

Le motif antigénique complexé au CMH reconnu par le lymphocyte T est nommé épitope. Un antigène protéique tumoral contient de nombreux peptides épitopiques différents qui vont pouvoir se fixer soit sur le CMHI, soit sur le CMHII. Un seul antigène tumoral peut donc être à l'origine de plusieurs clones T de spécificité épitopique différente. Cependant il existe une compétition entre ces épitopes potentiels en fonction de leur affinité de fixation au CMH. Ainsi, les épitopes majoritairement présentés chez un individu sont qualifiés d'immunodominants, alors que les épitopes sous-représentés sont appelés épitopes cryptiques.

L'interaction entre le peptide et le CMH est sélective mais très peu spécifique. Cela permet aux molécules du CMH de former des complexes avec des milliers de peptides différents. Néanmoins, il existe une variabilité inter-individuelle à présenter, ainsi qu'une variabilité inter-individuelle à répondre à un épitope donné. Cela dépend du polymorphisme HLA ; On parle de restriction HLA de l'épitope. En effet, le CMH est activement impliqué dans la création de notre répertoire T au niveau du thymus, en induisant la sélection/déletion de lymphocytes T selon l'affinité de leur interaction avec les molécules HLA exprimées par les cellules médullaires thymiques. Ceci a pour conséquence l'existence d'un répertoire T individuel unique et restreint au polymorphisme HLA de l'hôte. Certains polymorphismes HLA sont beaucoup plus représentés que d'autre parmi la population. Par exemple, l'allèle HLA-A2 est retrouvé chez plus de 50% de la population caucasienne.

Enfin, l'existence du CMH rend difficilement envisageable le transfert de cellules immunitaires allogénique dans un but thérapeutique. D'une part, la présentation antigénique de DC allogéniques (provenant de la même espèce mais d'individu différent) aux LT endogènes serait inefficace, et d'autre part, ces cellules immunes allogéniques seraient détruites car reconnues comme étrangères par les lymphocytes T et NK.

1.2.2. Les voies de présentation antigénique

1.2.2.1. Voies classiques de présentation des antigènes sur les CMHI et CMHII

Les molécules du CMHI sont des glycoprotéines hétérodimériques composées d'une chaîne α associée à la $\beta 2$ microglobuline. Le sillon de présentation antigénique est constitué d'une poche aux bords fermés, situé entre les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$, pouvant accueillir des peptides de 9 acides aminés environ (Figure 9a). Elles sont synthétisées au niveau du reticulum endoplasmique (RE).

Classiquement, les peptides présentés sur le CMHI sont d'origine endogène et résultent de la dégradation physiologique de protéines intracellulaires par le protéasome, un assemblage multicalatytique de protéases (Cebrian et al., 2011). En présence d'IFN α , le protéasome change de conformation pour devenir « immunoprotéasome », ce qui optimise la qualité et la quantité des peptides générés (Lattanzi et al., 2011). Ceux-ci sont ensuite transloqués dans le RE par des transporteurs associés à la présentation antigénique (TAP, Transporter associated with antigen processing). Ces transporteurs les sélectionnent en fonction de leur taille et de leur disposition à se fixer sur le CMHI. Dans le RE, ces peptides peuvent encore être clivés par des aminopeptidases (ERAP, Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase). Une protéine nommée tapasine permet le recrutement des molécules de CMHI au niveau des transporteurs TAP, ce qui forme un complexe de chargement de peptide. La tapasine a également un rôle de sélection des peptides les plus affins. Les complexes CMHI-peptide suffisamment stables sont ensuite envoyés à la surface cellulaire *via* le Golgi (Blum et al., 2013). Un autre chargement de peptide peut avoir lieu dans un compartiment intermédiaire entre RE et Golgi (ERGIC) sur des complexes CMHI-peptide recyclés peu stables (Ghanem et al., 2010) (Figure 9c).

Les molécules du CMH de classe II sont des glycoprotéines hétérodimériques composées d'une chaîne α associée à une chaîne β . Le sillon de présentation antigénique situé entre les sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ est constitué d'une poche aux bords ouverts pouvant accueillir des peptides de 12 à 25 acides aminés (Figure 9b).

Les molécules de CMHII sont synthétisées dans le RE associées à une chaîne invariante CD74 au niveau du sillon peptidique. Elles sont alors transloquées vers les endosomes. L'acidification progressive des endosomes va dégrader CD74 en un peptide de 20 acides aminés invariant (CLIP, class II-associated invariant chain peptide), par l'action de différentes protéases (cathepsines S, L et F, et asparaginyl endopeptidase). Au niveau des endosomes tardifs, CLIP va être retiré par HLA-DM, qui induit un changement conformationnel autorisant la fixation d'épitopes. HLA-DM a également un rôle de sélection des épitopes les plus affins par compétition de fixation, jusqu'à formation d'un complexe CMHII-peptide stable. Classiquement, ces peptides sont d'origines exogènes et internalisés au niveau endosomal. Ce complexe est ensuite exporté à la surface (Figure 9d) (Blum et al., 2013).

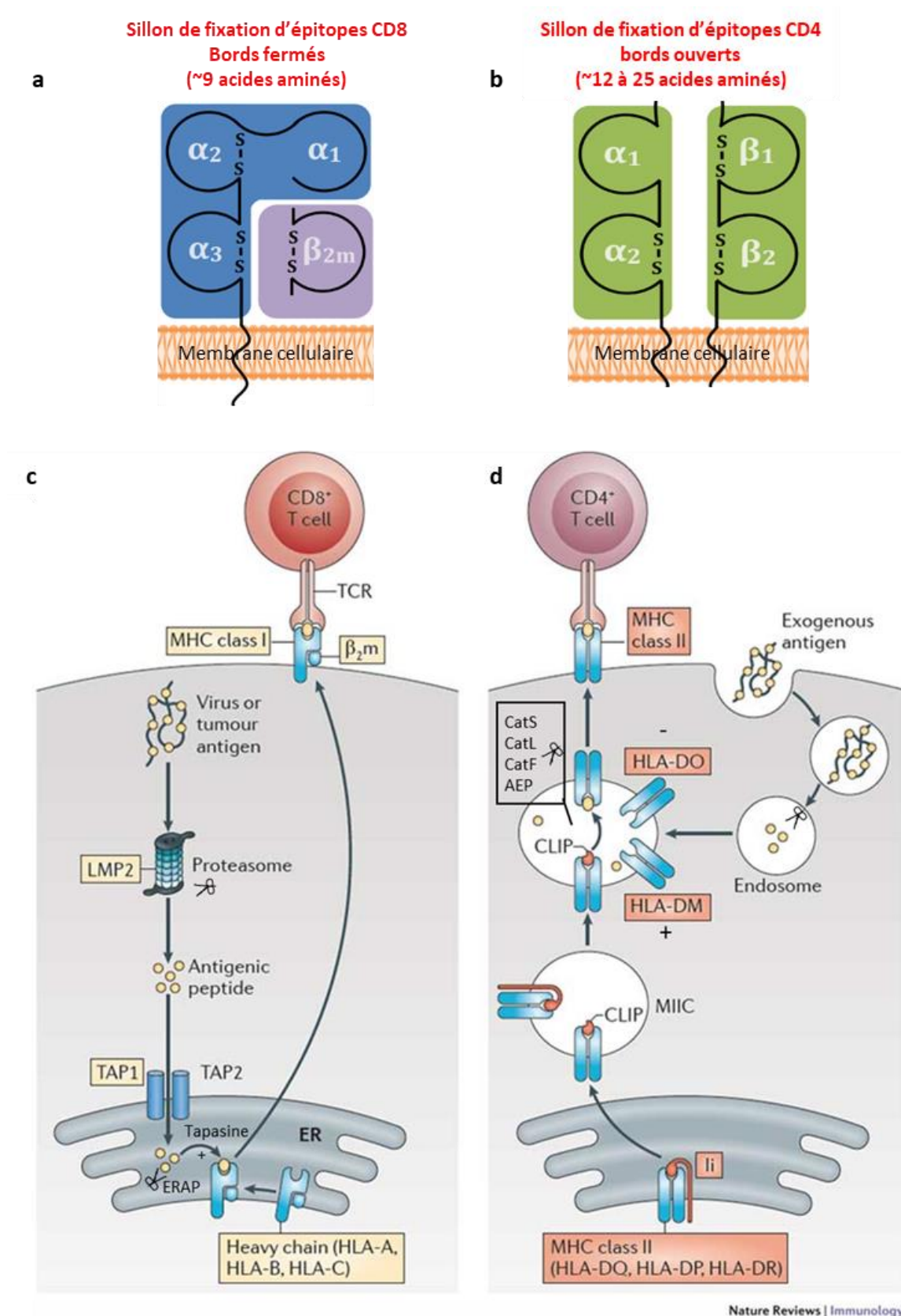


Figure 9 : Les voies de présentation classiques. (a) Schéma d'une molécule du CMHI (b) Schéma d'une molécule du CMHII ([cours-pharmacie.com /immunologie/](https://cours-pharmacie.com/immunologie/)) (c) Apprêtement des antigènes endogènes sur le CMHI, (d) Apprêtement des antigènes exogènes sur le CMHII. Adapté d'après (Kobayashi and Elsen, 2012).

1.2.2.2. Présentation croisée d'antigènes exogènes sur le CMHI

Les antigènes d'origine exogène peuvent également être présentés après internalisation sur les molécules du CMHI ; on parle de cross-présentation ou présentation croisée. Cette voie de présentation joue un rôle fondamental dans l'immunité antitumorale, car elle permet aux DC de présenter des antigènes tumoraux aux lymphocytes TCD8+, initiant ainsi la réponse cytotoxique.

Diverses voies de cross présentation ont été décrites, résumées en deux hypothèses principales (Schuette and Burgdorf, 2014a) (Figure 10) :

D'une part, la voie vacuolaire : L'antigène internalisé est clivé par la peptidase endosomale IRAP et le chargement sur une molécule du CMHI se fait directement au sein de l'endosome/phagosome. Cette molécule du CMHI pourrait provenir soit de la membrane cellulaire par recyclage, soit du RE. En effet, il a été montré une translocation de CMHI du RE vers les endosomes qui serait médiée par CD74 (Basha et al., 2012) et la liaison entre Sec22b du RE et SNARE du phagosome (Cebrian et al., 2011).

D'autre part, la voie cytosolique : L'antigène internalisé est transloqué de l'endosome vers le cytosol où il est clivé par le protéasome. Ensuite, grâce aux transporteurs TAP, il regagne soit le RE, soit l'endosome/phagosome pour être chargé localement sur une molécule de CMHI. Les voies d'apprêtement cytosolique et vacuolaire sont donc interconnectées.

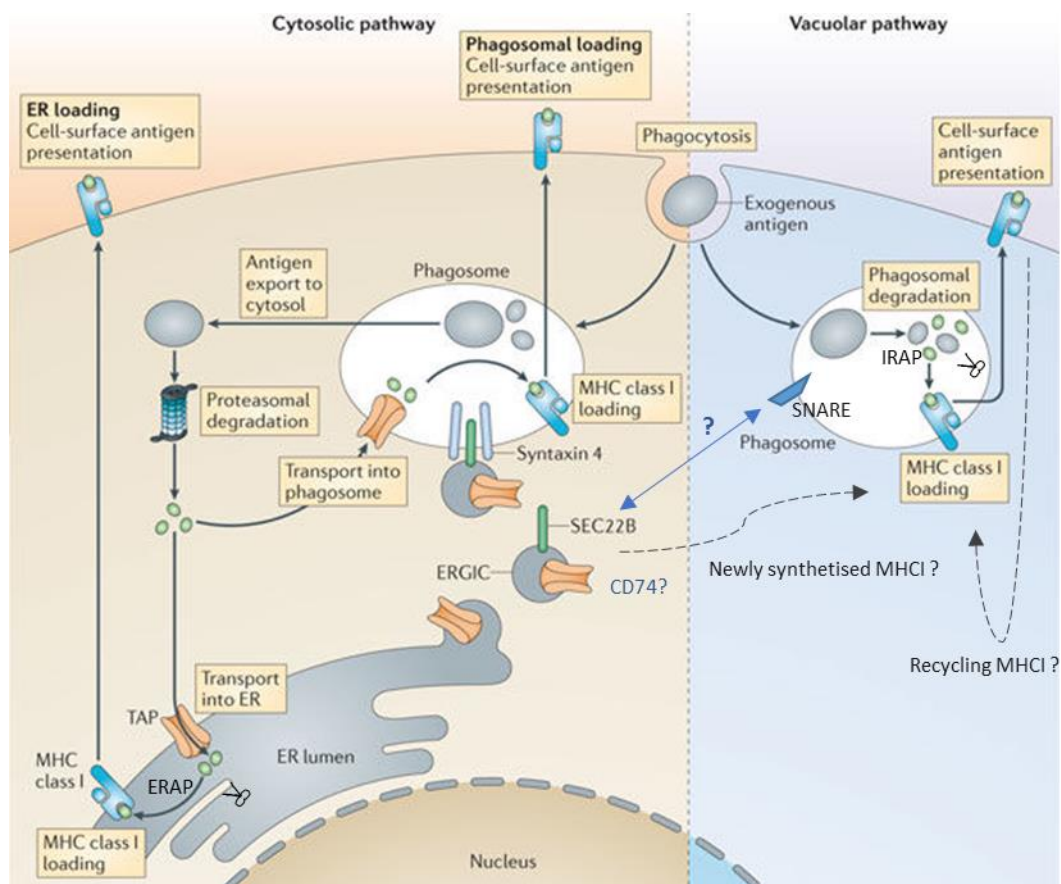


Figure 10 : Les voies de présentation croisées. Adapté d'après (Joffre et al., 2012)

La DC peut également acquérir des antigènes tumoraux provenant d'une cellule voisine *via* les jonctions GAP. Ces jonctions forment une interconnection entre cellules adjacentes, par laquelle transitent nutriments, ions et messagers secondaires de manière passive et non spécifique. Un transfert d'antigène pourrait se faire d'une cellule voisine à une CPA par cette voie, et impliquerait la protéine connexine 43 (Cx43) (Neijssen et al., 2005), qui est notamment surexprimée en présence des cytokines proinflammatoires $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ ou du LPS (ligand de PRR) (Eugenín et al., 2003). Si les cellules tumorales se découplent généralement de leur environnement et perdent l'expression de Cx43, il a cependant été montré dans un modèle de mélanome que ce transport d'antigène pouvait quand même avoir lieu (Mendoza-Naranjo et al., 2007).

1.2.2.3. Compétition entre les voies de présentation

Du fait de l'interconnection étroite entre les voies de présentation endosomales menant à la présentation d'épitopes CMHI et CMHII, l'existence d'une compétition entre le chargement d'épitopes CD4 et CD8 est certain.

In vivo, c'est la réponse CD4 qui prédomine. Ceci peut s'expliquer par plusieurs points techniques : (1) on dénombre physiologiquement 2/3 de CD4+ pour seulement 1/3 de CD8+ parmi les lymphocytes T, (2) la poche de fixation au CMHII est moins restrictive que celle du CMHI, (3) la majorité des DC *in vivo* sont spécialisées dans la présentation classique des antigènes exogènes, et (4) les quelques DC spécialisées dans la cross présentation sont situés dans le paracortex profond du ganglions lymphatiques et peu exposées aux trafic lymphocytaire (Gerner et al., 2017).

1.2.2.3.1. Sous-types de DC et cross présentation

Il existe différentes sous-populations de DC qui sont notamment caractérisées par l'expression d'un panel de TLR (sous-type de PRR) particulier et des fonctions distinctes (Gardner and Ruffell, 2016) :

Parmi les DC circulantes, on distingue deux sous-types de DC dites myéloïdes ou conventionnelles (cDC) que sont les BDCA1+, les plus abondantes et favorisant les voies de présentation classiques, et les BDCA3+, plus rares et spécialisées dans la cross-présentation. Une troisième sous population, les DC BDCA2+, correspondent aux DC de type plasmacytoïde (pDC), pour lesquelles les capacités de phagocytose et de cross présentation sont sujets à controverses, mais qui sont capables de sécréter de grandes quantité d'IFN α . Enfin, les monocytes circulants, qui représentent une proportion importante des leucocytes sanguins, sont capables de se transformer en DC après recrutement et maturation à un site inflammatoire (iDC).

Le degré d'importance des différentes populations dendritiques dans l'immunité antitumorale n'est encore totalement défini. Les DC BDCA3+ sont indéniablement impliquées dans la génération de la réponse TCD8+ du fait de leur faculté accrue de cross présentation. Ainsi, la délétion des BDCA3+ dans un modèle murin suffit à abolir le rejet naturel de tumeurs très immunogéniques (Hildner et al., 2008). Cependant, il est fort probable que les DC BDCA1+ jouent également un rôle dans la réponse tumorale compte-tenu de l'importance de la réponse T CD4+ à la fois au niveau de l'amorçage de la réponse T CD8+ et au niveau du site tumoral (cf. Partie 1.1). Par ailleurs, les deux sous-types sont capables de phagocyter des antigènes du microenvironnement tumoral et de migrer aux ganglions lymphatiques où ils sont retrouvés à des quantités similaires (Roberts et al., 2016).

1.2.2.3.2. Compartiments endosomaux et cross-présentation

Il a été montré que la capacité de cross présentation antigénique des DC ne dépend pas uniquement du sous-type de DC mais peut également être modulée par le routage intracellulaire de l'antigène : Si lorsque la délivrance antigénique à lieu aux endosomes tardifs les BDCA3+ engendrent une meilleure cross-présentation que les BDCA1+, ce schéma disparaît lors d'une délivrance antigénique au niveau des endosomes précoces, et ce indépendamment de la quantité d'antigène (Cohn et al., 2013). Le ciblage aux endosomes précoces améliore également la cross-présentation chez les pDC (Cohn et al., 2013).

En effet, il a été montré que l'accumulation d'antigènes dans les endosomes précoces favoriserait la cross-présentation alors que l'acidification des endosomes tardifs en lysosomes favoriserait la présentation sur le CMHII (Schuette and Burgdorf, 2014a) : Comme les molécules du CMHI sont peu stables à la surface cellulaire et que la migration des DC aux ganglions lymphatiques prend du temps, il est important que la dégradation endosomale des peptides ne soit pas trop rapide et importante. La régulation principale de cette dégradation provient de l'alcalinisation des endosomes par recrutement de NOX2 (NAPDH oxydase 2) (Savina et al., 2006).

Le clivage des antigènes cross présentés implique notamment la cathepsine S active à pH neutre (Shen et al., 2004).

Les endosomes des DC étant moins acides et protéolytiques que ceux des macrophages, cela explique par ailleurs la faculté particulière des DC à cross présenter des antigènes par rapport aux macrophages (Savina et al., 2006).

1.2.2.3.3. Nature de l'antigène et cross-présentation

Selon la nature de l'antigène (soluble, particulaire, corpusculaire, ...) et sa composition, il va emprunter diverses voies d'entrées cellulaires (macropinocytose, endocytose par puits de clathrine, endocytose médiée par un récepteur, ou phagocytose) qui vont influencer sur la/les voie(s) d'apprêtement empruntée(s) par la suite (Burgdorf and Kurts, 2008).

Il a été postulé que pour les antigènes particuliers phagocytés, la compétition entre la cross-présentation et la présentation classique CMHII se ferait dans la durée, alors que pour les antigènes solubles, la balance entre ces deux voies dépendrait essentiellement de la localisation compartimentale de l'internalisation (Figure 11).

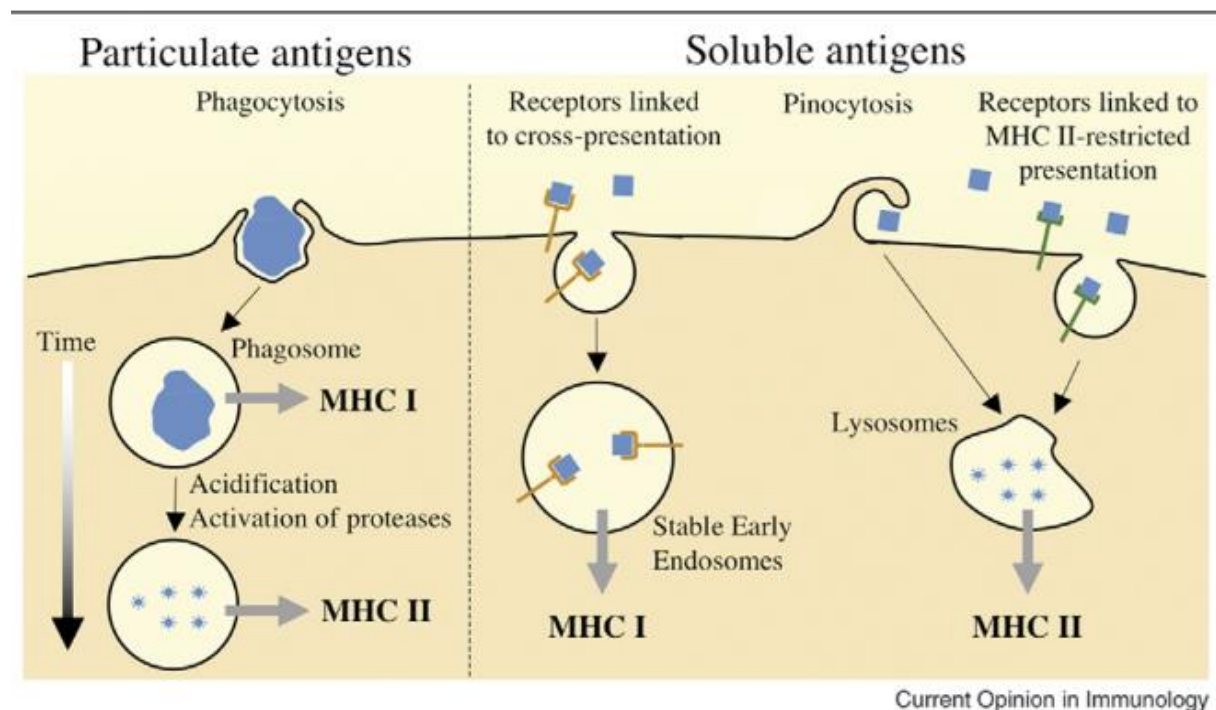


Figure 11: Influence de la forme de l'antigène sur ses voies d'internalisation et sa cross-présentation (Burgdorf and Kurts, 2008)

1.2.2.4. Autres modes de présentation antigénique

Certaines voies de présentation antigénique ne requièrent pas l'étape d'apprêtement intracellulaire de l'antigène.

Par exemple, les peptides extracellulaires correspondants exactement à une séquence épitopique CD8 ou CD4 peuvent se fixer directement sur les molécules du CMHI ou CMHII (respectivement) de la membrane cellulaire d'une CPA (ou d'une cellule quelconque pour le CMHI), à condition que leur affinité soit supérieure à celle du peptide déjà en place.

Par ailleurs, il a également été montré qu'une cellule pouvait transférer un complexe CMH-peptide membranaire à une autre cellule via le mécanisme de troglocytose, ou encore par échange d'exosome (Nakayama, 2014) ; On parle de cross-dressing (Figure 12).

La troglocytose est un échange rapide entre deux membranes plasmiques lors d'un contact rapproché entre deux cellules. Il a été montré qu'un transfert de complexe CMH-peptide par troglocytose était possible entre une APC et une autre APC, un lymphocyte T, une cellule tumorale ou encore une cellule NK, avec des conséquences variables sur la réponse immunitaire (Dhainaut and Moser, 2014).

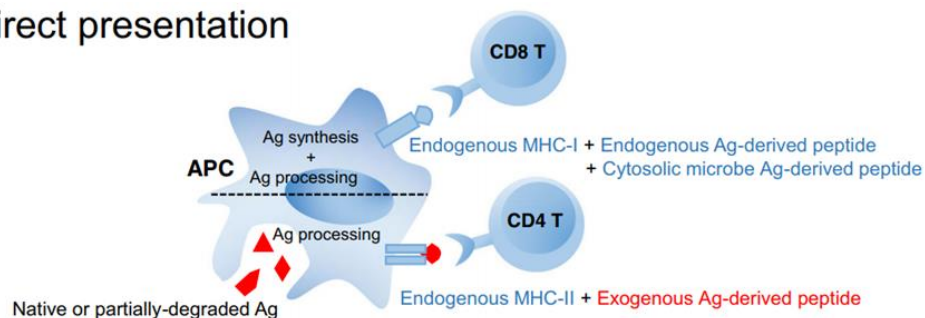
L'échange d'exosomes est plus long (plusieurs heures) et ne requiert pas de contact cellulaire. Il ne semble pas concerner le cross-dressing de lymphocytes ou NK mais plutôt le cross-dressing de DC (Nakayama, 2014).

Il est important de noter que le cross-dressing peut permettre la présentation de complexes CMH-peptide qui ne seraient physiologiquement pas exprimés sur la cellule receveuse, lorsque les voies d'apprêtement intracellulaire diffèrent entre les deux cellules.

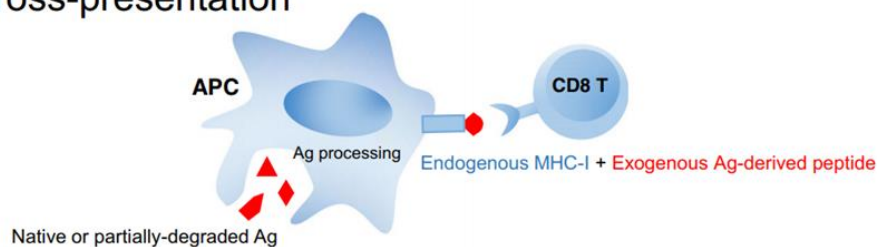
L'activation de LTC par cross-dressing de complexes CMH-peptide tumoraux sur des DC via troglocytose a été observée chez la souris. De plus, il a été montré que l'inhibition de ce mécanisme de présentation favorisait l'échappement tumoral et l'apparition de métastases (Zhang et al., 2008). Une autre étude a démontré *in vitro* que les pDC pouvaient acquérir des complexes CMH-peptide de cellules tumorales via troglocytose et stimuler la prolifération des T spécifiques associés (Bonaccorsi et al., 2014). En outre, il a été observé l'expression d'antigènes tumoraux sur des pDC isolées de cancer colorectaux humains, ce qui suggère l'existence de ce mécanisme *in vivo*. Ce mécanisme pourrait ainsi permettre aux pDC de cross-présenter des antigènes malgré leur faible activité d'endophagocytose.

A l'inverse, le transfert de complexe CMH-peptide peut s'avérer délétère pour la réponse immunitaire. D'autres études montrent que les TCD4+ ayant acquis un complexe CMHII-peptide d'une APC fonctionnent ensuite comme des APC immunosuppressives en inhibant la prolifération des Th effecteurs ou mémoires préalablement activés par l'APC (Helft et al., 2008). Ce mécanisme de régulation actif est observé dès le 2^{ème} jour de la réponse CD4 et n'est pas interrompu par la persistance d'APC ou par l'arrivée de nouvelles APC présentant l'antigène. De façon similaire, il a été observé que les NK ayant acquis des complexes CMHII-peptides d'une APC pouvaient eux aussi réguler négativement la réponse CD4 (Nakayama et al., 2011). Par ailleurs, les TCD8+ ayant acquis un complexe CMHI-peptide d'une APC peuvent être lysés par les LTC spécifiques de ce complexe (Trambas and Griffiths, 2003). Ces processus semblent être des mécanismes de régulation favorisant l'homéostasie des lymphocytes T. Cependant ils ne sont pas encore bien caractérisés.

a. Direct presentation



b. Cross-presentation



c. Cross dressing

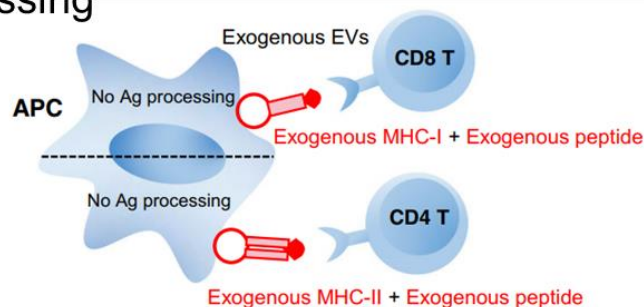


Figure 12 : Synthèse des principaux modes de présentation antigénique.

D'après (Zeng and Morelli, 2018)

1.3 Les mécanismes d'échappement tumoraux

La réponse immune antitumorale n'est pas infaillible comme le montre l'existence des cancers. De nombreux mécanismes d'échappement et de lutte sont ainsi adoptés par les cellules cancéreuses (Figure 7).

Les cellules tumorales présentent une résistance intrinsèque à la mort cellulaire du fait de leur phénotype (cf. Introduction) qui est renforcée par le climat cytokinique induit par la tumeur (IL-4, IL-10, PGE2, TGF β). En outre, elles peuvent échapper à la reconnaissance immune en perdant l'expression de leur antigène par endocytose, mutation, modification épigénétique, sous-expression du CMH, ou encore relargage extra-cellulaire (Bhatia and Kumar, 2014). Dans ce dernier cas, l'acquisition de l'antigène par une cellule quelconque ou par une CPA immunosuppressive peut mener à l'anergie des cellules T effectrices (Höchst et al., 2012).

Pour éviter la lyse par les LTC, les cellules tumorales peuvent également induire la surexpression d'un inhibiteur de la voie granzyme-perforine des LTC (Soriano et al., 2012) ou encore l'expression d'un récepteur soluble de FasL qui empêche l'interaction Fas/FasL d'avoir lieu (Pitti et al., 1998). Parallèlement, les cellules tumorales vont exprimer des ligands provoquant l'anergie des LTC tels que PD1 et CTLA4 (Ito et al., 2015), ou leur apoptose tels que FasL et TRAIL (Strand et al., 1996). De façon similaire les cellules tumorales induisent une altération qualitative et quantitative des NK (Mamessier et al., 2011).

Par ailleurs, la tumeur sécrète des médiateurs immunosuppresseurs qui vont limiter la réponse immune par divers mécanismes. On peut citer le lactate qui inhibe la prolifération, la sécrétion de cytokines et la cytotoxicité des LTC et des NK, notamment par acidification du pH (Bellone et al., 2013; Romero-Garcia et al., 2016). De plus, une compétition métabolique se met en place, notamment par l'hyperconsommation de glucose tumoral ce qui prive les TIL de ce nutriment essentiel et les empêche d'assurer efficacement leurs fonctions effectrices. En outre, l'environnement hypoxique entraîne une reprogrammation phénotypique des cellules immunes vers un phénotype tolérogène, reposant sur l'oxydation des acides gras (Kumar and Gabrilovich, 2014). Ainsi, les macrophages inflammatoires « M1 » deviennent immunosuppresseurs « M2 » et les polynucléaires se mettent à sécréter du VEGF (facteur angiogénique). Des cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC, Myeloid derived suppressor cell) sont recrutées et favorisent la prolifération de Th2 et de Treg ainsi que l'inhibition des Th1 et des NK (Sinha et al., 2007) (Li et al., 2009). Les Treg recrutés au site tumoral exercent une activité cytolytique directe envers les cellules effectrices de l'immunité antitumorale (cellules NK, lymphocytes T, DC) (Klabusay, 2015).

Partie 2 : La vaccination thérapeutique antitumorale

2.1 Place de la vaccination dans les traitements antitumoraux

2.1.1. Les grandes classes thérapeutiques antitumorales

L'arsenal thérapeutique dans la lutte contre les cancers peut se subdiviser en plusieurs grandes classes de traitement, que sont la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie, l'immunothérapie et les thérapies ciblées.

L'ablation chirurgicale des tumeurs fut le premier traitement utilisé et reste aujourd'hui le plus efficace. Cependant, elle est loin d'être réalisable ou se révèle suffisante pour la majorité des cas (tumeur inaccessible, opération trop lourde, existence de métastases au diagnostic).

L'apparition de la radiothérapie et de la chimiothérapie a permis d'améliorer l'espérance de vie des patients atteints de cancers, et ces thérapeutiques occupent encore aujourd'hui une grande place dans l'arsenal thérapeutique en oncologie. Elles induisent l'apoptose ou inhibent la prolifération cellulaire en agissant préférentiellement sur les cellules à divisions rapides, dont les cellules cancéreuses. Néanmoins, ces traitements non spécifiques sont à l'origine de nombreux effets secondaires systémiques affectant grandement la qualité de vie des patients. En particulier, ils sont généralement associés à une immunodépression qui limite la réponse antitumorale naturelle et favorise le développement de cancers secondaires. Enfin, la réponse clinique à ces traitements varie selon les patients et est limitée par le développement de résistances tumorales.

L'hormonothérapie fait également partie des grandes classes thérapeutiques antitumorales. Elle est réservée aux cancers hormono-sensibles (cancer du sein, cancer de la prostate) et entraîne majoritairement des effets indésirables de type endocrinien. Son efficacité est souvent restreinte par la mise en place d'une hormonorésistance.

Les thérapies ciblées inhibitrices de tyrosine kinase (ITK), apparues au 21^{ème} Siècle, ont grandement contribué à améliorer la survie des patients cancéreux :

Les voies de signalisation intracellulaires régissant la « vie » et le « devenir » de la cellule dépendent en grande partie de la phosphorylation d'effecteurs par des protéines nommées tyrosine-kinases, souvent cibles de mutations cancéreuses (surexpression, activation constitutive). Les inhibiteurs de tyrosine-kinases (ITK) permettent de bloquer les signaux de survie et/ou de prolifération des cellules cancéreuses en ciblant essentiellement des tyrosine-kinases mutées, ce qui épargne les cellules saines. Ces thérapies ciblées ont par conséquent profil de tolérance optimisé par rapport à celui des classes de traitements précités. Actuellement, il existe plus de 25 ITK commercialisés.

Cependant, ces ITK sont restreints aux patients dont la tumeur porte la mutation appropriée, et sont sujets à des résistances primaires ou secondaires (variations épigénétiques du gène ciblé, mutations secondaires, activation de voies de signalisation compensatrices) (Gross et al., 2015).

L'immunothérapie a également fait son apparition au 21^{ème} Siècle et s'est rapidement imposée en tant que grande classe thérapeutique dans la lutte contre le cancer.

2.1.2 Les immunothérapies

2.1.2.1. Les cytokines

La première immunothérapie ayant montré des réponses cliniques à long terme et à avoir été approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) fut l'IL-2 à haute dose chez les patients atteints de mélanome (Atkins et al., 1999). Encore utilisés aujourd'hui, les traitements à base de cytokines (IL-2, IFN α) engendrent des effets indésirables de type auto-immun car ils stimulent de façon globale le système immunitaire (et pas seulement la réponse antitumorale).

2.1.2.2. Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux spécifiques d'antigènes tumoraux sont récemment arrivés sur le marché. L'évolution des techniques de production d'anticorps a permis d'améliorer leurs propriétés thérapeutiques et leur tolérance ; D'abord chimériques, puis humanisés, et pour finir humain, de nouvelles générations émergent actuellement telles que les anticorps bispécifiques, polyréactifs ou à domaine unique. Les anticorps monoclonaux peuvent servir de vecteurs pour la délivrance spécifique de toxine ou de radioisotope au niveau tumoral (ex : Brenduximab Vedotin indiqué dans le lymphome d'Hodgkin), bloquer la croissance tumorale en ciblant des facteurs de croissance ou leurs récepteurs (ex : Trastuzumab indiqué dans le cancer du sein, ciblant le récepteur HER2 du facteur de croissance épidermique humain), ou encore stimuler l'immunité antitumorale par inhibition des points de contrôle immunitaire (ICI, Immune Checkpoint Inhibitors).

Tout particulièrement, les ICI ont constitué une révolution majeure en termes d'amélioration de la survie et de la qualité de vie des patients cancéreux (Figure 13) :

Le CTLA4 est un récepteur inhibiteur exprimé par les lymphocytes T qui par interaction avec ses ligands CD80/CD86 exprimés par la DC entraîne une anergie, à l'inverse du CD28 dont la liaison avec ces mêmes ligands constitue le signal 2 d'activation lymphocytaire (cf Partie 1.1). Le traitement par anticorps antagonistes anti-CTLA-4 (ipilimumab) a rendu possible une survie de plusieurs années chez des patients atteints de cancers métastatiques dont l'espérance de vie était initialement de quelques mois (Hodi et al., 2010).

Le récepteur PD1 exprimé à la surface des lymphocytes T entraîne leur anergie lorsqu'il interagit avec son ligand PDL1, qui peut notamment être surexprimé sur les cellules tumorales (cf. Partie 1.3). Le traitement par anticorps antagonistes anti-PD1 (nivolumab) s'avère plus efficace et mieux toléré que l'ipilimumab. Il a permis d'allonger la survie voir de guérir des patients pour de nombreux cancers (du poumon, de la vessie, du rein, du côlon hypermutés, ainsi que le lymphome de Hodgkin, et le mélanome) (Topalian et al., 2012).

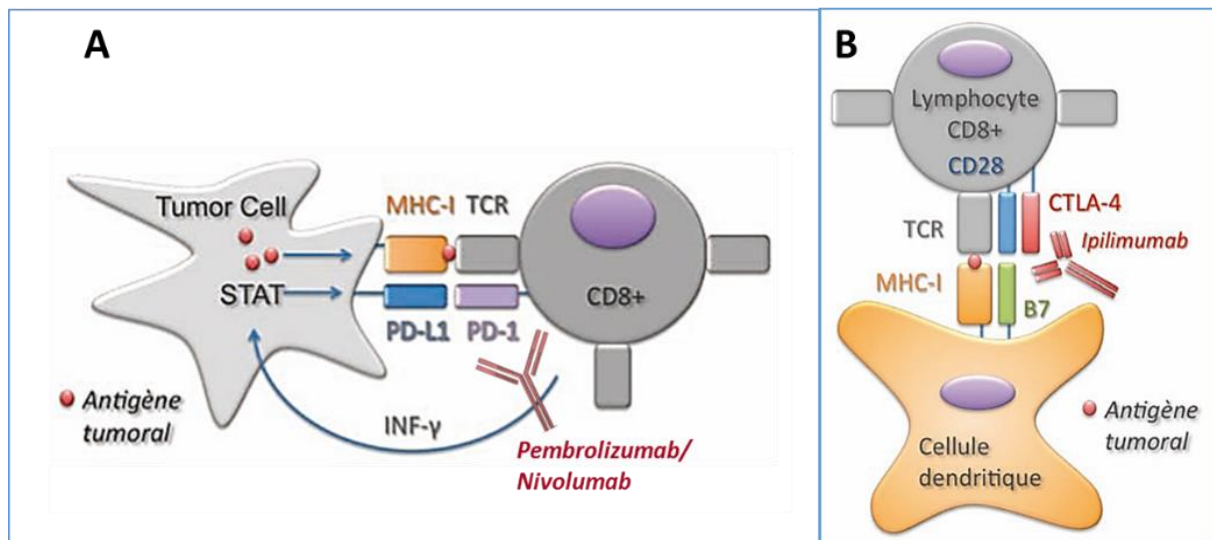


Figure 13 : Schéma du mécanisme d'action des ICI anti-CTLA4 (A) et anti-PD1 (B).
 ("Nouvelles Armes Thérapeutiques Contre Le Mélanome de Stade IV - Revmed" 2016).

Néanmoins, tout comme les cytokines, les ICI agissent sur le système immunitaire de façon systémique ce qui génère de l'auto-immunité (Hofmann et al., 2016; Zimmer et al., 2016). En outre, l'efficacité d'un ICI repose sur l'existence d'une réponse immune spécifique robuste préexistante qui va être responsable de l'effet antitumoral lorsque son inhibition sera levée. Or, ce n'est pas toujours le cas. Le taux de réponse du nivolumab est par exemple de 30%, ce qui est conséquent mais peut être amélioré.

D'autres stratégies ciblant les points de contrôle de la réponse T sont également en cours de développement et concernent notamment les récepteurs inhibiteurs LAG-3 et TIM3 (Anderson, 2014; Goldberg and Drake, 2011) et les récepteurs activateurs OX40 et CD137 (Linch et al., 2015; Vinay and Kwon, 2014). Ces cibles sont évaluées en monothérapies ou en combinaison.

2.1.2.3. Les thérapies cellulaires

Les thérapies cellulaires sont une autre sous-catégorie d'immunothérapies. Contrairement aux cytokines et ICI, ce sont des immunothérapies dites « spécifiques » car elles ciblent les cellules tumorales. Leur profil de tolérance est donc supérieur.

La première immunothérapie cellulaire développée a été le transfert adoptif de TIL. Isolés de la tumeur du patient, ils sont cultivés en présence d'IL-2 puis réinjectés (Figure 14a). Cette thérapie cellulaire autologue a permis d'obtenir des réponses complètes durables dans les mélanomes métastatiques TIL (Rosenberg et al., 2011) et d'autres cancers solides.

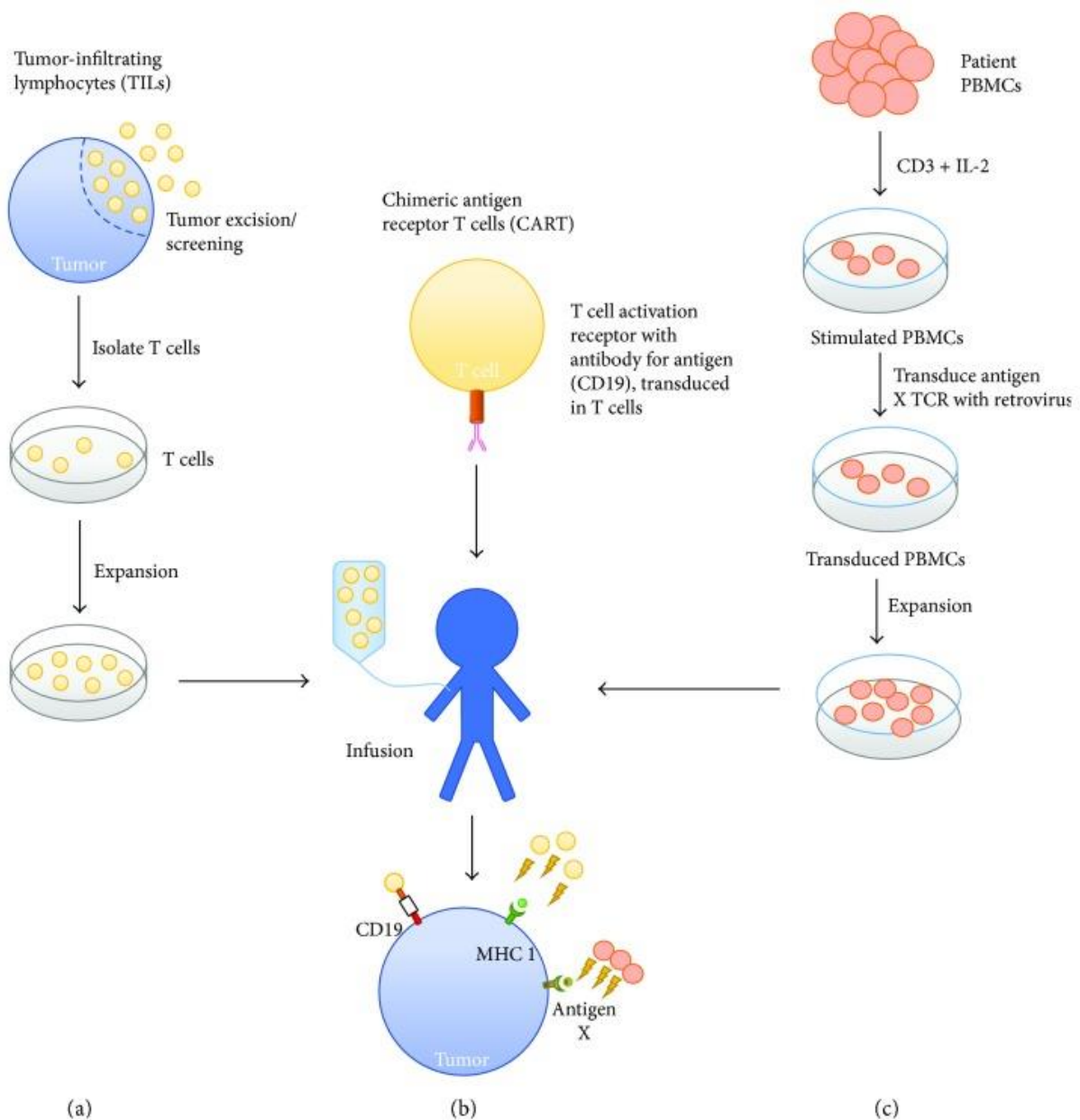


Figure 14 : Les différentes thérapies cellulaires. (a) Transfert adoptif de TIL autologues. (b) Induction de l'expression d'un CAR-T anti-CD19. (c) Transfert adoptif de TIL transduits pour exprimer des TCR spécifiques d'antigènes tumoraux. D'après (Koury et al., 2018).

Les TIL peuvent également être modifiés par transfection rétrovirale pour exprimer un TCR spécifique d'un antigène tumoral (Figure 14c). Dans un essai pilote sur des patients atteints de mélanome ou de sarcome, le traitement par TIL exprimant un TCR spécifique de l'antigène NY-ESO-1 a permis l'obtention de réponses cliniques chez plus de la moitié des patients (Robbins et al., 2015).

Une autre approche consiste à faire exprimer au TIL par transfection lentivirale un TCR génétiquement modifié (CAR-T, chimeric antigen receptor T) spécifique d'un antigène tumoral. Les CAR-T ont une structure similaire aux anticorps (BCR) et reconnaissent des antigènes tumoraux extracellulaires sous forme native (Figure 14b). Il en existe plusieurs générations. Cette technique a connu des succès impressionnants notamment dans le traitement des leucémies, notamment avec les CAR-T anti-CD19 (marqueur de lignée des lymphocytes B) (Maude et al., 2014).

Cependant, ces thérapies cellulaires « à la carte » sont lourdes et coûteuses (extraction de TIL, culture *ex vivo* de plusieurs semaines, +/- identification d'antigènes et génération de CAR-T), et donc difficilement applicables dans la pratique et/ou généralisables au plus grand nombre de patients. En outre, la quantité de TIL prélevable est très variable d'un patient à l'autre.

Des tentatives de simplification sont à l'étude par utilisation de CAR-T allogéniques dont les TCR endogènes ont été supprimés pour éliminer la réaction greffon versus hôte (GVH) et qui pourraient donc être utilisés pour traiter plusieurs patients (Anwer et al., 2017).

2.1.2.4. Les vaccins

Les cytokines, les ICI et les thérapies cellulaires sont considérées comme des immunothérapies passives, qui induisent une réponse immunitaire « artificielle » et transitoire, sans développement d'une mémoire immune. Elles nécessitent donc d'être administrées de manière répétée pour être efficace dans le temps. Pour les thérapies cellulaires cela représente un inconvénient majeur aux vues de la lourdeur de ces procédures en termes de technicité, d'impact physique sur le patient, et de coût (mise en place de centres dédiés avec tout l'équipement nécessaire).

A l'inverse, la vaccination antitumorale constitue une immunothérapie active qui a pour vocation d'induire une véritable immunité tumorale endogène durable comprenant des cellules effectrices et mémoires. Cela permet d'espérer l'obtention d'une rémission totale ainsi que la prévention de récurrences cancéreuses ou de métastases.

La vaccination thérapeutique représente aujourd'hui un champ très actif de recherche et ambitionne de devenir la future révolution antitumorale. C'est l'immunothérapie qui « mime » au plus près la réponse naturelle antitumorale (Figure 15). Elle repose sur un rationnel solide compte tenu de l'importance de cette réponse dans la protection contre les cancers, et présente un rapport bénéfice/risque optimal du fait de la spécificité antigénique de son effet.

Par ailleurs, la vaccination offre l'avantage de pouvoir optimiser la réponse immune par une stratégie antigénique pertinente, un design vaccinal approprié, et l'association possible de plusieurs épitopes ou antigènes tumoraux dans le même vaccin, ce qui retarde l'apparition de résistances secondaires par échappement ou immunoédition tumorale. Il est plus difficile techniquement de mettre en place des stratégies polyspécifiques définies et optimisées avec des anticorps monoclonaux ou des thérapies cellulaires.

Enfin, certaines stratégies de vaccination, notamment peptidiques, présentent des avantages certains en termes d'applicabilité (coût, simplicité de production et d'administration) qui faciliteraient leur administration au plus grand nombre.

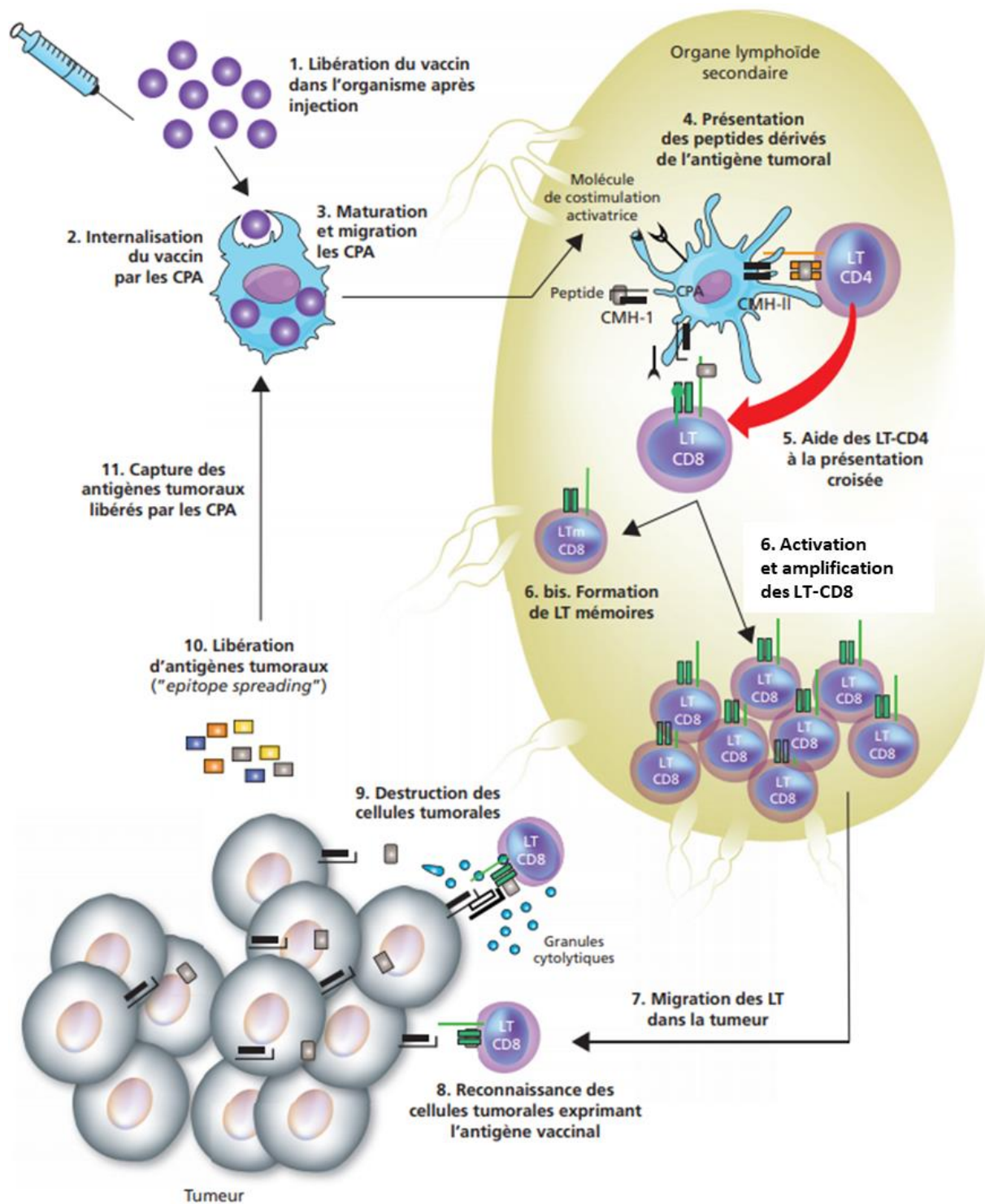


Figure 15 : Principe de la vaccination thérapeutique antitumorale. D'après (Blanc et al., 2017)

2.2. La vaccination thérapeutique antitumorale

2.2.1. Historique de la vaccination

Un vaccin est une préparation antigénique immunogène, qui administrée à un individu lui permet d'acquérir une immunité protectrice active durable et spécifique contre un pathogène. La vaccination est l'un des plus grands triomphes de la médecine et a été un tournant décisif dans la guerre entre Homme et microbes. Elle a permis l'éradication de nombreuses épidémies mortelles, et ce pour un coût dérisoire par rapport aux bénéfices en termes de santé publique engendrés.

Les premières tentatives rudimentaires de vaccination ont été effectuées par les Chinois et les Turcs au XV^{ème} siècle, qui avaient observés que les survivants d'une infection par la variole, une maladie mortelle dans 30% des cas, étaient par la suite protégés de l'infection à vie. L'inoculation de croûtes desséchées de pustules provenant de sujets contaminés à des sujets sains à travers des scarification de peau ou encore par inhalation était alors pratiquée. Cette technique nommée « variolisation » était peu efficace puisqu'elle aboutissait à une sévère maladie ou à la mort dans un grand pourcentage de cas. Elle fut considérablement améliorée en 1789 par Edward Jenner, qui fut également le premier à prouver par expérience le principe de l'immunité anti-infectieuse (Baxby, 1999). Il inocula à un enfant le virus de la vaccine (variole de la vache, bénigne chez l'Homme) avant de l'exposer volontairement à la variole, que l'enfant ne contracta pas.

Sa technique se répandit rapidement en Europe, mais il fallut presque un siècle avant qu'elle ne soit appliquée à d'autres pathologies. En 1879, Louis Pasteur parvient à immuniser des poulets contre la toxine du choléra en leur inoculant des vieilles souches bactériennes dont la virulence avait été atténuée par la culture, alors que l'inoculation de cultures fraîches leur était fatale. Il nomma cette technique « vaccination » en l'honneur des travaux de Jenner, et étendit ce principe de vaccin vivant atténué à d'autres pathologies. Ainsi, en 1881, il immunisa un troupeau de moutons contre le bacille du charbon atténué par la chaleur, et en 1885 il réalisa la première vaccination sur l'Homme avec un virus atténué de la rage (Plotkin, 2014).

A la fin du 19^{ème} siècle, on découvre qu'il est possible d'induire une immunisation en utilisant un pathogène inactivé (non vivant) (Salmon and Smith, 1880). Cette technique est ensuite utilisée pour le développement de vaccins antibactériens.

Parallèlement, un vétérinaire français nommé Gaston Ramon est à l'origine du concept d'adjuvant en observant que les chevaux ayant développés un abcès au site d'injection possèdent un titre sérique d'anticorps plus important. Au même moment, l'immunogénicité des sels d'aluminium est mise en évidence par Alexander Glenny. C'est le premier adjuvant utilisé chez l'Homme en 1932, et cela restera le seul jusqu'à la fin du 20^{ème} siècle (Di Pasquale et al., 2015).

Le champ de la vaccination subit de nouvelles avancées majeures au 20^{ème} siècle. D'une part grâce au développement de nouvelles techniques vaccinales telles que les protéines recombinantes, les polysaccharides conjugués, les réassortiments viraux, et enfin la production par génie génétique (Valenzuela et al., 1982). D'autre part grâce à l'amélioration des connaissances en immunologie (notamment la distinction entre les réponses humorale et cellulaire) qui fait évoluer la recherche vaccinale de l'empirisme vers une conception rationnelle. L'observation de corrélats de protection, les tests sur modèles animaux, et l'administration passive d'anticorps spécifiques pour identifier quels antigènes sont protecteurs sont ainsi utilisés (Plotkin, 2014).

Grâce aux campagnes de vaccination mondiales, la variole fut totalement éradiquée en 1977 à l'aide d'un vaccin peu différent de celui utilisé par Jenner deux siècles plus tôt. Aujourd'hui, la rougeole, les oreillons, la varicelle, la coqueluche, le tétanos, la diphtérie et la polio sont devenues rares voire inexistantes dans les pays industrialisés du fait des campagnes vaccinales actuelles, ce qui a considérablement augmenté l'espérance de vie des plus jeunes.

Les vaccins actuellement commercialisés sont essentiellement à visée anti-infectieuse et administrés dans un cadre préventif. Ils induisent pour la majorité une réponse immune de type humorale caractérisée par la production d'anticorps.

Certains vaccins anti-infectieux ont également un rôle antitumoral. C'est le cas des vaccins contre le papillomavirus dont l'indication est la prévention du cancer du col de l'utérus. En effet, une infection par certaines souches virulentes du papillomavirus (notamment HPV-16 et HPV-18) est présente dans 70 % des cancers du col de l'utérus, alors que le risque de développement de ce cancer chez les femmes non infectées est quasi nul (Ramakrishnan et al., 2015). De la même manière, les vaccins commercialisés contre les virus des hépatites permettent également de réduire le risque de cancer du foie, bien qu'ils soient commercialisés dans le but de prévenir contre les infections en elles-mêmes.

2.2.2. Les stratégies vaccinales antitumorales

Un vaccin thérapeutique antitumoral peut se définir comme une préparation antigénique immunogène qui administrée à un patient lui permet d'acquérir une immunité protectrice active durable et spécifique contre ses cellules cancéreuses. L'objectif est principalement d'obtenir une régression de la tumeur et des métastases mais également de prévenir l'apparition de rechutes. Certaines stratégies vaccinales sont à la frontière entre vaccins et thérapies cellulaires car consistent à administrer la préparation antigénique *ex vivo* sur des DC autologues ensuite réinjectées.

A l'inverse de la vaccination anti-infectieuse, le développement de la vaccination antitumorale n'a débuté que près d'un siècle après la découverte de Coley, retardée par le manque de connaissances sur les antigènes tumoraux et sur les mécanismes de mise en place d'une réponse de type cellulaire.

2.2.2.1. Les vaccins « tumoraux »

Les premières stratégies vaccinales antitumorales étudiées consistaient à l'utilisation de cellules tumorales ou d'un lysat tumoral irradiés comme source antigénique brute (Figure 16). Cette préparation tumorale pouvait être modifiée pour induire l'expression d'antigènes immunogènes particuliers ou celle d'adjuvants tels que du GM-CSF, qui favorise le recrutement des DC *in vivo* (Soiffer et al., 1998). Des stratégies de « vaccins tumoraux » autologues (Soiffer et al., 1998) ou allogéniques (Vaishampayan et al., 2002) se sont ainsi développées.

L'avantage du vaccin tumoral autologue est qu'il contient les antigènes tumoraux exprimés chez le patient. Néanmoins, il existe un risque de tolérance préexistante ou induite par la vaccination due à la présence de molécules immunosuppressives dans le lysat tumoral. De plus les antigènes tumoraux les plus immunogènes se retrouvent dilués avec les antigènes du Soi.

Ce risque peut être écarté par l'utilisation de lignées allogéniques tumorales caractérisées, telles que les lignées de mélanome MelS et Mel D dans le vaccin MELACINE (Sosman and Sondak, 2003), permettant en outre une vaccination à plus grande échelle. Néanmoins, leur efficacité est dépendante de l'adéquation entre les antigènes tumoraux propres au patient et ceux présents dans le vaccin.

Plus globalement, la réponse clinique des vaccins tumoraux est variable selon les patients et difficilement prédictible et/ou optimisable du fait de l'absence de caractérisation précise des antigènes et acteurs immuns mis en jeu. Bien que certaines équipes de recherche développent encore ce type de vaccination, la majorité du champ de la recherche en vaccination intratumorale se concentre aujourd'hui sur les stratégies vaccinales de spécificité antigénique définie. Selon la source d'antigène utilisée, on parle de vaccins nucléiques ou de vaccins peptidiques.

2.2.2.2. Les vaccins nucléiques

Les vaccins nucléiques sont destinés à induire l'expression ou la sécrétion de grandes quantités d'antigène dans leurs cellules cibles (Figure 16). Leur mécanisme d'action *in vivo* et sa régulation sont peu caractérisés. Les vaccins à ADN ont une longue durée de vie dans l'organisme mais sont peu immunogènes et présentent un risque d'intégration sur des sites favorisant l'oncogénèse. Les vaccins à ARN ne présentent pas ces inconvénients mais leur stabilité est moindre. En outre, l'inconvénient majeur de ces vaccins nucléiques est leur faible taux de transfection *in vivo*. Cette problématique peut être résolue par l'utilisation d'un vecteur (essentiellement viral), qui a généralement un rôle complémentaire d'adjuvant, et peut être conçu pour cibler les DC ou les cellules cancéreuses.

2.2.2.3. Les vaccins peptidiques

Les vaccins peptidiques contiennent des antigènes destinés à être apprêtés puis présentés par les DC aux lymphocytes T (Figure 16). Etant injectés dans le milieu extracellulaire, la présentation d'épitopes fait intervenir la voie exogène classique pour le CMHII et la cross-présentation pour le CMHI, de façon similaire à l'initiation d'une immunité antitumorale endogène. La connaissance approfondie des voies de présentation antigénique ainsi que de la biologie cellulaire et la dynamique des DC permet d'adapter leur construction pour optimiser leur immunogénicité, qui est par ailleurs facile à mesurer *in vitro* et *in vivo*. Simples à produire, peu toxiques et extrêmement stables, ils sont intrinsèquement peu immunogènes mais peuvent se combiner à toutes sortes d'adjuvants ou de vecteurs pour optimiser leur adressage aux DC ainsi que l'activation et la migration de ces cellules aux ganglions lymphatiques.

2.2.2.4. Les vaccins cellulaires

Comme pour les lysats tumoraux, ces vaccins nucléiques et peptidiques peuvent être administrés dans le cadre d'une thérapie cellulaire sur des DC *ex vivo* (Figure 16). Cela permet d'éviter le risque de dégradation *in vivo* du vaccin et d'avoir un contrôle total sur l'étape d'activation et de chargement antigénique des DC. Néanmoins, cela rejoint les inconvénients d'applicabilité des thérapies cellulaires.

De façon surprenante, il a été montré sur modèles murins transgéniques que la réponse T médiée par des DC chargées en vaccin peptidique ou nucléique dépendait principalement de la migration aux ganglions des DC endogènes ayant acquis par cross-dressing les complexes CMH-peptides des DC injectées, et que le cross-dressing était une voie de présentation robuste à l'instar de la cross présentation (Kleindienst and Brocker, 2003; Li et al., 2012). (Li et al., 2012). Ce mécanisme de présentation a également été observé pour un vaccin composé de cellules tumorales génétiquement modifiées pour exprimer CMHII et molécules de costimulation (Dolan et al., 2006).

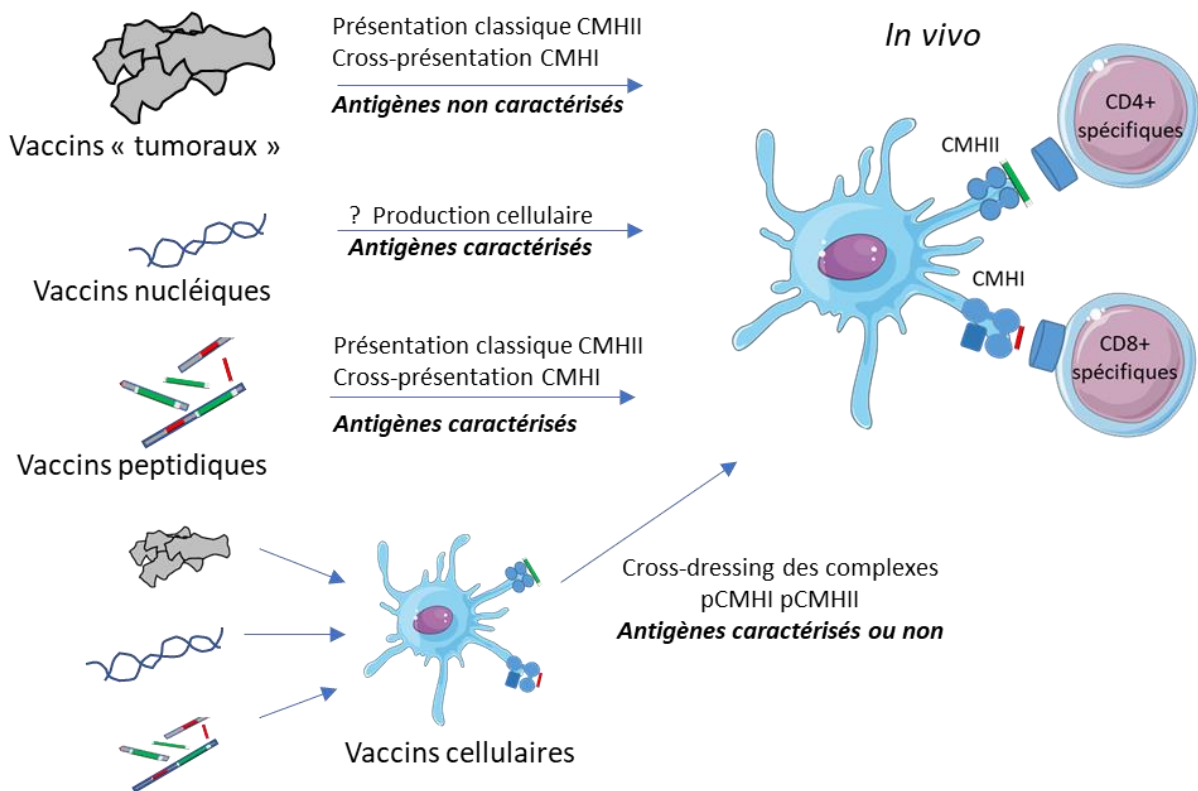


Figure 16 : Les différents types de vaccins antitumoraux et leurs mécanismes de présentation
 (Figure originale, images de smart.servier.com).

2.2.3 Leçons et perspectives du développement de vaccins thérapeutiques antitumoraux

Depuis une quarantaine d'années, de multiples stratégies vaccinales ont ainsi été développées jusqu'au stade des essais cliniques.

Brièvement, les essais précliniques concernent les tests sur modèles animaux alors que les essais cliniques sont menés chez l'Homme. Les essais cliniques de Phase I sont menés sur un groupe limité de patients et ont pour objectif d'évaluer la tolérance du vaccin. Ils sont parfois couplés aux essais cliniques de phase II (Phase I/II) qui ont pour objectif de déterminer l'immunogénicité vaccinale en fonction de la dose. Les essais cliniques de phase III sont construits pour pouvoir évaluer statistiquement l'efficacité thérapeutique du vaccin sur un échantillon de patients plus important, par comparaison à un placebo ou au traitement de référence. Il est parfois rapporté des bénéfices thérapeutiques en essais de phase II, néanmoins ils n'ont qu'une valeur prédictive, et leur validation lors d'un essai de phase III est indispensable.

Actuellement, l'efficacité clinique est jusque là restée très limitée car peu de vaccins ont atteint ou validé la phase III.

Mise à part le vaccin MELACINE®, il existe quelques traitements commercialisés qui s'apparentent à des vaccins antitumoraux :

Il s'agit d'une part du Sipuleucel-T (PROVENGE®), indiqué dans le cancer de la prostate métastatique résistant à l'hormonothérapie. Approuvé en 2013 par l'EMA (European Medical Agency), il permet une amélioration de la survie à 3 ans d'environ 4 mois chez 38% des patients. PROVENGE® est une protéine de fusion composée d'un antigène tumoral (phosphatase de l'acide prostatique) et d'un adjuvant (GM-CSF), qui est administré *ex vivo* sur les DC du patient ensuite réinjectées, avec un schéma thérapeutique de 3 injections espacées de 2 semaines. Le coût de ce traitement était estimé à 70 000 euros en 2012.

D'autre part, le T-VEC® a eu l'approbation de l'EMA en 2015 pour son utilisation dans le traitement chez l'adulte du mélanome non résectable métastatique sans atteinte osseuse, cérébrale, pulmonaire ou d'autres organes internes. Il s'agit d'un virus recombinant de l'herpès infectant essentiellement les cellules tumorales et sécrétant du GM-CSF. C'est le premier virus oncolytique commercialisé et son mécanisme d'action est double : (1) destruction des cellules tumorales par infection et (2) activation de la réponse immunitaire spécifique via la nécrose tumorale source d'antigènes et via la sécrétion de GM-CSF favorisant le recrutement et la maturation des DC. Bien qu'il soit présenté comme un vaccin antitumoral, il n'est pas constitué d'une préparation antigénique, l'immunité active et spécifique qu'il engendre n'est pas caractérisée, et elle constitue une conséquence indirecte de l'activité oncolytique du virus.

Ce petit nombre de vaccins antitumoraux thérapeutiques sur le marché malgré les nombreuses stratégies vaccinales amenées jusqu'au stade des essais cliniques tous types confondus s'explique par de nombreux facteurs. Notamment :

(1) l'inadéquation entre les modèles animaux précliniques et l'Homme rendant l'efficacité clinique difficilement prédictible

(2) l'utilisation de biomarqueurs qui ne reflètent pas l'efficacité clinique

(3) l'utilisation d'un design vaccinal sous-optimal

(5) l'absence de combinaison de traitements visant à lever l'immunosuppression tumorale locale ou à favoriser l'activation immunitaire

(7) une mauvaise sélection de la population cible des essais cliniques qui est majoritairement constituée de patients porteurs d'un cancer de stade avancé, résistant aux traitements conventionnels, et associés à un mauvais statut immun.

Toutes ces problématiques ont été identifiées et sont en cours de résolution, ce qui laisse espérer que la vaccination thérapeutique face prochainement partie intégrante des traitements anticancéreux.

En particulier, les progrès récents dans la compréhension du rôle des adjuvants, de la voie d'administration et de la dynamique des lymphocytes T et des DC ont permis une renaissance de l'approche par vaccination peptidique (Kumai et al., 2017). Cela a permis l'enchaînement rapide de multiples découvertes concernant l'influence des stratégies vaccinales employées (antigène, design, formulation) sur l'immunogénicité, qui font aujourd'hui de la vaccination peptidique un champ de recherche en constante évolution. De nouveaux design vaccinaux optimisés voient le jour régulièrement et semblent très prometteuses.

L'objectif de cette thèse est de présenter l'évolution des stratégies vaccinales peptidiques (de manière non exhaustive) en fonction des avancées scientifiques, et en se focalisant principalement sur le rationnel de développement de nouvelles constructions antigéniques optimisées (cf. Partie 3.1 et 3.2), et en abordant également les perspectives d'optimisation de la formulation (cf. Partie 3.3) et de l'administration (cf. Partie 3.4).

Les problématiques des modèles animaux, des biomarqueurs, de la population cible, et des éventuelles combinaisons de traitement seront brièvement discutées dans la conclusion.

Partie 3 : Le développement des vaccins peptidiques

3.1. Détermination de la stratégie antigénique

3.1.1. Méthodes d'identification des antigènes tumoraux

3.1.1.1. Méthodes de screening génétiques

Le premier antigène tumoral a été identifié en 1991 par Thierry Boon et son équipe dans des cellules de mélanomes humains et a été nommé melanoma antigen 1 ou MAGE-1 (van der Bruggen et al., 1991). Depuis cette découverte, plus de 400 déterminants antigéniques humains de nature protéique ont été identifiés, notamment grâce à l'amélioration des connaissances en génie génétique (Vita et al., 2015).

La méthode d'identification utilisée par Boon consiste à co-cultiver des cellules tumorales irradiées et des lymphocytes T issus d'un même patient afin de faire proliférer les lymphocytes T spécifiques d'antigènes tumoraux. Chaque lymphocyte est ensuite isolé dans un puit de culture par dilution limitante afin d'obtenir une lignée de « clones » de même spécificité antigénique lors de son expansion. Une banque d'ADNc est préparée sur des cellules receveuses par transfection d'ARNm provenant des cellules tumorales ainsi que d'un gène du CMH de polymorphisme approprié. Les clones T sont alors utilisés pour sélectionner des sous-populations de cellules receveuses, dont le génome est comparé afin d'identifier l'antigène tumoral reconnu.

L'identification de l'épitope peptidique issu de l'antigène suit le même principe. Cette technique est fiable mais fastidieuse et requiert un nombre significatif de lymphocytes T (Figure 17).

Une autre technique consiste à screener une banque d'ADNc tumorale en utilisant le sérum des patients afin d'identifier les antigènes tumoraux reconnus par des lymphocytes B (Pfreundschuh et al., 1978), dont certains tels que NY-ESO-1 sont également reconnus par les lymphocytes T (Korangy et al., 2004). Cette approche appelée SEREX (serological analysis of recombinant expression libraries with autologous serum) est restreinte aux patients atteints de cancers présentant une forte réponse antitumorale humorale.

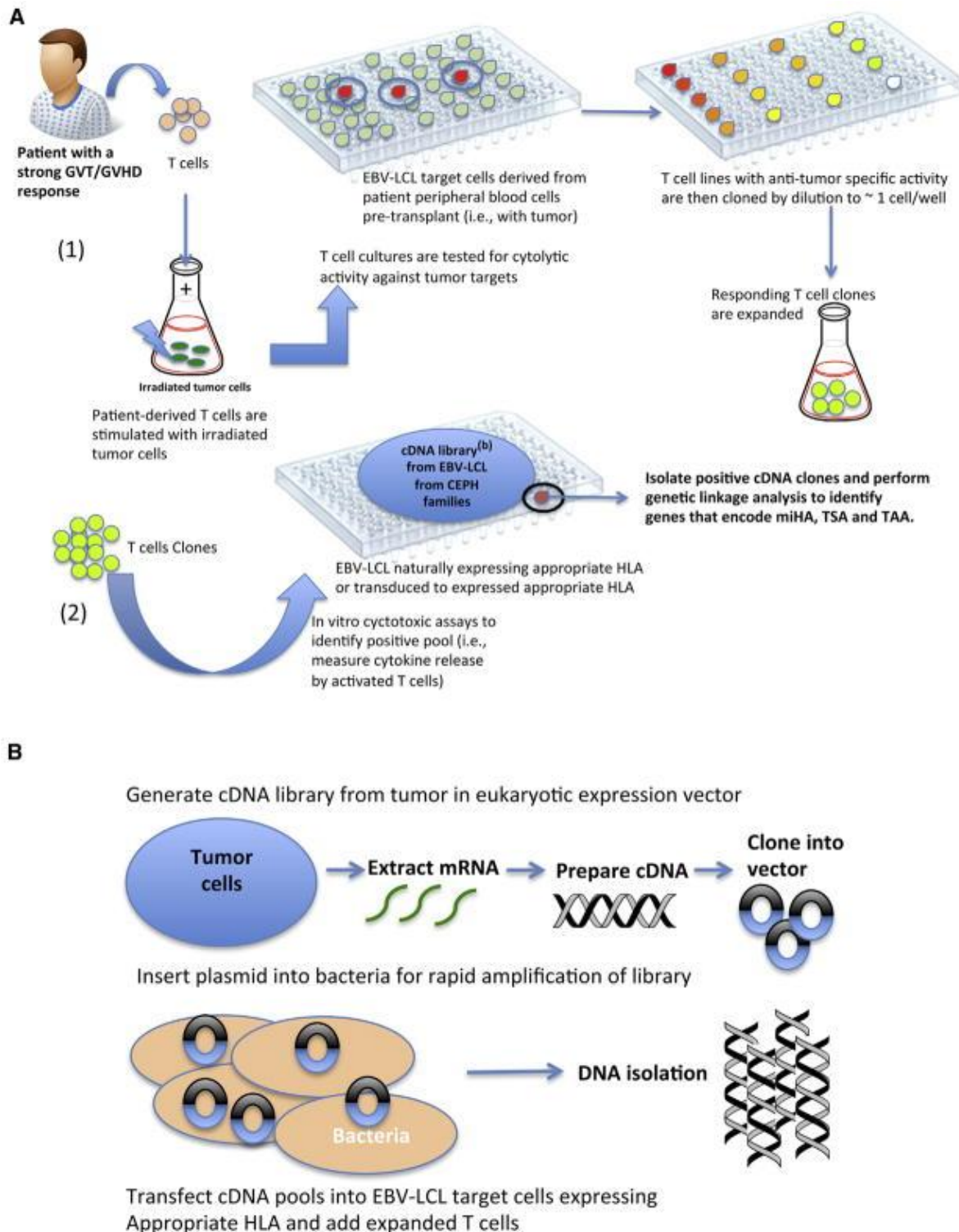


Figure 17 : Illustration du protocole d'identification d'antigènes tumoraux par screening génétique. (A) (1) Les TIL sont prélevés, stimulés in vitro par les cellules tumorales irradiées, puis les clones T sont isolés par dilution limitante avant d'être expandus. **(2)** Ils sont ensuite confrontés à une banque d'ADNc de cellules receveuses. La séquence ADNc de la cellule receveuse reconnue est comparée au génome tumoral pour retrouver l'antigène tumoral original. **(B)** La banque d'ADNc est générée par transfection plasmidique bactérienne. D'après (Zilberberg et al., 2015).

3.1.1.2. Approche protéomique par HPLC/MS

En parallèle de ces méthodes de screening génétiques, une technique biochimique consiste à immunoprécipiter les molécules du CMH exprimées à la surface des cellules tumorales, puis en éluer les épitopes peptidiques par solution acide afin de les purifier par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Chaque fraction de peptides est alors testée *in vitro* pour sa capacité à induire une réponse LTC, et les peptides d'intérêt sont séquencés après analyse de leur séquence par spectrométrie de masse (MS) (Figure 18). L'antigène Gp100 a ainsi été identifié par Cox et ses collaborateurs (Cox et al., 1994).

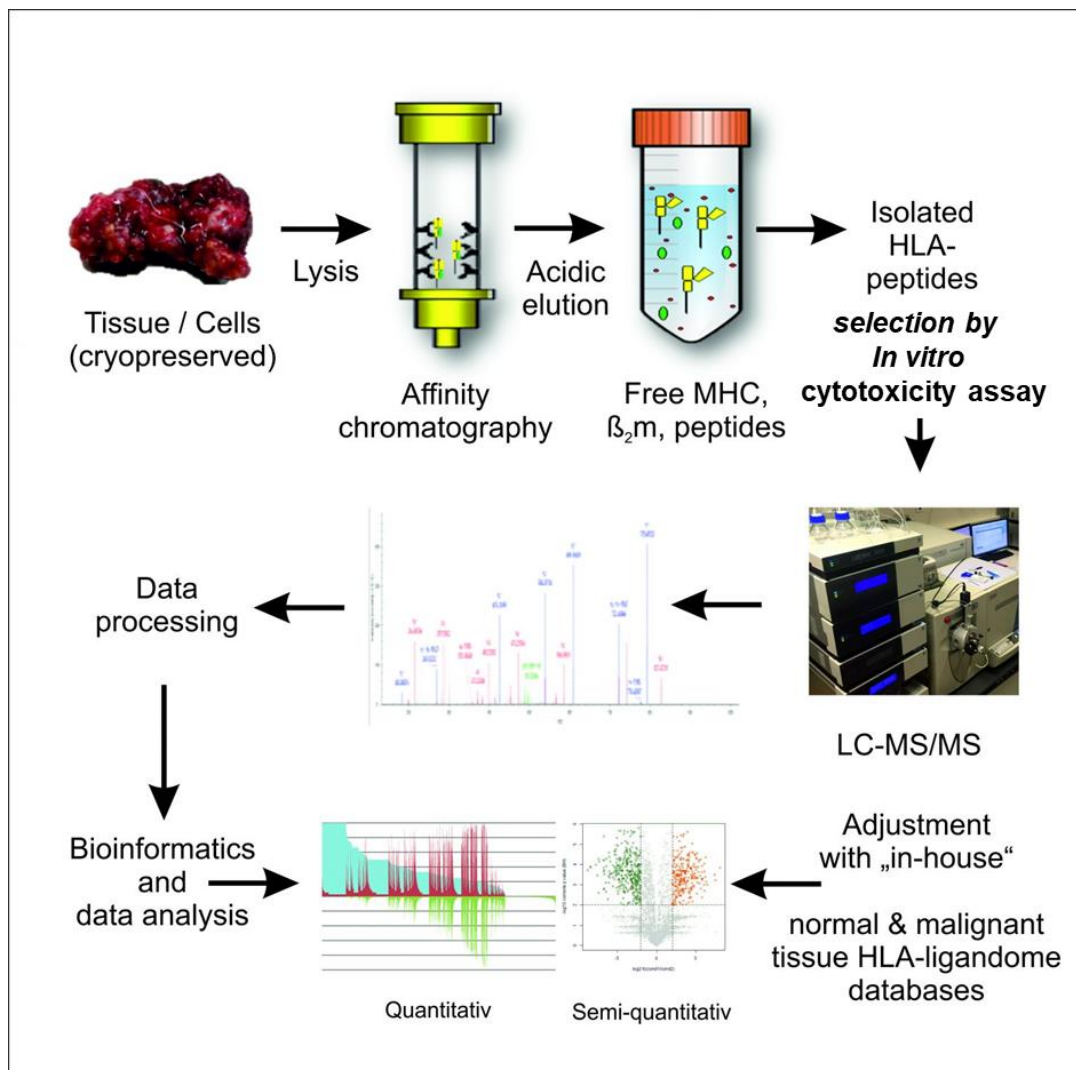


Figure 18 : Illustration du protocole d'identification d'antigènes tumoraux par approche protéomique. Adapté d'après (<https://dktk.dkfz.de/en/sites/tuebingen/core-facilities>).

L'approche protéomique par HPLC/MS est actuellement en expansion et s'avère plus précise que les algorithmes de prédiction (Thommen et al., 2012). Cependant elle est lourde et coûteuse à mettre en place et requiert beaucoup de cellules. En outre, de nombreux épitopes sont perdus et seule une partie est récupérée.

3.1.1.3. Vaccinologie inverse : Prédiction d'épitopes *in silico*

Une autre approche nommée vaccinologie inverse consiste à prédire et démontrer à partir d'une séquence génomique qu'une protéine candidate est immunogène et capable d'induire une réponse cytotoxique. Aujourd'hui, le mutanome (spectre mutationnel) d'une tumeur donnée peut être prédit par des techniques de séquençage à haut débit. Des algorithmes tels que NetMHC sont utilisés *in silico* pour prédire le degré d'affinité de néo-épitopes dérivés de séquences mutées au CMHI du patient en question (Nielsen and Andreatta, 2016). Des cellules présentatrices d'antigènes sont soit transfectées avec le gène codant la protéine candidate, soit chargées avec des peptides synthétisés à partir du motif de fixation aux molécules de classe I ou II du CMH, puis sont utilisées pour sensibiliser des lymphocytes T *in vitro*. Les clones T CD8+ spécifiques induits sont ensuite analysés pour leur capacité à lyser les cellules tumorales.

4 épitopes dits « universels » d'hTERT ont ainsi été sélectionnés selon leur prédiction d'affinité aux différents polymorphismes HLA-DR, en combinant les résultats de 3 algorithmes différents (Syfpeithi, NetMHCpan-2.1, et NetMHC2.2) (Godet et al., 2012) (cf. Partie 3.2.2.2.2).

Cependant, la prédiction d'affinité pour le CMHII reste limitée. Un autre point limitant de cette méthode est qu'à aucun moment on ne peut prédire quels sont les néo épitopes effectivement présentés par les cellules tumorales du patient.

3.1.2. Rationnel de la stratégie antigénique vaccinale

Le nombre d'antigènes tumoraux potentiel est quasiment illimité, et de nouveaux antigènes tumoraux sont continuellement découvert par les chercheurs, ce qui explique le nombre croissant d'essais précliniques et précliniques de validation d'antigènes. Néanmoins, le développement d'un vaccin au-delà des stades précoces est très coûteux. Des efforts sont actuellement réalisés pour faciliter la décision des investigateurs d'essais cliniques sur quelle stratégie vaccinale investir, afin de rationaliser les coûts et d'accélérer le développement de vaccins antitumoraux efficaces. Ainsi, un « pilote » de priorisation des antigènes tumoraux basé sur le processus de hiérarchie analytique a été publié par l'association de plusieurs comités d'experts. 75 antigènes tumoraux y ont été classés selon divers critères, ici classés par ordre d'importance (Figure 19) (Cheever et al., 2009) :

(1) l'intensité de sa fonction thérapeutique : Lorsqu'un vaccin contenant cet antigène a permis l'induction de réponses cliniques (allant de quelques patients isolés à un bénéfice clinique fortement significatif comparé au groupe contrôle). Ce critère est satisfait par 20 antigènes sur les 75 classés.

(2) son niveau d'immunogénicité : Elle doit avoir été démontrée par essai clinique chez l'Homme. Cela concerne 46 antigènes sur les 75.

(3) son niveau oncogénicité : Implication de l'antigène tumoral dans le processus de développement tumoral. Les antigènes issus de mutations conductrices du développement tumoral sont des cibles vaccinales privilégiées car étant indispensables à la tumeur, elles sont moins susceptibles de disparaître que les mutations accessoires, et leur ciblage inhibe de la croissance tumorale. Cependant, ces mutations sont parfois sources d'antigènes peu immunogènes par faible variation entre répertoire épitopique de la protéine mutée et de la protéine sous forme physiologique.

(4) la spécificité de l'expression tumorale de l'antigène : Plus un antigène a son expression restreinte aux cellules tumorales, moins la vaccination thérapeutique génèrera d'effets secondaires par toxicité vis-à-vis des cellules saines.

(5) son niveau d'expression et le % de cellules cancéreuses concernées : Plus un antigène est surexprimé dans un grand pourcentage de cellules cancéreuses, plus son ciblage est susceptible d'avoir un effet antitumoral important.

(6) son expression sur les cellules souches cancéreuses : Des antigènes tumoraux issus de cellules souches tumorales sont des cibles pertinentes considérant le rôle critique de ces cellules dans la croissance tumorale.

(7) le nombre de patients cancéreux exprimant cet antigène : Cela renseigne sur l'applicabilité clinique du ciblage de cet antigène.

(8) le nombre d'épitopes antigéniques

(9) la localisation cellulaire de l'expression

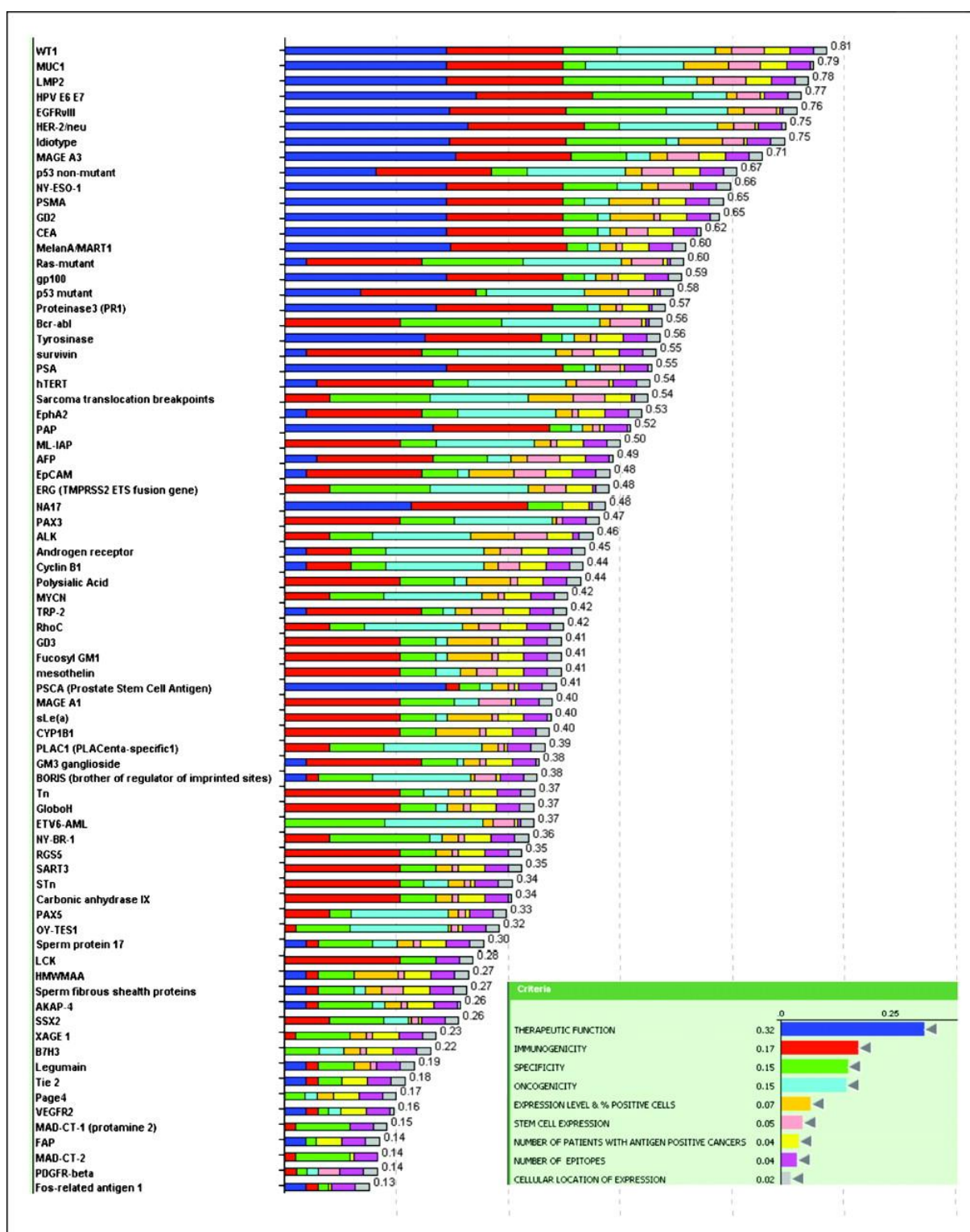


Figure 19 : Pilote de priorisation des antigènes tumoraux. D'après (Cheever et al., 2009).

Selon ce classement, le top 5 des antigènes les plus pertinents est le suivant :

(1) WT1 (Wilm's Tumor 1) : WT1 est une protéine physiologiquement exprimée sur les cellules épithéliales et vasculaires dont la surexpression dans de nombreux types de cancers (leucémies, cancer du sein, cancer de l'ovaire, glioblastome, sarcome des tissus mous) est associée à un mauvais pronostic clinique. Impliquée dans la prolifération cellulaire et le remodelage vasculaire, son oncogénicité a été démontrée dans le cancer du sein et la leucémie myéloïde aigue (Qi et al., 2015). Le galinpepimut-S est un vaccin peptidique anti-WT1 aux résultats cliniques prometteurs (cf Partie 3.2.2).

(2) MUC1 (Mucin 1, cell surface associated) : MUC1 est une glycoprotéine physiologiquement exprimée sur les cellules épithéliales et certaines cellules hématopoïétiques. Elle est souvent retrouvée surexprimée ou mutée (localisation intracellulaire aberrante ou variation de sa glycosylation) dans les cancers du colon, du sein, de l'ovaire, du poumon, et pancréatique (Gendler, 2001). MUC1 est un oncogène car elle favorise l'invasion tissulaire des cellules tumorales. En outre, la surexpression de MUC1 crée une barrière physique de glycosylation protégeant les cellules tumorales des CPA et des effecteurs immuns (Hollingsworth and Swanson, 2004). Pour autant, le Tecemotide® est un vaccin peptidique anti-MUC1 aux résultats cliniques intéressants (cf. Partie 3.2.2).

(3) LMP2 (latent membrane protein 2) : La protéine LMP2 est un xénoantigène issu du virus Epstein-Barr. Ce virus est présent à l'état de latence chez 95% de la population et généralement asymptomatique. LMP2 est exprimée dans certaines formes de latence malignes associées à différents cancers (lymphomes, carcinomes nasopharyngés,...) et contient plusieurs épitopes T immunogènes (Depil et al., 2007). A l'heure actuelle il n'existe pas de vaccins de type peptidique ciblant LMP2.

(4) E6-E7 : Les protéines E6 et E7 du papillomavirus sont des xénoantigènes associés à plusieurs types de cancers (cancer du col de l'utérus, cancer de la tête et du cou, cancer anogénital, ...). Elles ont un rôle oncogène par inhibition de leurs substrats p53 et PRb (respectivement) ce qui dérègle les signaux de prolifération et d'apoptose de leur cellule cible et promeut leur expansion ainsi que l'apparition de mutation (Tomaić, 2016). Elles sont également impliquées dans la mise en place de divers mécanismes d'échappement viraux au système immunitaire (Tummers and Van Der Burg, 2015). Plusieurs stratégies ciblant les protéines E6 et E7 montrent de bons résultats cliniques (cf.3.2.1.2).

(5) : EGFRvIII : Le variant du récepteur de classe III du facteur de croissance épithélial (EGFRvIII) est un antigène muté (activation constitutive) exprimé spécifiquement dans divers types cancéreux tels que les gliomes. Un vaccin peptidique anti-EGFRvIII (PEPvIII-KLH) a montré une bonne tolérance et une immunogénicité lors d'un essai clinique de phase II (Choi et al., 2009).

3.1.3. Sources novatrices d'épitopes

L'essentiel des épitopes identifiés et des stratégies vaccinales peptidiques développées concernent des épitopes immunodominants CD4 et/ou CD8 issus d'antigènes protéiques. En effet, ce sont ces épitopes qui de part leur très haute affinité pour le CMH sont préférentiellement exprimés et permettent la génération de réponses immunitaires endogènes efficaces. Cela en fait donc tout naturellement des cibles privilégiées pour une stratégie vaccinale. Cependant, il existe des sources d'épitopes alternatives également dignes d'intérêt qui sont exploitées en vaccination antitumorale.

3.1.3.1. Epitopes cryptiques

Du fait de leur sous présentation antigénique (faible affinité pour le CMH), les épitopes cryptiques sont peu voire pas du tout soumis aux mécanismes de tolérance du Soi (Figure 20) (Cibotti et al., 1992). Ils possèdent donc une forte capacité immunogène intrinsèque, bien qu'elle soit physiologiquement moindre. La modification de leur séquence pour augmenter leur présentation sur divers polymorphismes CMH en fait des candidats vaccins présentant à la fois les avantages des néoantigènes (immunogénicité et absence de tolérance endogène) et des antigènes associés aux tumeurs (expression partagée inter-individus et par de nombreux types tumoraux, notamment pour des peptides cryptiques optimisés issus d'antigènes universels comme hTERT, MAGE et HER2) (Menez-Jamet et al., 2016). C'est cette approche qui a été utilisée par la start-up Vaxon Biotech (cf. Partie.3.2.2.1).

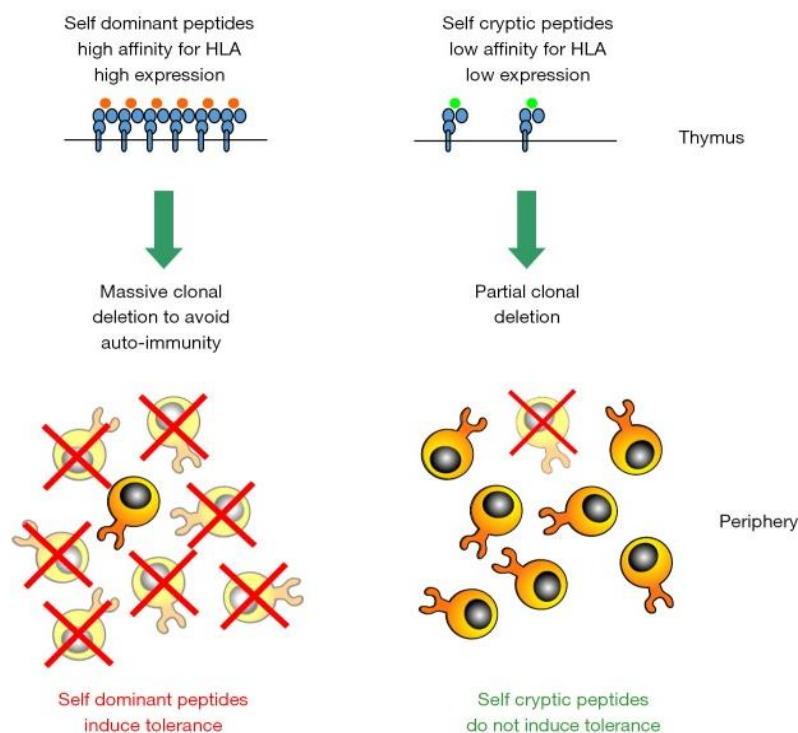


Figure 20 : Comparaison du répertoire T potentiel des peptides cryptiques et des peptides immunodominant. D'après (Menez-Jamet et al., 2016).

3.1.3.2. *Epitopes de séquences géniques non codantes*

L'essentiel des antigènes caractérisés tous types confondus correspondent à des séquences géniques codant pour des protéines. Or, on sait que moins de 2% du génome code pour des protéines. Il a de plus été montré que la grande majorité des mutations cancéreuses étaient retrouvées dans des séquences géniques a priori non codantes.

Les ARNm non codants sont impliqués dans la majorité des programmes post-transcriptionnels et épigénétiques des cellules. Ils émergent donc de plus en plus comme des régulateurs clefs du développement tumoral et de la résistance thérapeutique (Leucci, 2018). En outre, certains ARNm non codants ont une expression restreinte aux cellules cancéreuses ou à un certain stade de la maladie, suscitant de ce fait un intérêt croissant en tant biomarqueur ou cible thérapeutique directe, mais également en tant que nouvelle source d'épitopes tumoraux.

En effet, une analyse protéomique globale des peptides présentés sur le CMHI a montré qu'environ 10% provenaient de séquences génomiques non codantes ou d'une traduction hors cadre de lecture d'une séquence codante (Laumont et al., 2016). De la même façon que les épitopes codants cryptiques, ces épitopes « non codants » combinent à la fois les avantages des antigènes du Soi et des néoantigènes sans leurs inconvénients.

On peut notamment citer l'antigène MELOE-1, dont l'expression est strictement restreinte aux cellules de mélanome de part son mode de traduction particulier, et pour lequel il existe chez les patients HLA-A2 un répertoire T CD8+ et T CD4+ significatif capable de s'activer *in vitro*. A l'inverse, l'antigène MELOE-3 traduit préférentiellement et exprimé par les mélanocytes s'avère très peu immunogène (Charpentier et al., 2016).

3.2. Optimisation de la construction antigénique

3.2.1. Limites des « anciens » vaccins peptidiques

Le premier vaccin peptidique ayant montré l'induction d'une réponse cytotoxique *in vivo* était constitué de peptides dont la séquence correspondait exactement à un épitope CD8 du virus LCMV (1990). Suite à cette découverte, il a été montré que cette construction vaccinale associée à l'adjuvant incomplet de Freund (IFA) permettait de prévenir la croissance tumorale dans des modèles murins de tumeur greffée (Feltkamp et al., 1993) ou chimio-induite (Noguchi et al., 1994) ainsi que d'augmenter la survie dans un modèle murin par régression de métastases pulmonaires (Mandelboim et al., 1995). Cependant, les premiers essais vaccinaux chez l'Homme se sont révélés décevants (Machiels et al., 2002).

Cela peut s'expliquer par plusieurs points critiques :

Premièrement, ces peptides courts sont rapidement dégradés par les protéases *in vivo* (Brinckerhoff et al., 1999). De plus, ils ont la capacité de se charger de façon exogène sur des molécules du CMH I membranaires de n'importe quelle cellule, induisant de ce fait une tolérance par reconnaissance non associée aux signaux de costimulation (Toes et al., 1996). En outre, ce chargement exogène et ce risque de dégradation extracellulaire associés au renouvellement rapide des complexes CMH I-peptide ne sont pas adaptés à la cinétique de priming des T naïfs qui implique une présentation antigénique de plusieurs heures par les DC (Hugues et al., 2006).

Deuxièmement, les vaccins d'épitopes CD8 seuls ne permettent pas la génération de Th1 qui est indispensable à l'initiation et au maintien d'une réponse cytotoxique et mémoire robuste (cf. Partie 1). La réponse TCD4⁺ est en effet corrélée avec un bon pronostic clinique (Slingluff et al., 2013).

Troisièmement, bien que comme l'immunité endogène la vaccination soit responsable d'un phénomène d'épitope spreading (Disis et al., 1999), un vaccin contenant un seul épitope d'une seule restriction HLA induit une réponse immune trop faible, uniquement chez les patients porteurs du polymorphisme HLA approprié, agissant sur un nombre limité de cellules tumorales, et rapidement menacée par l'immunoédition de la tumeur. L'utilisation de stratégies polyépitopiques voire polyantigéniques se justifie donc, et constitue aujourd'hui une grande part des vaccins peptidiques développés.

Enfin, il a été démontré récemment que le dépôt antigénique formé par l'IFA au site d'injection favorisait la séquestration des T effecteurs et leur dysfonction (Hailemichael et al., 2013) (Salerno et al., 2013). Ne révélant pas de la construction antigénique en elle-même, ce dernier point sera détaillé ultérieurement (cf. Partie 3.3.1).

3.2.2.1. L'importance de la longueur du peptide

Il a ainsi été montré que l'ajout de quelques acides aminés en N-ter protégeait l'épitope des protéases intracellulaires et permettait l'induction d'une réponse CD8 chez la souris (Bijker et al., 2008; Wei and Sherman, 2007). En effet, l'utilisation de longs peptides contenant un épitope CD8 plutôt que l'épitope isolé minimise le risque de chargement exogène et restreint la présentation de l'épitope aux CPA professionnelles capables de cross-présenter des antigènes d'origine exogène sur leur CMHII, telles que les DC. En outre, les longs peptides fournissent une source endogène continue d'épitopes aux DC, ce qui prolonge le temps de présentation aux lymphocytes.

La tolérance et l'immunogénicité des longs peptides ainsi que la pertinence de leur utilisation a part la suite été démontrée chez l'Homme dans de nombreux essais précliniques et cliniques mentionnés tout au long de cette partie 3.2.

3.2.1.2. L'importance de multiples épitopes CD8/CD4

Dans un modèle préclinique de cancer du col de l'utérus du au papillomavirus, il a été montré qu'un vaccin par long peptide contenant des épitopes CD4 et CD8 permettait l'induction d'une réponse TCD8+ spécifique robuste et améliorait significativement le contrôle tumoral comparé à l'utilisation de l'épitope CD8 uniquement (Shirai et al., 1994). Cette efficacité supérieure était due à deux éléments distincts : D'une part la présence d'épitopes CD4 (génération de Th1 qui améliorent la puissance de la réponse CD8 ainsi que des réponses mémoires CD8 à long terme), et d'autre part la longueur du peptide (supériorité par rapport au peptide court, et ce indépendamment de l'aide des Th1) (Xu et al., 2012; Zwaveling et al., 2002).

Cette étude a également montré que contrairement au long peptide CD4/CD8, le mélange d'épitopes CD8 et CD4 engendrait une faible réponse CD8, démontrant l'importance d'un lien physique entre les épitopes CD4 et CD8 dans l'induction d'une réponse TCD8+ *in vivo* (Shirai et al., 1994). On peut en effet supposer que les épitopes CD4 sont préférentiellement capturés et présentés par les DC au détriment des épitopes CD8, du fait de leurs avantages propres. Ils sont en effet plus longs (donc moins facilement dégradables), la fixation sur le CMHII est moins contraignante que sur le CMHI (donc leur pseudo-dégradation extra ou intracellulaire à moins de conséquences que pour les épitopes CD8), et favorisés au niveau des voies d'apprêtement à l'inverse de la cross-présentation CD8 (cf Partie 1). En outre, les longs peptides CD4/CD8 permettent de garantir la présentation aux TCD4+ et aux TCD8+ par une même cellule présentatrice professionnelle.

Ces résultats ont été confirmés chez l'Homme :

Lors d'un essai clinique comparant l'immunogénicité d'un cocktail d'épitopes CD8 seul (groupe A), associé à un peptide CD4 de la toxine tétanique (groupe B), ou associé à un cocktail d'épitopes CD4 (groupe C), versus le cocktail d'épitopes CD4 seul (groupe D), il a été montré que l'ajout d'épitopes CD4 n'induisait pas d'augmentation de la réponse CD8 dans les groupes B et C. Malgré tout, l'observation d'une amélioration de survie globale et d'une réponse clinique chez les patients du groupe D souligne l'intérêt de l'induction d'une réponse CD4 dans l'immunité antitumorale (Slingluff et al., 2011, 2013).

En revanche, après une preuve de concept préclinique chez le lapin (Vambutas et al., 2005), un vaccin contre le papillomavirus contenant un cocktail de 9 longs peptides CD4/CD8 issus de la séquence native de l'antigène E6 et 4 longs peptides CD4/CD8 issus de celle de l'antigène E7 a montré une bonne tolérance et l'induction de TCD4+ et TCD8+ spécifiques toujours détectables 1 an post vaccination chez des patientes atteintes de cancer du col de l'utérus (Kenter et al., 2008; Welters et al., 2008). Cette même approche a démontré son immunogénicité et un bénéfice thérapeutique chez des patientes atteintes de néoplasie vulvaire : A trois mois post-vaccination, 60% des patientes présentaient une réponse clinique avec réduction des symptômes et 25% une régression complète des lésions cancéreuses. A 1 an, la réponse clinique était encore présente chez 70% des patientes et 47% présentaient une rémission complète (Kenter et al., 2009). Ceci souligne donc l'importance primordiale de la construction vaccinale sur la réponse immunitaire engendrée, et confirme l'intérêt d'utiliser des longs peptides contenant des épitopes CD8 et CD4.

Cette dernière stratégie vaccinale possède un autre avantage, car elle est constituée d'un mélange de longs peptides issus de séquences chevauchantes des antigènes E6 et E7 permettant de couvrir leur séquence native entière (Kenter et al., 2008; Welters et al., 2008). Cela abolit au moins partiellement la problématique de restriction HLA, puisqu'un même antigène peut être la source de génération de divers épitopes CD4 et CD8 de polymorphismes divers (cf. Partie 1).

De façon similaire, l'utilisation d'un mélange de long peptides chevauchants constitués des régions immunogéniques de NY-ESO-1 a été évalué chez des patients dont la tumeur exprimait cet antigène et a montré l'induction de réponses humorales et cellulaires (Wada et al., 2014).

A l'heure actuelle, deux essais cliniques évaluent ISA101®, un mélange de 13 longs peptides chevauchants d'E6 et E7. D'une part chez des patientes atteintes du cancer du col de l'utérus HPV16+ avancé ou récidivant, en combinaison avec une chimiothérapie, avec ou sans Bévacicumab (anticorps anti VEGF) (NCT02128126), et d'autre part chez des patientes atteintes de tumeurs solides incurables HPV16+ en combinaison avec du Nivolumab (anticorps anti PD1) (NCT02426892).

3.2.2. Les nouvelles constructions peptidiques

La prise en considération de tous les points précédemment discutés démontre l'intérêt d'utiliser des longs peptides, contenant de multiples épitopes CD4 et CD8 physiquement liés. De nombreuses équipes de recherche se focalisent également sur l'amélioration « artificielle » de la construction antigénique afin de renforcer l'immunogénicité vaccinale, créant de nouvelles constructions peptidiques hybrides :

Si théoriquement l'utilisation d'un cocktail de séquences peptidiques chevauchantes couvrant la protéine native semble idéale pour induire une immunisation efficace chez le plus grand nombre de patients, il ne faut pas oublier que les multiples épitopes contenus dans le vaccin vont être soumis à une compétition de fixation sur le CMH qui peut limiter la présentation antigénique des plus immunogènes.

Une façon de résoudre ces problématiques est de remplacer la séquence native de l'antigène par une longue séquence artificielle comprenant un ou plusieurs épitopes CD4 et CD8 préalablement sélectionnés pour leur immunogénicité. Ainsi, un vaccin par un long peptide hybride comprenant un épitope CD4 et un épitope CD8 de l'antigène MAGE-A4 s'est avéré bien toléré et immunogène chez l'Homme (Takahashi et al., 2012).

En outre, ces longs peptides hybrides offrent des possibilités d'optimisation quasiment illimitées, notamment en améliorant artificiellement le taux de fixation des épitopes sur le CMH, le nombre de polymorphisme HLA couverts, ou encore la génération d'épitopes au niveau intracellulaire. Un condensé des différentes approches développées est présenté ci-après.

3.2.2.1. Amélioration de l'affinité sur le CMHI par modification d'acides aminés

3.2.2.1.1. P1Y et le polymorphisme HLA-A*0201

Le placement d'une Tyrosine en première position (P1Y) a été identifiée comme une méthode générale d'amélioration de l'affinité d'épitopes HLA-A*0201 (Tourdot et al., 2000), utilisée dans plusieurs stratégies vaccinales.

Le vaccin galinpepimut-S est constitué de trois longs peptides d'épitopes CD4 natifs de WT1 compatibles avec divers polymorphismes HLA-DRB1, associés à un peptide court représentant un épitope CD8 natif modifié artificiellement (P1Y). Cet épitope CD8 fait également partie de la séquence naturelle d'un des trois longs peptides CD4 (peptides chevauchants), sur lequel il a également été modifié de la même façon (Figure 21) (Krug et al., 2010; May et al., 2007).

Cette modification permet une augmentation de l'affinité de liaison de l'épitope au HLA-A*0201, sans toutefois empêcher la reconnaissance de la séquence native par les T spécifiques générés (Pinilla-Ibarz et al., 2006).

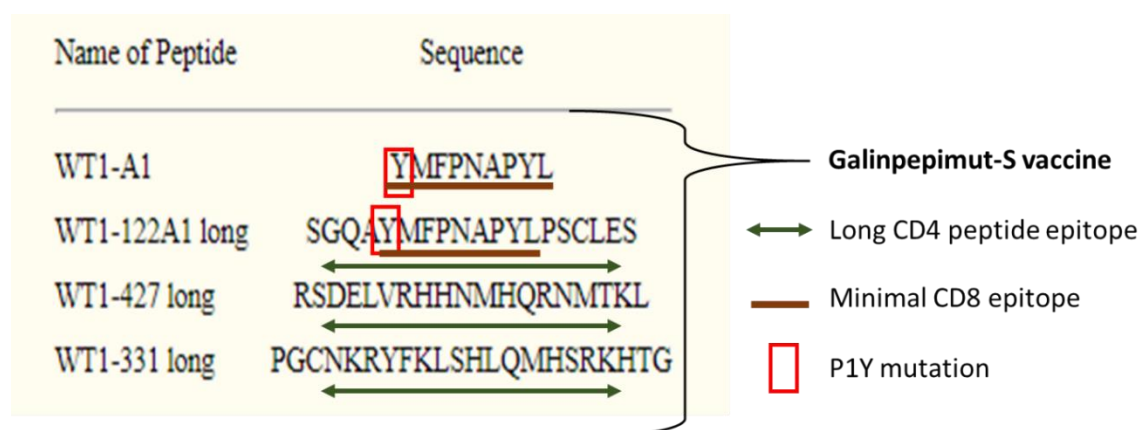


Figure 21 : Construction antigénique du Galinpepimut-S.

Adaptée d'après (Krug et al., 2010; May et al., 2007)

Lors d'un essai de phase II chez des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë, le traitement par galinpepimut-S a démontré une bonne tolérance, l'induction d'une immunité spécifique, et était associé à une survie de plus de 5 ans comparé au contrôle (Maslak et al., 2018). Un autre essai de phase II chez des patients atteints de mésothéliome pleural malin a également montré la sécurité et l'immunogénicité du galinpepimut-S, avec une période sans progression tumorale et une survie globale qui tendaient à être améliorées dans le groupe expérimental (Zauderer et al., 2017). Des essais cliniques de phase III sont attendus.

Comme évoqué précédemment (cf. Partie 3.1.3), les épitopes cryptiques rendus très affins au CMH par modification de leur séquence présentent à la fois les avantages des antigènes du Soi et des néoantigènes sans leurs inconvénients respectifs.

Vx001 est un vaccin composé de deux peptides de 9 acides aminés : un épitope CD8 cryptique HLA-A*0201 natif de hTERT et son variant P1Y optimisé. Testé dans un essai clinique de Phase I/II sur 33 patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) subséquentement étendu à des patients porteurs de divers types de cancers. Il a été observé une bonne tolérance vaccinale ainsi que l'induction d'une forte immunité spécifique chez 44% des patients, qui était significativement corrélée à un meilleur pronostic clinique.

Lors d'un essai de phase IIb chez des patients HLA-A2 atteints de NSCLC dont la tumeur était hTERT+ et dont la maladie était stabilisée après une première chimiothérapie (NCT01935154), Vx001 a permis une augmentation significative de leur survie globale (20,7 mois versus 7,9 mois) et de la durée d'efficacité avant résistance au traitement (R,6 mois versus 3,1 mois) comparé à un placebo (Georgoulas et al., 2013; Kotsakis et al., 2014; Vetsika et al., 2012).

Cette même équipe de recherche a aussi développé un autre candidat vaccin, Vx-006, composé de 3 variants peptidiques P1Y HLA-A*0201 dérivés de 3 antigènes universels que sont MAGE, TERT et HER2. Un essai de phase I chez des patients atteints de tumeurs solides a montré une bonne tolérance du vaccin et l'induction d'une réponse multispécifique contre les 3 antigènes chez 30% des patients (NCT02289196).

*3.2.2.1.2. P1A et/ou P9L et le polymorphisme HLA*B0702*

L'équipe ayant développé les vaccins Vx001 et Vx006 a également démontré très récemment que le placement d'une Alanine en position 1 (P1A) ou d'une Leucine en position 9 (P9L) étaient généralement associés à une affinité supérieure pour le polymorphisme HLA-B*0702 (Gallou et al., 2016), ouvrant la porte au développement d'une construction vaccinale pour ce polymorphisme. Il est en effet retrouvé chez 25% des humains.

3.2.2.2. Abolition de la restriction HLA par usage d'épitopes CD4 universels

L'utilisation de longs peptides artificiels permet d'optimiser l'immunogénicité vaccinale. Cependant, à moins de multiplier les designs dans un même vaccin, l'applicabilité de ce type de construction est intrinsèquement restreinte aux polymorphismes HLA des épitopes CD4 et CD8 choisis. Afin de résoudre partiellement le problème, certains vaccins associent plusieurs épitopes CD4 et/ou CD8 différents, provenant ou non du même antigène. De même, les épitopes CD8 sélectionnés sont généralement de polymorphisme HLA-A*0201 (50% de la population caucasienne). Enfin, une autre façon d'élargir la population cible vaccinale est d'utiliser des épitopes CD4 issus d'antigènes universels.

3.2.2.2.1. Epitopes universels non tumoraux

PADRE (pan-DR épitope) est capable de se lier avec une affinité de l'ordre du nanomolaire sur de nombreux polymorphismes HLA-DR. Il a été obtenu par ajout de séquences d'ancrage aux différents polymorphismes DR sur une séquence d'épitope CD4 dérivé de la protéine KLH, fortement immunogène (KLH, Keyhole Limpet Protein) (Alexander et al., 1994).

Lors d'un essai clinique, un mélange d'épitopes de WT1 Pr3 et MUC1 (chacun administré à un site différent) soit avec PADRE (groupe 1) soit avec un épitope CD4 de MUC1 (groupe 2) a montré une augmentation de T CD4+ PADRE-spécifiques au phénotype régulateur chez le groupe 1. De plus, aucune de ces stratégies vaccinales n'a permis l'induction de TCD8+ naïfs ou préexistants ; Il a été observé à l'inverse une déplétion en TCD8+ (Kuball et al., 2011). Les auteurs pointent du doigt un système adjuvant inadapté (montanide et CpG). Cela peut également être dû à l'absence de lien physique entre les épitopes CD8 et PADRE (cf.3.2.1.2), et/ou à l'inefficacité de l'aide au recrutement tumoral des LTC par les Th1 non spécifiques (Wong et al., 2008). Il serait intéressant de tester PADRE dans le cadre d'un vaccin par long peptide hybride.

Une autre approche, utilisée dans le vaccin SurVaxM®, consiste à conjuguer un long peptide issu de la survivine (contenant des épitopes CD8 de polymorphismes divers) à la protéine KLH entière, qui potentialise la réponse LTC en fournissant une réponse Th1 anti-KLH (Fenstermaker et al., 2016). Lors d'un essai clinique de phase I, ce vaccin a montré une bonne tolérance et l'induction d'une réponse cellulaire et humorale chez 6 sur 8 patients atteints de gliome. 3 patients traités ont eu leur cancer stabilisé pendant plus de 6 mois. SurVaxM est actuellement en phase II (NCT02455557) chez des patients atteints de gliome nouvellement diagnostiqués, en association avec le Temozolomide (antinéoplasique).

La toxine tétanique contient des épitopes CD4 naturellement panDR (Panina-Bordignon et al., 1989). En outre, du fait des programmes vaccinaux mondiaux, nous sommes théoriquement immunisés contre la toxine tétanique. La vaccination par un épitope CD4 issu de cet antigène permet donc la génération d'une forte réponse secondaire CD4 mémoire stimulant d'avantage le système immunitaire. Récemment, un polyglycérol hyperbranché porteur de multiples constructions antigéniques constituées d'un épitope B de MCU1 associé à un épitope CD4 de la toxine tétanique a été développé (Glaffig et al., 2014) et a permis l'obtention d'une forte réponse humorale MUC1-spécifique chez la souris.

3.2.2.2.2. Epitopes universels tumoraux

Par rapport aux épitopes universels non tumoraux, l'utilisation d'un épitope universel tumoral exprimé chez le patient permet en théorie de garantir le recrutement tumoral des LTC par les Th1 générés.

hTERT, la sous unité transcriptase inverse de la télomérase, est surexprimée dans de nombreux cancers et associée à un mauvais pronostic (Li et al., 2016). Elle joue un rôle important dans l'immortalité des cellules cancéreuses et la transition épithélio-mésenchymateuse (Zanetti, 2017). Une approche par vaccinologie inverse a permis d'identifier 4 épitopes CD4 universels d'hTERT (UCP, Universal Cancer Peptide) affins à de multiples polymorphismes HLA-DR qui sont surexprimés dans de nombreux types cancéreux (incluant les cellules souches) et pour lesquels il existe notamment un répertoire Th1 endogène significatif (38% des T CD4+ totaux) associé à un meilleur pronostic à la chimiothérapie chez des patients atteints de NSCLC (Godet et al., 2012). L'administration de ces épitopes CD4 avec des peptides CD8 d'hTERT chez des souris a permis d'augmenter le pourcentage de TCD8+ spécifiques (sauf UCP1) et de TCD8+ activés (pour les 4 UCPs) comparé aux peptides CD8 seuls (Dosset et al., 2012).

Une autre équipe a montré un puissant phénomène d'épitope spreading suivant la vaccination par un peptide CD4 de hTERT (GV1001) chez les survivants à longs terme (Inderberg-Suso et al., 2012). Cet épitope spreading de clones CD4 n'était pas retrouvé chez les mauvais répondeurs. Son analyse a permis de mettre en évidence (1) une réponse CD8 cytotoxique envers un épitope CD8 de restriction HLA-B7 enchassé dans GV1001 et non décrit auparavant, et (2) la mise au point d'un vaccin hTERT (UV1) contenant GV1001 et deux autres épitopes CD4 caractérisés. Sa composition couvre beaucoup de polymorphismes HLA et en fait un vaccin CD4 universel. Il est actuellement testé en phase I/II avec du GM-CSF dans le cancer de la prostate métastatique (population nouvellement diagnostiquée hormono-naïve) (NCT01784913), dans le NSCLC après une cure de chimio ou radiothérapie (NCT01789099), et dans le mélanome métastatique en combinaison avec l'ipilimumab (NCT02275416).

GX301 est un autre vaccin ciblant la télomérase. Il est constitué d'un mélange de 4 longs peptides immunogènes contenant des épitopes CD4 et CD8 d'hTERT (Fenoglio et al., 2015). Il a montré une bonne tolérance et une immunogénicité chez 100% des patients atteints du cancer de la prostate ou du poumon dans un essai de phase I/II, et était associé à une survie globale et en rémission prolongée chez les patients ayant une réponse T polyclonale. De l'imiquimod était appliqué localement aux sites d'injections (Fenoglio et al., 2013). Il est actuellement évalué en phase II chez les patients atteints d'un cancer de la prostate résistant à la castration, post chimiothérapie de première ligne (NCT0229370).

3.2.2.3. Amélioration de la présentation CMHII par li-key

Une approche développée pour améliorer le taux de présentation CMHII d'un épitope CD4 vaccinal consiste à le conjuguer à li-key, un peptide issu de la chaîne invariante Ii (ou CD74) qui est impliquée dans la fixation sur le CMHII (cf. partie 1.2). En effet, il a récemment été observé que des fragments de Ii (li-key) mimaient les fonctions d'HLA-DM, à savoir le détachement de CLIP, la génération d'une conformation CMHII réceptive à la fixation d'épitopes, et la sélection des épitopes les plus affins par compétition de liaison (cf. partie 1.2) (Chou et al., 2008). Or, l'expression d'HLA-DM est parfois supprimée dans les cellules cancéreuses, ce qui empêche la présentation antigénique d'épitopes à la surface cellulaire (Chamuleau et al., 2004). Par conséquent, la conjugaison d'épitopes vaccinaux avec un fragment li-key peut favoriser leur présentation en palliant l'éventuelle déficience en HLA-DM endogène. De plus, il a été montré que cette construction permettait la fixation des épitopes vaccinaux directement au niveau extracellulaire sur les complexes CMH-peptide préalablement exprimés par la cellule cible (Adams and Humphreys, 1995).

Comparée à l'ajout de résidus d'ancrages dans la séquence épitopique, la conjugaison à li-key permet d'augmenter le niveau de présentation antigénique sans risque d'altérer la spécificité même de l'épitope. Cette approche vaccinale s'est avérée bien tolérée et immunogène dans des essais cliniques de phase I chez des patients atteints de cancers du sein et de la prostate, où un long peptide comprenant un épitope CD4 d'HER2 était conjugué à li-key. Une diminution du nombre de Treg a également été observée (Gates et al., 2010; Perez et al., 2010, 2010). Cependant, un essai de phase II sur des patientes atteintes de cancers du sein n'a pas montré de bénéfice clinique pour cette construction vaccinale (Mittendorf et al., 2016). Il a néanmoins été observé une tendance non significative de survie sans rechutes plus longue chez les patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif.

Il serait particulièrement intéressant, pour favoriser la réponse LTC antitumorale, de développer une technique similaire pour la fixation sur le CMHI. Au vu de son rôle dans la formation du complexe de chargement sur le CMHI, on pourrait imaginer utiliser la tapasine (cf.1.2.2.1).

3.2.2.4. Amélioration de la génération d'épitopes par linker optimisé

Si théoriquement l'utilisation d'une longue séquence antigénique naturelle contenant à la fois des épitopes CD4 et CD8 semble l'idéal pour obtenir une immunisation plus efficace, il ne faut pas oublier que les voies d'apprêtement et de présentation mettent en jeu des protéases qui vont cliver ce peptide en différents fragments, risquant ainsi soit de détruire un épitope, soit au contraire de l'allonger de quelques acides aminés, rendant son chargement impossible sur le CMH1.

Une façon de résoudre cette problématique est d'entourer ces épitopes immunogènes par des séquences de clivage préférentielles de protéases intracellulaires. La conception de ces « linker » peut notamment être améliorée après caractérisation précise de la ou des voie(s) d'apprêtement empruntée(s) par le vaccin, et donc de la ou les principales protéases mises en jeu.

Ainsi, dans une stratégie peptidique innovante, il a été observé que la formulation vaccinale induisait l'adressage cellulaire du vaccin spécifiquement au niveau du RE et du Golgi. Dans ces organites, les auteurs ont observé que la génération des épitopes vaccinaux dépendait essentiellement du clivage par la protéase furine. Le long peptide hybride utilisé a donc été optimisé par l'ajout séquences linker sensibles à la furine entre les séquences épitopiques afin de favoriser la génération des épitopes au détriment de leur dégradation (Lu et al., 2004).

De même, un long peptide de 40 acides aminés comprenant 2 épitopes CD4 et 3 épitopes CD8 issus de la Survivin et séparés par des « linker glycine » a permis une présentation antigénique plus longue par les DC ainsi que l'induction de réponses TCD4+ et TCD8+ plus importante que le simple mélange de ces épitopes *in vitro*. Ce vaccin a ensuite été administré en intradermique (toutes les 2 semaines durant 2 mois) chez une patiente atteinte d'un cancer du sein résistant aux traitements conventionnels dont la tumeur exprimait la Survivin. Une régression tumorale complète a été observée 1 mois après la dernière injection ainsi qu'une forte réponse à la fois humorale et cellulaire contre la Survivin (Ohtake et al., 2014).

3.3 Optimisation de la formulation vaccinale

3.3.1. L'importance de la formulation adjuvante

3.3.1.1. Les différents types d'adjuvants

L'adjuvant ou système adjuvant est une substance ou préparation qui a pour but d'améliorer l'efficacité de l'immunisation contre l'antigène auquel il est associé. La présence d'un adjuvant permet de réduire les doses d'antigènes et le nombre de rappels requis pour obtenir une immunité. Ils ont un intérêt en termes d'efficacité, de coût, mais également de sécurité, puisqu'ils permettent d'obtenir un vaccin fortement immunogène avec une tolérance optimale. Plus important encore, ils peuvent rendre possible une immunisation efficace chez les populations immunodéprimées pour lesquelles les vaccins vivants sont contre-indiqués (risque de réactivation) et les vaccins non vivants sans adjuvants inefficaces (défaut d'activation du système immunitaire). Les adjuvants actuellement commercialisés sont peu nombreux, concernent les vaccins non vivants (inactivés, conjugués, purifiés ou sous-unitaire).

Il existe diverses classes d'adjuvants aux mécanisme d'action variés : Les immunomodulateurs agissent sur les signaux 2 et 3 d'activation lymphocytaire en modulant le type de réponse adaptative et son intensité. Ils s'agit principalement des cytokines et des ligands TLR. Les systèmes de délivrance et de vectorisation, qui ont essentiellement pour but d'améliorer le taux de présentation antigénique (signal 1 d'activation lymphocytaire) par protection et adressage du vaccin, peuvent également être considérés comme des adjuvants. Ils peuvent en outre avoir un rôle supplémentaire d'immunomodulateur en jouant sur la dynamique cellulaire, la cinétique de la réponse immune, son intensité ou encore le type de réponse adaptative engendré.

Autrefois dérivés de l'empirisme, un intérêt croissant est dorénavant porté à la caractérisation précise du ou des mécanismes d'actions des adjuvants, qui se révèlent avoir une forte influence sur la qualité de la réponse immune induite. Dans le cas d'un vaccin tumoral, on va chercher à obtenir une réponse adaptative de type cellulaire, avec génération de Th1 et de LTC effecteurs et mémoire. Cela requiert donc l'utilisation d'adjuvants qui vont favoriser l'adressage du vaccin aux DC, favoriser la cross-présentation d'épitopes CD8, et orienté l'immunité spécifique vers une réponse cytotoxique (Khong and Overwijk, 2016). Les stratégies adjuvantes novatrices présentées en parties 3.3.2 et 3.3.3 sont parfois communes aux autres types de vaccins antitumoraux non peptidiques.

3.3.1.2. Limites des « anciens » adjuvants

Les sels d'aluminium, très utilisés dans les vaccins anti-infectieux commercialisés, favorisent une réponse humorale (Marrack et al., 2009). Ils ne sont donc pas pertinents pour la conception d'un vaccin antitumoral.

L'adjuvant incomplet de Freund (émulsion huileuse) est l'adjuvant majoritairement utilisé des premières stratégies de vaccination antitumorale jusqu'à aujourd'hui. Son potentiel immunogène a été mis en évidence il y a plus de 50 ans, mais il ne fait pas partie des adjuvants utilisés dans les vaccins prophylactiques du fait d'un rapport bénéfice risque insuffisant.

Comme mentionné précédemment, le dépôt antigénique formé par l'IFA au site d'injection favorise la séquestration des T effecteurs et leur dysfonction (Figure 22) (Hailemichael et al., 2013; Salerno et al., 2013). Il est toutefois important de noter que cet effet délétère était significativement présent lors d'une vaccination par un cocktail d'épitopes CD8, mais moindre lors d'une vaccination par longs peptides. Par ailleurs, la présence d'IFA ne semble pas entâcher l'efficacité clinique des longs peptides de séquence native d'E6 et d'E7 présentée précédemment (Kenter et al., 2009). Ceci souligne une fois de plus l'importance de la construction vaccinale et particulièrement la supériorité de la vaccination par longs peptides.

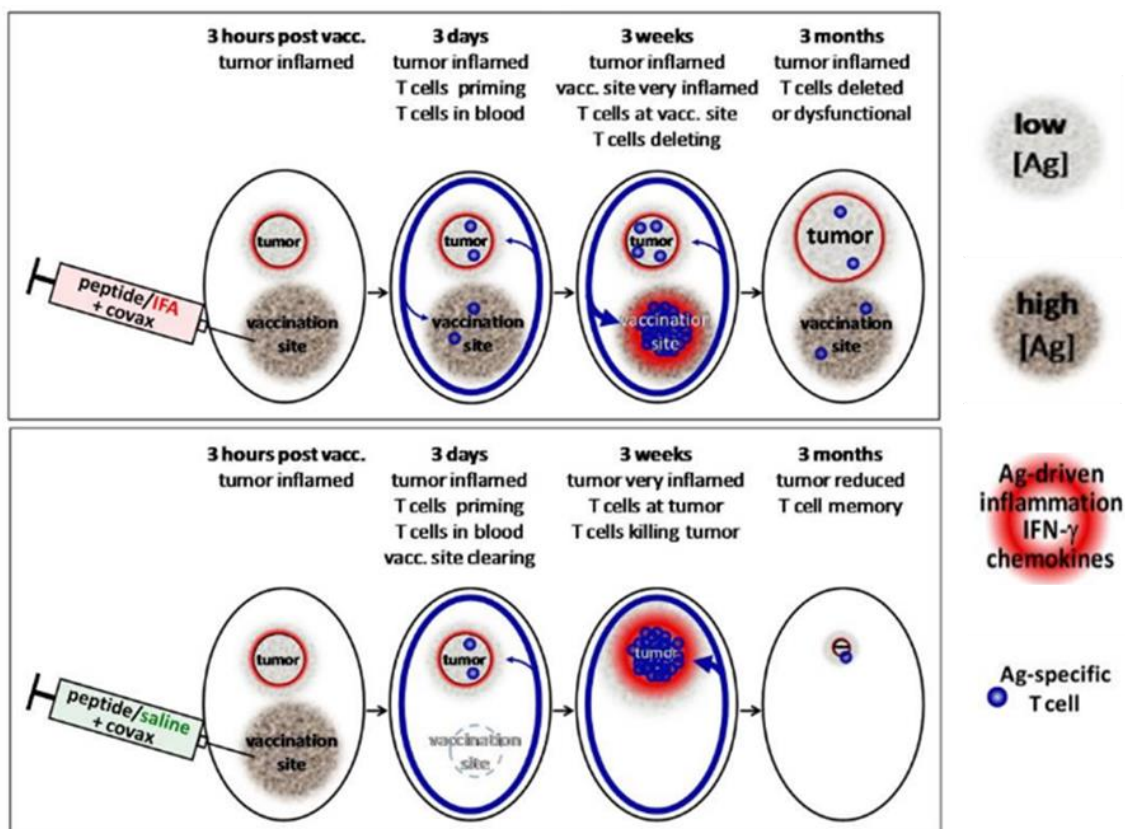


Figure 22 : Différences de dynamiques cellulaires T observées lors d'une émulsion vaccinale dans de l'IFA versus une émulsion saline : L'IFA séquestre les T effecteurs au site de vaccination ce qui inhibe leur activité antitumorale. D'après (Hailemichael and Overwijk, 2013)

D'autres émulsions eau dans l'huile moins visqueuses et plus stables que l'IFA se sont développées tel que le montanide ISA-51 ou ISA-720 induisant des réponses humorales et cellulaires (réponse biaisée Th1 pour le montanide ISA-72 d'après le fabriquant) (Aucouturier et al., 2002). Leur tolérance est avérée de part leur utilisation dans environ 300 essais cliniques de phase I à III toute pathologie et formulation vaccinale confondues.

3.3.2. Polarisation vers une réponse cellulaire cytotoxique

3.3.2.1. Les ligands de TLR

Une classe importante d'adjuvants beaucoup plébiscité dans les stratégies vaccinales anticancéreuses sont les agonistes de TLR (catégorie de PRR). Les ligands TLR induisent la sécrétion de cytokines proinflammatoires et l'expression de molécules de costimulation sur les DC, favorisant leur migration aux ganglions lymphatiques. En outre, les signaux d'activation TLR favorisent la cross présentation par sollicitation d'un réservoir supplémentaire de CMHI au niveau du compartiment endosomal de recyclage (Nair-Gupta et al., 2014). Le choix des TLR est important pour la polarisation de la réponse immune vers le type cellulaire (Mandraju et al., 2014) (Figure 23).

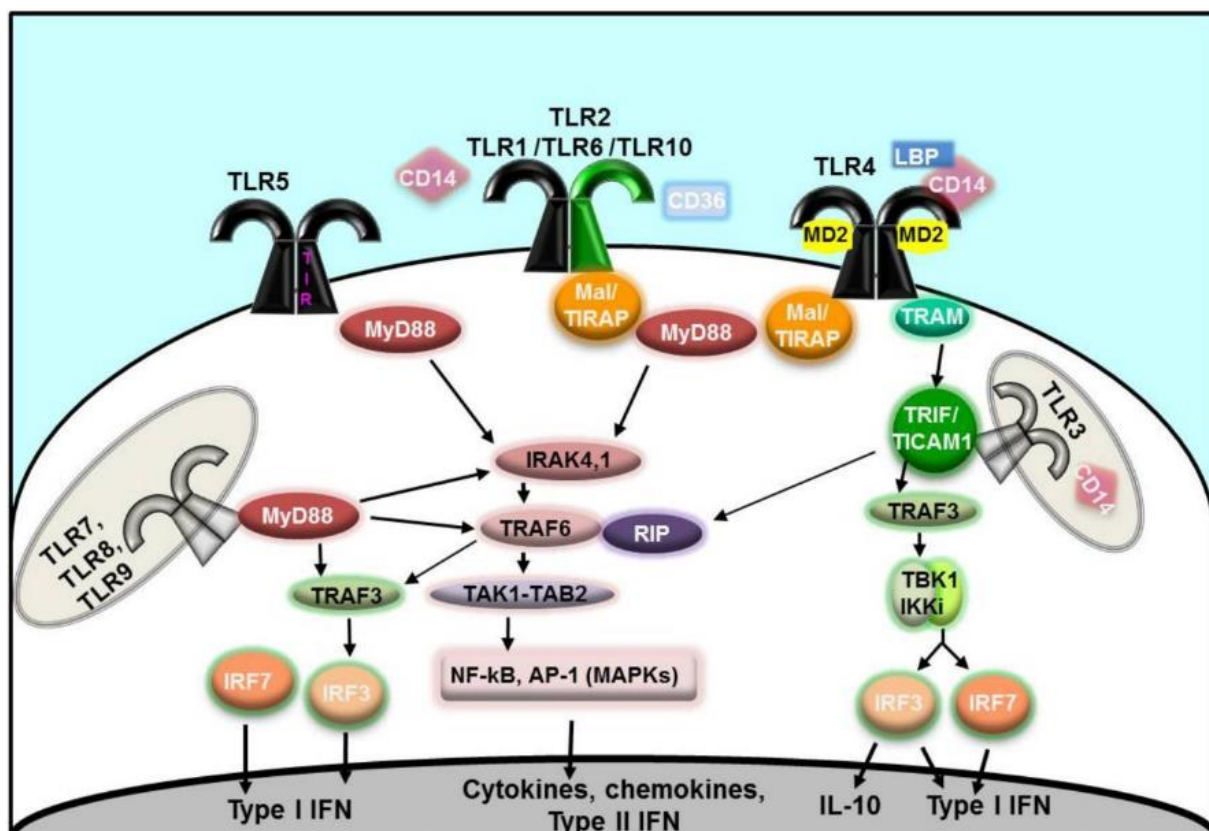


Figure 23 : Les TLR et leurs voies de signalisation. D'après (Toussi and Massari, 2014)

Le TLR4 reconnaît le lipopolysaccharide bactérien et est exprimé sur la membrane des cDC, macrophages et certaines cellules épithéliales. Un ligand synthétique de TLR4 nommé MPLA engendre une forte polarisation de la réponse immune vers le type cellulaire (Netea et al., 2005), tout comme l'association MPLA et aluminium (AS04) développé par GSK (Garçon et al., 2007). L'analogue 3-O-desacyl-4'-MPL est l'adjuvant contenu dans le vaccin CERVARIX® contre l'infection par le papillomavirus (Harper, 2009).

Le TLR2 reconnaît des lipopeptides bactériens et est exprimé sur la membrane de nombreux types cellulaires immuns tels que les DC et les lymphocytes. Un ligand synthétique de TLR2 nommé Pam3Cys a été créé et a démontré sa pertinence en tant qu'adjuvant antitumoral dans un modèle murin d'un vaccin par longs peptides. Tout particulièrement, les conjugués Pam3Cys/longs peptides ont permis d'obtenir des réponses T CD4⁺ et CD8⁺ robustes alors que le simple mélange antigène-adjuvant n'en était pas capable (Zom et al., 2014).

Le TLR9 reconnaît les îlots CpG méthylés bactériens et est exprimé au niveau endosomal chez les DC et les macrophages. Des ligands synthétiques de TLR9 nommés CpG A, B et C ont été testés dans de nombreux types cancéreux et ont montré une bonne tolérance et capacité adjuvante en essais cliniques. On peut notamment citer un essai clinique récent où un vaccin long peptide issu de NY-ESO-1 a été injecté en sous-cutané avec du CpG B et a permis l'induction de fortes réponses TCD4⁺ et TCD8⁺ sur 18/18 patients atteints de mélanome (Baumgaertner et al., 2016).

Le TLR3 reconnaît l'ARN double brin et est exprimé au niveau endosomal chez les cDC, macrophages et cellules épithéliales. Un ligand synthétique de TLR3 nommé polyI:CLC a démontré un effet adjuvant chez des patientes atteintes de cancer de l'ovaire par une administration sous-cutanée concomitante avec un vaccin par longs peptides chevauchants (Sabbatini et al., 2012), ainsi que chez des patients atteints de gliome par injection intramusculaire associée à un mélange de peptides courts vaccinaux administrés en sous-cutané (Okada et al., 2015).

Les TLR7 et TLR8 reconnaissent des ARN simple brin et sont exprimés au niveau endosomal par les pDC et les cDC respectivement. L'imiquimod est un ligand des TLR7/8 qui est utilisé en traitement topique antitumoral du carcinome basal et des verrues génitales sous forme d'une crème (Love et al., 2009). Il a été montré chez des patients atteints de mélanome que l'application préalable d'imiquimod au site d'injection d'un vaccin protéique recombinant de NY-ESO-1 était bien toléré et permettait l'induction de réponses humorales et cellulaires une fraction significative de patients. Ces réponses immunes étaient associées au recrutement au site d'injection de diverses populations immunes (lymphocytes, monocytes, macrophages, DC, NK) (Adams et al., 2008). Sur un modèle d'explant cutané humain, il a été observé que l'application topique d'imiquimod avait un effet adjuvant supérieur à son injection intradermique. L'activation, la migration et la capacité de cross présentation des DC résidentes était renforcée par application d'imiquimod (Fehres et al., 2014). Cependant, la capacité adjuvante de l'imiquimod n'a pas encore été confirmée cliniquement. Récemment, il a été montré chez des patientes atteintes de néoplasies vulvaires et vaginales de stade avancé que l'application préalable d'imiquimod au site d'injection d'un vaccin par longs peptides issus d'E6 et E7 ne permettait pas d'améliorer l'efficacité vaccinale (van Poelgeest et al., 2016).

3.3.2.2. Les cytokines

Des cytokines immunostimulantes sous forme de protéines recombinantes telles que l'IL-2 l'IFN α ou encore le GM-CSF peuvent également être utilisées.

L'IL-2 active de manière globale la réponse T. *In vivo*, ce sont les T CD4+ activés qui en sont la source majoritaire. L'IL-2 a été approuvée en traitement antitumoral direct pour le carcinome rénal et le mélanome métastatiques dès la fin du 20^{ème} siècle. Son efficacité en tant qu'adjuvant vaccinal antitumoral a été démontrée chez des patients atteints de mélanome où l'administration d'IL-2 en association avec un vaccin peptidique gp100/IFA a permis un taux de réponse clinique et une durée de survie sans progression tumorale supérieures dans un essai de phase III (Schwartzentruber et al., 2011).

L'IFN α est fortement impliqué dans l'immunité endogène antivirale par son action sur divers types cellulaires. Elle augmente notamment la présentation antigénique par les DC et favorise l'induction d'une réponse TCD8+ effectrice. L'IFN α sous forme simple ou pegylée est utilisé dans le carcinome rénal métastatique, l'hépatite C chronique, et après résection des mélanomes primaires. Son efficacité adjuvante a été démontrée chez la souris (Sikora et al., 2009), mais pas chez l'Homme (Kirkwood et al., 2009; Pilla et al., 2006) en tant qu'adjuvant de vaccins peptidiques contre le mélanome.

Le GM-CSF, utilisé dès les premières tentatives de vaccins antitumoraux, qui permet d'induire le recrutement et la maturation des DC (Dranoff et al., 1993). Cependant, une revue systématique de la littérature récente montre un faible bénéfice thérapeutique du GM-CSF dans les vaccins contre le mélanome de stade avancé (Hoeller et al., 2016). En outre, une dose trop importante de GM-CSF peut favoriser l'expansion de cellules immunosuppressives telles que les Treg et les MDSC (Parmiani et al., 2007). Malgré ces limites, le GM-CSF est encore couramment utilisé et concerne 40% des essais cliniques de phase I/II actuels (cf Partie 3.4).

Les limites à l'usage des cytokines en adjuvant sont les effets secondaires systémiques (liés à leur action pléiotropique) mais également leur faible demi-vie requérant des injections très régulières et à fortes doses. Ces problématiques peuvent être minimisées par utilisation de complexes immuns anticorps-cytokines ou de formes mutantes qui influent sur la durée de vie, l'adressage cellulaire et/ou l'action des cytokines. Ainsi, il a été observé que selon l'anticorps utilisé, l'administration du complexe anticorps-IL-2 pouvait favoriser l'expansion de Treg (anticorps JES6-1) ou de T effecteurs (anticorps S4B6) (Spangler et al., 2015). De même, une augmentation d'efficacité à induire une réponse T effectrice au détriment de Treg a également été observée par utilisation d'une forme mutante de l'IL-2 (Carmenate et al., 2013).

3.3.2.3. Combinaisons d'immunomodulateurs

Du fait de leur voies de signalisation spécifiques et/ou redondantes (Toussi and Massari, 2014), la combinaison de différents TLR peut s'avérer pertinente. Ainsi, une synergie d'action entre les TLR7 et les TLR3 a été mise en évidence *in vitro* et *in vivo* et peut notamment s'expliquer par l'activation simultanée des voies TRIF et MyD88 (Warger et al., 2006). D'autres synergies TLR ont été mises en évidence *in vitro* tels que la combinaison TLR7 avec TLR2, TLR4 ou TLR9, ou encore TLR4 avec TLR2 (Mitchell et al., 2010).

Par ailleurs, il a été montré dans de nombreuses études précliniques que la combinaison d'agonistes TLR ou d'autres stimuli innés tels que l'IFN α avec un anticorps anti-CD40 présentait une synergie d'action (McWilliams et al., 2010; Sanchez et al., 2007). En effet, la combinaison anti-CD40 et ligands TLR/IFN α potentialise l'expression de CD70, qui par interaction avec CD27 sur le TCD8+ spécifiques stimulent les réponses cellulaires effectrices et mémoires. Elle engendre ainsi des réponses primaires et mémoires plus puissantes sur modèle murin. En particulier, il a été observé sur modèle primate non humain que la combinaison de CD40 (administration IV) et d'un ligand de TLR3 améliorait significativement la puissance des réponses TCD4+ et TCD8 induites par un vaccin peptidique. De façon étonnante, il a été montré que les T effecteurs induits étaient principalement localisés au niveau pulmonaire (Thompson et al., 2015).

D'autre part, il a été récemment observé que l'amorçage spontané d'une réponse T CD8+ contre un antigène tumoral implique l'induction de la protéine adaptatrice STING situé au niveau du RE, qui va stimuler les gènes d'interféron (Woo et al., 2014). Des agonistes de STING ont ainsi été développés et ont montré une efficacité intratumorale directe par injection intratumorale dans un modèle de mélanome *in vivo* (Corrales et al., 2013). Les agonistes de STING s'avèrent également efficaces en adjuvant d'un vaccin par cellules tumorales modifiées sécrétant du GM-CSF (Fu et al., 2015). Il serait intéressant d'évaluer les agonistes STING avec ou sans ligands TLR dans un vaccin peptidique.

Enfin, la conjugaison physique entre l'adjuvant et l'antigène permet que la capture antigénique et l'induction de molécules de costimulation aient bien lieu sur la même DC, ce qui garantit une présentation antigénique immunogène et favorise la cross présentation des épitopes CD8+ (Abdel-Aal et al., 2014; Zom et al., 2014, 2016).

3.3.3. Potentialisation de l'adressage aux DC

3.3.3.1. Les systèmes de délivrance particuliers

La formulation en particules vaccinales est d'avantage immunogène qu'un vaccin sous forme soluble parce que cela requiert une internalisation par endophagocytose, qui est une caractéristique propre aux CPA et aux DC en particulier, à l'inverse des autres populations cellulaires dénuées de cette capacité (cf. Partie 1).

Divers systèmes particuliers se sont développés en stratégie vaccinale, notamment les liposomes et les polymères synthétiques (PLG, PLA, PLGA) ou naturels (chitosan, collagène, gélatine, inuline), ou encore les dérivés de saponine (ISCOMATRIX, QS21). Selon leur taille et leur composition, ils possèdent des propriétés physico-chimiques et biologiques variables. Par exemple, les nanoarticules vaccinales de 20 à 200 nm diffusent passivement jusqu'aux ganglions lymphatiques où elles sont capturées par les DC résidentes (Reddy et al., 2006), alors que les microparticules (500 – 2000nm) sont préférentiellement capturées par les DC naturellement présentes ou recrutées au site d'injection. On peut également citer les liposomes à propriété fusiogène (fusion à pH acide avec la membrane endosomale, relarguant leur contenu dans le cytosol) qui semblent particulièrement intéressants pour favoriser la cross présentation dans le cadre d'un vaccin antitumoral (Zamani et al., 2018).

Certains systèmes particuliers ont également des propriétés immunomodulatrices. Elles peuvent être intrinsèques, comme pour le QS21 (Ragupathi et al., 2011) et l'inuline (Kumar et al., 2017) ou ajoutées artificiellement, par inclusion de ligands TLR notamment.

Le vaccin L-BLP25 (Tecemotide®) est constitué d'un lipopeptide antigénique de 25 acides aminés contenant un résidu lysine palmytoïde à sa séquence carboxyterminale. Ce résidu favorise son incorporation dans un liposome immunogène composé de 3 lipides : cholestérol, dimyristoyl phosphatidylglycérol, et MPLA (induction d'une réponse Th1). Il a été montré que la liaison physique entre le liposome immunogène était requise pour l'induction d'une réponse immune robuste, et indispensable à l'induction d'une réponse T. Dans cette stratégie, la réponse cellulaire n'était pas affectée par la localisation liposomale du peptide (en surface ou à l'intérieur), à l'inverse de la réponse humorale pour laquelle l'expression du peptide à la surface du liposome était indispensable (Guan et al., 1998).

Lors d'un essai clinique de phase III chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules, le Tecemotide® a permis une amélioration significative de la survie globale chez le sous-groupe ayant reçu une chimiothérapie au préalable par rapport au groupe contrôle (Xia et al., 2014).

Très récemment un autre vaccin peptidique utilisant des liposomes possédant à leur surface CpG-ODN et du mannose a permis l'inhibition de la croissance d'une lignée de mélanome B16 implantée chez les souris ainsi que la prolongation de leur survie. Le nombre de DC immunosuppressives (MDSC) et de Treg était réduit par le vaccin alors que les LTC et T activés producteurs d'IFN γ étaient augmentés. En outre, une augmentation de l'apoptose des cellules tumorales, une inhibition de l'angiogenèse tumorale et de la prolifération tumorale ont été observées (Lai et al., 2018).

Ces systèmes particuliers peuvent également être fonctionnalisés par des anticorps afin de cibler spécifiquement une ou plusieurs sous-populations de DC :

Comme vu précédemment, différents sous-types de DC sont impliqués dans l'immunité antitumorale (cf.1.2.2.3). Il a par ailleurs été montré que le ciblage par nanoparticules vaccinales de multiples sous-types de DC favorisait leur « cross-talk » par sécrétion d'IL-15 et augmentait la réponse T (Sehgal et al., 2014). Plus particulièrement, l'étape limitante déterminant l'efficacité d'un vaccin peptidique est la cross-présentation des épitopes CD8, qui se retrouve en forte compétition avec la voie classique CMHII *in vivo* (cf.1.2.2.3).

On a vu précédemment que la délivrance aux endosomes précoces abolissait les différences de capacité de cross-présentation entre les sous-types de cDC (cf. Partie 1). Divers anticorps permettant une délivrance antigénique aux endosomes précoces des DC ont été identifiés. Il s'agit des récepteurs endocytaires CD40, CD11c, CLEC9A, MR (récepteur au mannose), DC-SIGN (par ciblage de la région « neck »), ainsi que de la chaperonne ORP150. A l'inverse, le ciblage de DEC-205 ou encore de DC-SIGN (par ciblage de la région « CRD ») favorise le routage du cargo antigénique vers les lysosomes (Schuette and Burgdorf, 2014b). Il est important de préciser que ces expériences ont été réalisées avec l'ovalbumine (glycoprotéine soluble), et que ces résultats ne s'appliqueront pas forcément à un autre antigène, notamment sous forme particulaire.

Il peut également être intéressant d'utiliser les anticorps endogènes du patient comme vecteurs vaccinaux via la formation de complexes immuns avec le vaccin *in vivo*. Les complexes immuns sont des médiateurs puissants de l'activation des DC et facilitent la cross présentation antigénique, notamment lorsqu'ils sont captés par liaison au FcRn exprimé par les DC mucosales (Baker et al., 2013; Boross et al., 2014; van Montfoort et al., 2012). Partant du postulat que nous sommes universellement immunisés contre la toxine tétanique par la présence d'anticorps anti IgG, une équipe a conjugué un long peptide vaccinal à un épitope de lymphocyte B issu de la toxine tétanique. Cette construction vaccinale permet théoriquement la formation de complexes immuns *in vivo* entre le vaccin et nos anticorps au niveau plasmatique.

Il a été montré que cette stratégie améliorait de façon significative la réponse T et son efficacité antitumorale sur modèle murin, par utilisation d'un long peptide dérivé de l'ovalbumine. La capacité de cette construction vaccinale à rompre la tolérance envers des antigènes du Soi reste à évaluer.

Une autre approche novatrice, utilisée par le vaccin TVGV-1®, est la conjugaison d'une séquence peptidique d'E7 avec l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* et un signal de rétention au reticulum endoplasmique (RE). L'exotoxine A est utilisée en tant que vecteur car elle se lie *in vivo* au récepteur LRP1 présent entre autres sur les CPA. Le vaccin est ensuite clivé par le protéasome, et le signal d'adressage au RE facilite la présentation des épitopes d'E7 sur le CMHI. Chez la souris, ce vaccin avait induit de fortes réponses LTC et une protection contre un challenge tumoral. Il est actuellement en essai clinique de Phase IIa chez des patients atteints de tumeurs HPV+ (NCT02576561).

3.3.3.2 Les peptides pénétrant les cellules

Les peptides pénétrants les cellules (CPP, Cell Penetrating Peptides) sont des peptides de 5 à 30 acides aminés ayant la capacité de traverser les membranes cellulaires avec la possibilité de transporter avec eux un cargo (protéine, acides nucléiques, petites molécules). Leur propriété pénétrante provient de leur séquence qui peut être cationique (riche en arginine et tryptophane), amphiphile, ou hydrophobe, et de son interaction avec les charges de la membrane plasmique responsable de divers mécanismes d'entrée (divers types d'endocytoses et de diffusions passives) (Borrelli et al., 2018). Chaque CPP a ses propres particularités selon sa structure : Le CPP LAH4 est capable d'induire une translocation cytoplasmique car il change de conformation sous l'acidification endosomale (Prongidi-Fix et al., 2007), alors que le CPP Penetratine induit une présentation par apprêtement vacuolaire (Pouniotis et al., 2016). Ils peuvent être synthétisés à façon pour favoriser leur routage intracellulaire.

Les CPP sont entrés dans le développement clinique de nombreux traitements pour des pathologies diverses et variées. Leur inconvénient majeur dans le cadre d'un vaccin peptidique antitumoral est le manque de spécificité de leur adressage cellulaire. Malgré cela, les stratégies vaccinales utilisant des CPP montrent des résultats prometteurs chez la souris.

Ainsi, il a été montré qu'un cargo contenant des épitopes CD4 et CD8 ou une protéine entière liée à la Penetratine permet la présentation CMHI et CMHII, une inhibition de la croissance tumorale et une protection après rechallenge tumoral à 40 jours (Pouniotis et al., 2011). Par ailleurs, une augmentation de l'efficacité vaccinale autant prophylactique que thérapeutique a été observée chez

la souris pour divers antigènes tels que CEA, p53, survivin, MUC-1, HPV16-E7, ou HER2 lorsqu'ils étaient formulés avec un CPP versus sans CPP (Grau et al., 2018).

Un vaccin long peptide hybride composé d'épitopes CD4 et CD8 de MAGE-3 ou d'HPV-16 conjugués avec une séquence pénétrante du CPP TAT a permis l'induction de TCD4+ et d'anticorps mais pas de TCD8+ chez des patients souffrant d'un cancer de la tête et du cou MAGE-A3+ ou HPV16+ lors d'un essai clinique de phase I. Aucun bénéfice clinique n'a été observé suivant les critères RECIST, excepté pour un patient dont le cancer s'est stabilisé durant plus de 10 mois (Zandberg et al., 2015).

Il s'agit du vaccin contenant des linker sensibles à la furine évoqué précédemment (cf.3.2.2.4), qui est adressé spécifiquement au niveau du RE et du Golgi grâce à la séquence du CPP. Cette approche est particulièrement intéressante car elle combine deux innovations différentes qui agissent en synergie : un routage intracellulaire favorisant la cross-présentation, et une construction peptidique favorisant la génération d'épitopes au lieu d'adressage du vaccin. Cependant, aux vues des résultats cliniques, elle ne semble pas optimale pour induire une réponse LTC.

3.4. Optimisation de l'administration

3.4.1. Voies d'administration novatrices

Les vaccins actuellement commercialisés en France sont essentiellement délivrés par une injection intradermique (ID), intramusculaire (IM) ou sous cutanée (SC). Quelques vaccins sont délivrés par voie muqueuse (polio, choléra, salmonelle, rotavirus, grippe) (Nizard et al., 2014).

Le choix de la voie d'administration est très important car cela peut très fortement influencer l'efficacité vaccinale.

Premièrement, la voie d'administration doit être adaptée à la formulation vaccinale. Les vaccins peptidiques étant destinés à être capturés et présentés par des DC, ce sont les voies SC et ID qui sont privilégiées dans les essais cliniques car riches en DC et bien tolérées par les patients. A l'inverse, la voie IM pauvre en DC est peu utilisée en vaccination peptidique, mais représente la voie d'administration majoritaire des vaccins nucléiques du fait que ce tissu est capable de produire de grandes quantités d'antigènes à partir d'acides nucléiques (Khan et al., 2014).

Deuxièmement, il est essentiel de prendre en compte la localisation de la tumeur dans le choix de la voie d'administration, afin d'obtenir une immunité robuste au niveau du site tumoral. En effet, on a vu que les DC impriment un programme de recrutement préférentiel des lymphocytes vers leur site d'activation initial (cf. Partie 1.1.1.).

Cette immunité peut se « mesurer » notamment par la présence de lymphocytes T CD8 mémoires résidants dans les tissus (TRM). Les TRM ont été décrits dans de nombreux cancers (urothélial, colorectal, ovarien, endométrial, cervical, pulmonaire, ainsi que dans le mélanome et le glioblastome). Leur accumulation est corrélée avec un bon pronostic pour plusieurs cancers (vessie, ovaire, poumon) et de manière plus fiable que le taux de T CD8+ total (Gebhardt et al., 2018). Ces cellules résident de façon prolongée dans les tissus sans recirculation systémique et s'activent rapidement lors d'un second contact antigénique. Bien que leur implication dans l'immunité antitumorale prophylactique ou thérapeutique a été démontrée chez la souris pour certains cancers, leur mécanisme d'action précis reste à définir. Certaines études suggèrent qu'elles seraient également les principales cibles des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire du fait de leur expression constitutive de ces molécules (Nizard et al., 2016).

Ainsi, si les DC cutanées et notamment les cellules de Langerhans favorisent le recrutement lymphocytaire au site cutané inflammé (Dudda et al., 2004), il a été montré que la vaccination peptidique par voie sous-cutanée ou intradermique ne permettait pas d'obtenir une forte réponse CD8 locale pour les cancers à localisation muqueuse (ORL, pulmonaire, digestif, urogénital). A l'inverse, la

vaccination par voie muqueuse induit une immunité à la fois locale et systémique davantage approprié pour ce type de cancers et leurs métastases (Nizard et al., 2014).

La vaccination muqueuse n'a pour l'instant pas été étudiée cliniquement chez l'Homme dans le cadre de vaccins peptidiques antitumoraux, mais donne des résultats sur modèles murins prometteurs pour de nombreux cancers muqueux. Par exemple, l'administration par voie orale d'un vaccin peptidique a permis de générer une réponse T CD8+ capable de contrôler la croissance de tumeurs gastriques alors que la même formulation vaccinale n'était pas efficace par voie sous-cutanée (Wakabayashi et al., 2008).

Encore plus intéressant, l'existence d'un tissu lymphoïde commun aux muqueuses (MALT, Mucosal associated lymphoïde tissu) organisé de façon similaire aux ganglions lymphatiques permet d'induire par une immunité mucale locale mais également à distance. De ce fait, il a été montré que la vaccination par voie sublinguale permettait d'induire une immunité non seulement au sein des muqueuses aériennes mais également au niveau des muqueuses urogénitales. Cette immunité se révélait par ailleurs suffisante pour inhiber la croissance tumorale des tumeurs présentes à ces niveaux (Cuburu et al., 2009; Hervouet et al., 2014).

Cependant, la spécificité du microenvironnement de chaque muqueuse fait qu'elles n'ont pas toutes la même capacité à induire une forte immunité locale ou distante. Il a été montré que la voie muqueuse vaginale se révèle peu efficace pour induire une immunité locale, notamment à cause de l'estradiol qui inhibe l'amorçage de la réponse TCD8+ (Seavey and Mosmann, 2009). En outre, il a été observé que les voies intravaginale et SC étaient efficaces pour induire une régression tumorale dans la vessie et non la voie nasale chez la souris (Domingos-Pereira et al., 2014). Chaque site d'administration muqueux semble donc induire des tropismes de T activés à des sites distincts et bien définis. Certaines études suggèrent également une influence du microbiote local cutané ou intestinal dans la modulation de l'efficacité vaccinale (Kamada and Núñez, 2014; Naik et al., 2012).

Une autre solution qui permet d'améliorer la réponse CD8 locale consiste à associer une vaccination SC ou ID à une stimulation de l'immunité innée au niveau tumoral, notamment par des ligands TLR. Un vaccin peptidique contre le papillomavirus associé à l'administration locale de CpG-ODN a ainsi permis une régression complète de tumeurs génitales chez 75% des souris au lieu de 20% par vaccination seule (Domingos-Pereira et al., 2013).

Aux vues de ses différentes études, on peut donc penser que la vaccination par voie intratumorale serait l'idéale pour induire une réponse locale optimale. La tumeur n'est cependant pas toujours accessible ; Si oui elle est généralement retirée par chirurgie, sauf parfois lorsqu'il y a de multiples métastases. De plus, l'administration intratumorale requiert une compétence particulière.

Enfin, l'administration vaccinale dans le microenvironnement tumoral pourrait favoriser la présentation toléro-gène d'antigènes vaccinaux si elle n'est pas associée à un traitement visant à lever l'immunosuppression locale.

D'autres voies d'administration minoritaires sont également étudiées en vaccination peptidique, notamment la voie systémique intraveineuse (IV) dans les stratégies Trivax et Bivax utilisant un cocktail d'épitopes CD8 associés à des ligands TLR (Cho and Celis, 2009; Cho et al., 2013) ; Il a été montré que l'administration par voie intraveineuse permettait d'induire une immunité plus efficace que par voie SC ou ID, en favorisant le tropisme aux ganglions lymphatiques et en facilitant le recrutement de T naïfs à ce niveau (Bridle et al., 2016; Cho et al., 2013).

L'effet antitumoral de la vaccination induite par Bivax a été démontré *in vitro* sur lignée de mélanome B16 et chez des souris par inhibition de la croissance tumorale. Cette approche permet d'obtenir des réponses T particulièrement importantes et comparables avec la réponse immune antivirale, notamment par l'utilisation du polyICLC en adjuvant (>70% de TCD8+ spécifiques sanguins).

De façon étonnante, la déplétion en CD4 avant les injections prime et boost n'avait aucune influence sur l'intensité et la durée de la réponse TCD8+. Autre singularité, l'utilisation de longs peptides dans ces conditions s'avère moins efficace que des peptides courts (Cho et al., 2013). Le caractère amphiphile du peptide semble quant à lui primordial ; cela permet en solution aqueuse la formation de nanostructures mimant une particule virale qui pourrait être captée plus efficacement par les DC (Hartgerink et al., 2001).

Ces résultats suggèrent que l'efficacité d'une construction vaccinale dépend de la voie d'administration utilisée, ce qui souligne l'importance d'utiliser en préclinique des modèles similaires au mode d'administration envisagé chez l'Homme. Par ailleurs, la transposabilité chez l'Homme de ce vaccin par voie veineuse est susceptible d'engendrer un syndrome de choc toxique, surtout compte tenu du pourcentage de lymphocytes spécifiques engendrés.

3.4.2. Mode d'administration

L'utilisation de multiples peptides sous-entend une compétition d'affinité sur le CMH, notamment pour les peptides de même polymorphisme HLA (Powell and Rosenberg, 2004). Ceci peut être évité en subdivisant la préparation vaccinale en plusieurs vaccins monoépitopiques administrés à des sites d'injection distincts. Néanmoins cette stratégie d'administration est peu tolérable par le patient au-delà de 3 à 4 peptides différents, d'autant plus que les schémas thérapeutiques de vaccins antitumoraux impliquent généralement plusieurs cycles d'injections.

Des résultats précliniques ont montré que la compétition peptidique n'inhibait pas l'immunogénicité vaccinale puisque l'administration d'un vaccin tri épitopique permettait une réponse T pour chaque antigène équivalente à leur injection par vaccin mono épitopique dans un modèle de mélanome chez la souris (Thompson et al., 2004).

Chez l'Homme, il a été observé pour un vaccin di-antigénique par comparaison de deux essais cliniques séquentiels que la réponse T vis-à-vis d'un peptide pouvait être altérée au profit de l'immunogénicité de l'autre peptide lorsqu'ils étaient injectés au même site versus divisés en deux injection à des sites distincts (Rosenberg et al., 2006).

Néanmoins, une étude prospective comparant un vaccin à 12 épitopes et un vaccin à 4 épitopes a montré que l'immunogénicité intrinsèque des épitopes était maintenue quelque soit la formulation, et que le vaccin à 12 épitopes permettait l'obtention d'une réactivité T cumulative augmentée (NCT00938223) (Slingluff, 2011). Plusieurs épitopes de ce vaccin avaient notamment la même restriction HLA, ce qui permet de démontrer l'addition de deux ou trois peptides liant le même polymorphisme CMH n'inhibe pas l'immunogénicité intrinsèque des épitopes. Ces résultats sont en faveur du développement de stratégies vaccinales multiépitopiques.

De même, dans un essai clinique de phase I chez des patients atteints de cancer colorectal, le mode d'administration (commune ou divisée, en SC) n'a pas eu d'influence sur l'immunogénicité d'un vaccin composé de 5 épitopes CD8, dont 3 proviennent d'antigènes tumoraux différents et 2 de facteurs angiogéniques. Sur 18 patients, 1 a observé une régression tumorale complète et 6 une stabilisation. Les patients ayant développés des LTC spécifiques d'au moins 3 antigènes ont eu significativement un meilleur pronostic (médiane de survie de 27,8 mois versus 3,7 mois) (Hazama et al., 2014). Ceci conforte l'intérêt d'utiliser plusieurs antigènes tumoraux.

Enfin, d'autres critères d'administration influent également sur l'efficacité vaccinale, tels que le nombre d'injections rappels (boost), le calendrier des injections, ainsi le schéma d'administration vaccin/adjuvant ou vaccin/traitement associé (administration séquentielle, combinée, différée, ...).

3.5. Etat des lieux des vaccins peptidiques en essais cliniques

3.5.1. Vaccins peptidiques en phase III

En effectuant une recherche au 20/04/2018 sur la base de données NCT Clinical Trials avec les mots clefs « Cancer » et « vaccine », et en sélectionnant les essais cliniques actifs de phase III (recrutement terminé), on dénombre 4 essais cliniques en vaccination thérapeutique antitumorale dont 2 vaccins peptidiques et 2 vaccins utilisant des cellules dendritiques.

La première stratégie peptidique est un vaccin de production biologique utilisant une technique d'isolement et de purification d'antigènes solubles (gp100, MART-1, MAGE-3 et MelanA notamment) à partir de 3 lignées cellulaires de mélanome, qui sont ensuite formulés dans de l'hydroxyde d'aluminium avant d'être injecté au patient (technologie Polynoma®) (NCT01546571).

La seconde stratégie peptidique en phase III est constituée d'une combinaison brevetée de 10 néo-épitopes dont 9 épitopes CD8 HLA-A2 provenant de 5 antigènes tumoraux différents sélectionnés en fonction de leur mauvais pronostic clinique dans de nombreux cancers (p53, CEA, HER-2 et MAGE2/3), et 1 épitope CD4 universel PADRE (Ishioka et al., 2004). Parmi eux se trouve un épitope CD8 issu du CEA (CAP1) optimisé par le remplacement d'une arginine en position 6 par un acide aspartique (CAP1-6D). En plus de cet épitope optimisé déjà caractérisé, 6 autres des 8 épitopes CD8 ont été modifiés par substitution d'acide aminé afin d'améliorer leur affinité de fixation sur le CMH et leur affinité d'interaction avec le TCR (technologie Memopi®).

L'efficacité de Tedopi® avait été évaluée dans un essai de phase II (NCT00104780) chez des patients HLA-A2+ atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules de stade avancé ou métastatique, après échec d'un inhibiteur de point de contrôle immunitaire. Il a été observé une amélioration du taux de survie à 1 an (59% vs 49%) de la médiane de survie (17,3 mois vs 12 mois) et de la survie à long terme par comparaison au groupe contrôle composé de patients HLA-A2 négatifs (Barve et al., 2008). 89% des patients du groupe expérimental ont montré une stabilisation de leur pathologie et une forte corrélation significative entre les réponses T et la survie a été observée.

Cette stratégie vaccinale est actuellement évaluée chez la même population dans un essai de phase III afin de démontrer sa supériorité par rapport à d'autres traitements conventionnels (NCT02654587).

3.5.2. Vaccins peptidiques en phase I et II

En effectuant une recherche au 20/04/2018 sur la base de données NCT Clinical Trials avec les mots clefs « Cancer » et « vaccine », en sélectionnant les essais cliniques actifs de phase I et II (recrutement terminé), on dénombre 175 essais cliniques en cours sur la vaccination antitumorale dont 159 concernent des vaccins thérapeutiques et 34 sont des vaccins peptidiques (21%), concernant divers types de cancers, dont le mélanome (26% des essais) (Figure 24).

Sur les 34 essais cliniques de vaccins peptidiques thérapeutiques antitumoraux :

Concernant la stratégie antigénique, on dénombre 16 études (47%) portées sur des vaccins polyantigéniques, dont la majorité cible essentiellement des antigènes associés aux cancers (MART-1, gp100, NY-ESO-1...), 3 concernent des vaccins personnalisés ciblant des néoantigènes, et 2 vaccins ciblent des xénoantigènes (E6, E7). Les autres stratégies vaccinales étudiées (53%) sont mono-antigéniques mais en général multiépitopiques. Les antigènes les plus représentés en stratégies mono-antigéniques sont hTERT (4 essais), le récepteur α aux folates (3 essais), et WT1 (3 essais). Toute stratégies confondues, les antigènes HER2 (4essais) et gp100 (4 essais) sont également les plus utilisés.

On note également plusieurs stratégies utilisant un design vaccinal amélioré. Ainsi, 2 vaccins utilisent des peptides variant P1Y (NCT02289196, NCT01266083), 1 utilise des complexes KLH-peptide (NCT02455557), et 1 utilise un peptide de l'antigène E7 du papillomavirus fusionné avec une exotoxine de *Pseudomonas aeruginosa* et un signal de rétention au réticulum endoplasmique (NCT02576561).

Concernant la formulation, les peptides sont le plus souvent émulsifiés dans du montanide (38%) et administrés avec du GM-CSF (44%). L'adjuvant incomplet de Freund autrefois très utilisé n'est retrouvé que dans 1 essai sur les 34 (NCT00470015). On note l'apparition des ligands TLR tels que le polyI:CLC (mentionné dans 3 essais cliniques) et l'imiquimod (dans 1 essai clinique) et, 1 vaccin utilise une forme liposomale (NCT00828009).

Concernant l'administration, le schéma vaccinal est essentiellement constitué de plusieurs cycles d'injections avec un nombre d'injections et des fenêtres thérapeutiques variables. Les voies ID ou SC sont systématiquement utilisées. Afin de minimiser la compétition de présentation épitopiques, certains vaccins sont divisés en sous-préparations de spécificité distinctes et administrées simultanément à des sites d'injection différents (NCT02293707, NCT02289196, NCT00960752).

NCT	Phase	Désignation du vaccin	Cancer	Antigènes		Vaccin Personnalisé	GM- CSF	monta -nide
				Poly-Ag	Noms			
NCT01784913	I/II	UV1	cancer de la prostate		hTERT		x	
NCT01789099	I/II	UV1	cancer du poumon		hTERT		x	
NCT02128126	I/II	ISA101/ISA101b	cancer du col de l'utérus	x	E6, E7			x
NCT01227772	I/II	OTSGC-A24	cancer gastrique	x	OTSGC-A24 FOXM1, DEPDC1, KIF20A, URLC10 et VEGFR1			
NCT02593227	II	FRα vaccine	cancer du sein		récepteur α aux folates		x	
NCT02764333	II	TPIV200	cancer de l'ovaire		récepteur α aux folates		x	
NCT02737787	I	WT1 Vaccine	cancer de l'ovaire		WT1		x	x
NCT02293707	II	GX301	cancer de la prostate		hTERT			x
NCT01922921	I/II	HER-2/neu Intracellular Domain Protein	cancer du sein		HER2			
NCT00343109	II	HER-2/neu intracellular domain protein	cancer du sein		HER2			
NCT03199872	I/II	RV001	cancer de la prostate		RHoC			x
NCT01606241	I	Multi-epitope Folate Receptor Alpha Peptide Vaccine	cancers de l'ovaire ou des trompes		récepteur α aux folates		x	
NCT02426892	II	ISA 101	Cancers HPV+	x	E6, E7			x
NCT02289196	I	Vx006	tumeur solides	x	MAGE, TERT et HER2			
NCT00828009	II	emepepimut-S	cancer du poumon		MUC1			
NCT02287428	I	Personalized NeoAntigen Vaccine	glioblastome	x	néoantigènes	x		
NCT01970358	I	Peptides	mélanome	x	néoantigènes	x		
NCT02429440	I/II	peptide vaccine	cancer rénal	x	antigènes associés aux cancers (TAA)		x	x
NCT02452307	I/II	peptide vaccine	cancer de la prostate		PSA		x	x
NCT00960752	II	gp100 / MAGE-A3	mélanome	x	gp100 et MAGE-A3			
NCT02754362	II	Peptide Vaccine	glioblastome	x	EGFRvIII IL13Rα EphA2 Her2 YKL-40			x
NCT01961115	II	MELITAC 12.1 Peptide Vaccine	mélanome	x	TAA & TTX			
NCT01890980	II	WT-1-vaccine	mésothéliome pleural		WT1		x	x
NCT02576561	II	TVGV-1	Cancers HPV+		E7			
NCT01266083	II	WT1 peptide vaccine	LAM/LAL		WT1			
NCT02454634	I	IDH1 peptide vaccine	glioblastome		IDH1 (isocitrate dehydrogenase type 1)			
NCT02149225	I	APVAC1 / APVAC 2	glioblastome	x	5-10 TAA pour APVAC1 / 1-2 neoantigènes pour APVAC2	x	x	
NCT02275416	I/II	UV1 vaccine	mélanome		hTERT		x	
NCT00515528	II	4-peptide melanoma vaccine	mélanome	x	antigènes associés aux cancers (TAA)		x	x
NCT01176474	I	NY-ESO-1 157-165 (165V) / gp100:280-288 (288V)	mélanome	x	NY-ESO-1, gp100			x
NCT00470015	I	MART1a, gp100 et Survivin	mélanome	x	MART1a, gp100 et Survivin		x	
NCT01176461	I	ART-1/ NY-ESO-1/ gp100:209-217(210M) / gp100:280-288(288V)	mélanome	x	NY-ESO-1, gp100			x
NCT02455557	II	SVN53-67/M57-KLH Peptide Vaccine	glioblastome		survivin		x	x
NCT02696356	I	GRN-1201	mélanome	x	antigènes associés aux cancers (TAA)		x	

Figure 24 : Vaccins thérapeutiques de type peptidique en cours d'essais cliniques de phase I ou II.

On retrouve parmi ces essais cliniques de nombreuses stratégies vaccinales précédemment évoquées dans ce manuscrit.

Cet antigène n'ayant pas encore été mentionné, les quelques essais actuels concernant le récepteur α aux folates méritent d'être abordés :

3 essais cliniques concernent un même vaccin constitué d'un mélange de 5 épitopes CD4 du récepteur α aux folates (FR30, FR56, FR76, FR113, and FR238). Environ 88% des génotypes HLA sont réactifs à au moins 1 de ces épitopes. Cet antigène du Soi est surexprimé dans de nombreux cancers. Cette stratégie vaccinale a été évaluée chez des patientes atteintes de cancer du sein ou de l'ovaire préalablement traitées au cyclophosphamide, et a démontré une bonne tolérance ainsi que l'apparition ou l'augmentation d'une immunité spécifique chez plus de 90% des patientes indépendamment de leur génotype HLA (Kalli et al., 2018). Cette immunité se développe progressivement à 5 mois et persiste à 1 an. Un essai clinique en cours dans le cancer du sein triple négatif évalue deux doses (faible et forte) de ce vaccin avec ou sans prétraitement au cyclophosphamide NCT02593227, un autre essai clinique évalue la sécurité et l'efficacité de sa combinaison avec GM-CSF et Durvalumab (anticorps anti-PDL1 indiqué dans le carcinome urothélial) (NCT02764333), et un troisième sa combinaison avec le cyclophosphamide dans plusieurs types de cancers (NCT01606241).

Par ailleurs, les stratégies de vaccins personnalisés de néoantigènes sont actuellement « à la mode » grâce aux nouvelles techniques d'identification de pointe, et commencent à arriver au stade des essais cliniques (Kim et al., 2018). Cette approche représente cependant un vrai défi technique et économique à mettre en place pour qu'elle puisse devenir profitable au plus grand nombre de patients.

Ainsi, un essai clinique évalue l'applicabilité, la tolérance et l'immunogénicité d'une association de deux vaccins personnalisés (NCT02149225) ; APVAC1® et APVAC2®. Le premier est mélange spécifique de 5 à 10 peptides surexprimés par la tumeur du patient issus d'une banque peptidique. Le second est un mélange de 1 à 2 peptides issus de néoantigènes synthétisés spécifiquement pour le patient, suivant leur identification par analyse du mutanome puis de l'HLA ligantome de la tumeur. La fabrication personnalisée de ces vaccins impose un délai de 3 (APVAC1) à 6 mois (APVAC2) entre l'inclusion du patient et l'administration de la première dose vaccinale. Ces deux vaccins sont administrés avec du GM-CSF et du PolyIC.

D'autre part, deux essais cliniques concernent NeoVax®, un autre vaccin personnalisé qui contient jusqu'à 20 néoépitopes autologues sous forme de longs peptides administré avec du polyICLC. D'un côté en monothérapie associé à du polyICLC chez des patients atteints de mélanome (NCT01970358), et de l'autre chez des patients atteints de glioblastome en combinaison avec une radiothérapie (NCT02287428).

La stratégie de conception de Neovax® est la suivante : Pour chaque patient, la comparaison du séquençage ADN complet de cellules tumorales et de cellules saines autologues a permis d'identifier des mutations somatiques, dont l'expression a été évaluée par séquençage ARN complet des cellules tumorales. Après prédiction *in silico* des séquences peptidiques susceptibles d'être les plus affines au polymorphisme CMHI du patient, ces longs peptides ont été synthétisés en qualité clinique et séparés en 4 pools injectés à des sites distincts (Figure 25). Le délai entre l'inclusion et la première injection, représentant la durée de fabrication du vaccin personnalisé, était de 4,5 mois (médiane).

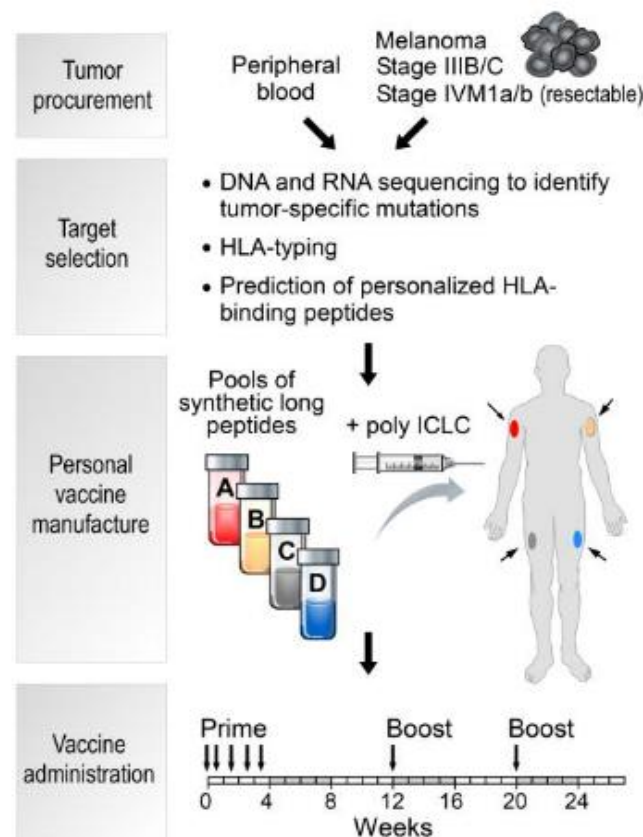


Figure 25 : Stratégie de conception et d'administration de Neovax® (Ott et al., 2017)

L'essai clinique mené chez les patients atteints de mélanome (NCT01970358) montre des résultats prometteurs : 4 sur 6 patients vaccinés n'ont pas eu de récurrence tumorale à 25 mois post vaccination, et 2 ont manifestés une progression tumorale post vaccination. Ces derniers ont alors été traités par anticorps anti-PD1, ce qui a permis une régression tumorale complète associée à l'expansion de leur répertoire T néoantigéniques (Figure 26) (Ott et al., 2017).

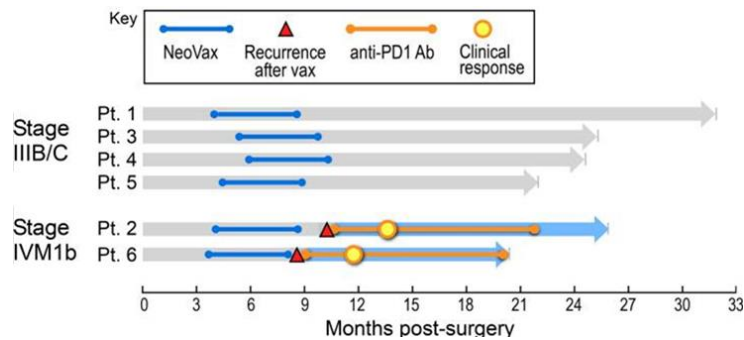


Figure 26 : Devenir des patients (NCT01970358). D'après (Ott et al., 2017).

Les réponses endogènes ont été suivies par prélèvements de leucocytes sanguins et analyse *in vitro* de leur réactivité vis-à-vis de séquences peptidiques chevauchantes (ASP) provenant des 4 pools peptidiques vaccinaux propre au patient (Figure 27A) par ELISPOT pour l'IFN γ . Une médiane de 3 sur 4 pools a induit une réactivité significative, non présente avant vaccination, suggérant l'induction de réponses polyclonales contre les néoépitopes vaccinaux chez tous les patients. On note en outre que les patients 2 et 6 observant les niveaux de réactivités les plus faibles correspondent aux patients qui ont rechutés, soulignant le lien entre réponse au vaccin et pronostic (Figure 27B). Après analyse par marquage intracellulaire, il s'est avéré que les réponses détectées par ELISPOT étaient des réponses TCD4+ uniquement. L'observation de réponses TCD8+ (IFN γ +) a pu être détectée après expansion et préstimulation des cellules *in vitro* avec des peptides épitopiques issus des peptides vaccinaux (ESP, Figure 27A), et ce pour 8 des 17 pools ESP totaux parmi les 6 patients (47%) (Figure 28C). A noter qu'au moins 1 pool ESP par patient a permis l'induction d'une réponse TCD8+.

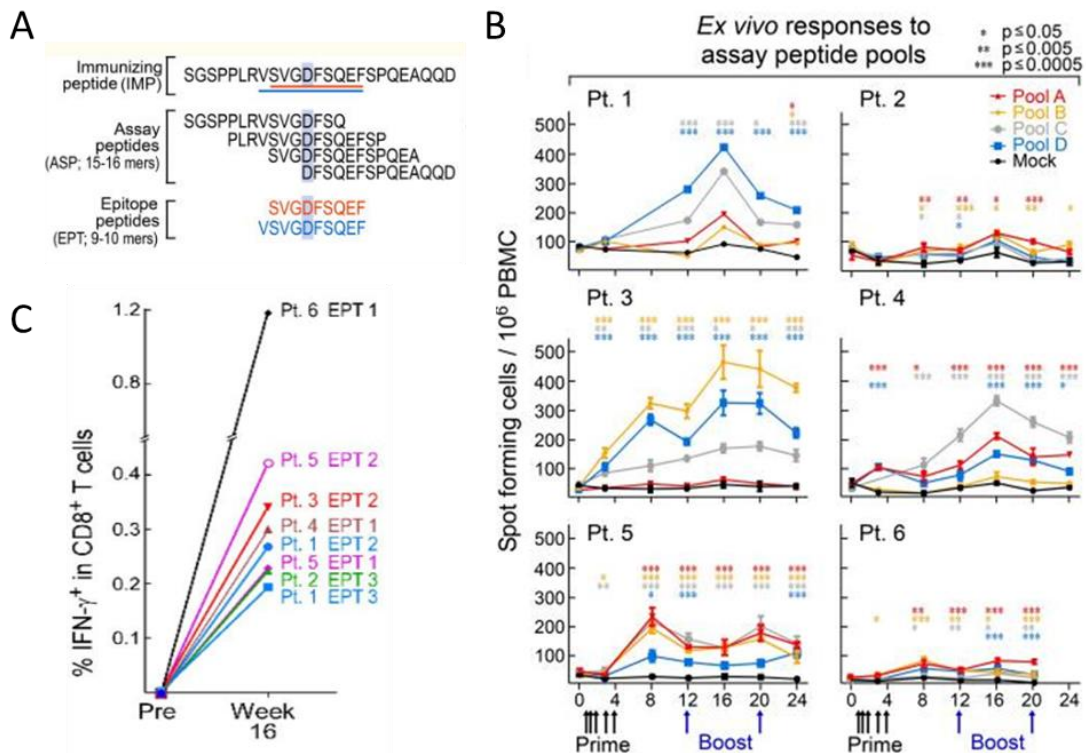


Figure 27 : Analyse des réponses vaccinales(NCT01970358). D'après (Ott et al., 2017).

On remarque donc que malgré une stratégie basée sur l'identification de néoépitopes CD8 de haute affinité, ce sont des réponses TCD4+ qui sont majoritaires *in vivo* (~60% versus 20% de réponses TCD8+), ce qui souligne une fois de plus que la cross-présentation est l'étape limitante de l'efficacité vaccinale antitumorale.

D'autre part, de façon tout à fait intéressante, il a été observé pour les patients 2 et 6 que les réponses polyclonales au vaccin étaient maintenues et même étendues après 9 à 12 mois de traitement anti-PD1. Ainsi, pour le patient 2, on note l'apparition de 4 nouveaux clones TCD4+ post anti-PD1. Pour le patient 6, certains clones TCD4+ ont disparus mais d'autres sont apparus, et on note également l'apparition de 2 nouveaux clones TCD8+ (Figure 28). Ces résultats soulignent l'intérêt d'utiliser des ICI en combinaison avec un vaccin antitumoral.

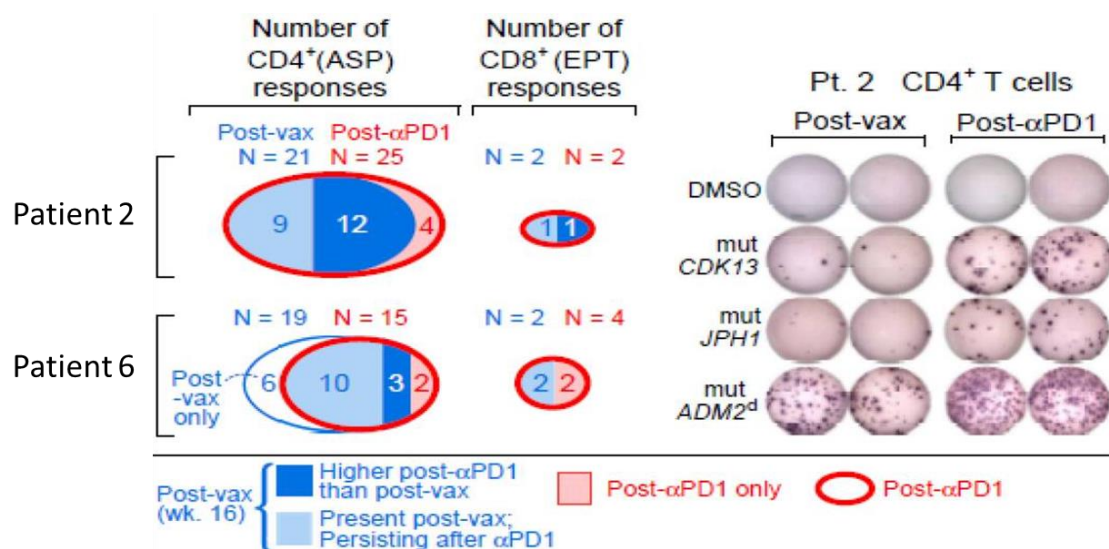


Figure 28 : Le répertoire T au vaccin persiste et évolue sous anti-PD1. Sur la droite, on peut voir des exemples d'ELISPOT pour l'IFN γ après vaccination (à 16 semaines) et après traitement par anti-PD1 (à 16 semaines) concernant des réponses TCD4+ contre 3 antigènes mutés. Le DMSO (diméthylsulfoxyde) est un contrôle négatif. D'après (Ott et al., 2017).

Cette étude constitue donc la preuve de concept de l'applicabilité, de la tolérance et de l'immunogénicité d'un vaccin long peptides personnalisé antitumoral.

Conclusion

Nous venons de détailler les principales découvertes et évolutions récentes en termes de stratégies antigéniques, de constructions peptidiques, de formulation et d'administration visant à optimiser l'immunogénicité vaccinale *in vivo*. En particulier, certains vaccins tels que Tedopi® et Neovax®, ou encore galinpepimut-S®, Vx001® et TVGV1® semblent sortir du lot.

Si globalement les leçons des anciennes constructions peptidiques ont été tirées et que l'on remarque une amélioration des design vaccinaux, les stratégies développées restent extrêmement hétérogènes car chaque équipe de recherche n'utilise finalement que quelques unes des techniques d'optimisation de l'immunogénicité développées et non la combinaison de toutes.

En particulier, on observe encore de nombreuses stratégies composées d'épitopes courts, ou encore de cocktails d'épitopes CD8 sans épitopes CD4. Bien que certaines montrent une bonne tolérance et immunogénicité en préclinique ou phases cliniques précoces, elles pourraient aisément améliorer leur chance d'atteindre ou de valider un essai clinique de phase III par prise en compte au minimum de tous les points limites listés en Partie 3.2.2.

Par ailleurs, cette diversification du nombre de stratégies fait qu'il est difficile de les comparer entre elles et de distinguer les plus pertinentes. Néanmoins, en prenant en considération toutes les stratégies d'optimisation présentées dans cette thèse, on pourrait imaginer le vaccin peptidique antitumoral idéal comme suit :

Des séquences hybrides de type longs peptides contenant :

- 1 variant P1Y d'un épitope CD8 de polymorphisme HLA*A0201 issu d'une séquence cryptique ou non codante de WT1
- 1 variant P1A et/ou P9L d'un épitope CD8 de polymorphisme HLA-A*0702 issu d'une séquence cryptique ou non codante de MAGE
- 4 épitopes CD4 universels différents issus d'une séquence cryptique ou non codante d'hTERT

En effet, l'oncogénicité d'hTERT, de WT1 et de MAGE ainsi que leur large expression dans divers types tumoraux en fait une stratégie polyantigénique de choix (cf.3.1.2), et l'utilisation d'épitopes cryptiques ou non codants permet en théorie de combiner la présence d'un répertoire T effecteur chez la majorité des patients à une expression spécifiquement restreinte aux cellules tumorales (cf.3.1.3). En outre, l'association de ces deux polymorphismes CMHI permettrait en théorie d'induire une réponse LTC chez 75% de la population caucasienne, et leur combinaison à des épitopes CD4 universels résoud presque totalement la problématique de restriction HLA (cf.3.2.2.2).

On pourrait ainsi créer 4 constructions différentes en combinant à chaque fois 1 épitope CD8 avec 1 des épitopes CD4. Le design en longs peptides permettrait d'améliorer le taux et la durée de présentation par les DC (3.2.1.1), et l'association CD4/CD8 de booster la réponse LTC (cf.3.2.1.2).

Pour aller plus loin, les épitopes de ces peptides pourraient être entourés par des séquences linker sensibles à la dégradation par le protéasome afin de favoriser la génération d'épitopes tout en les protégeant (cf.3.2.2.4), et ces longs peptides seraient conjugués à une séquence homologue de l'ubiquitine permettant l'adressage au protéasome (Yu et al., 2016). Cela combine une stratégie de routage à une stratégie de génération d'épitopes, comme pour la stratégie du vaccin CPP TAT (cf.3.3.3.2, association linker furine et adressage au RE), qui n'a pas été retenue ici car n'ayant pas permis l'induction d'une réponse LTC chez les patients.

Enfin, chaque construction serait encapsulée dans un liposome fusiogène à pH acide, portant à sa surface des ligands TLR3 (PolyICLC) et des anticorps anti-CD40 :

Le liposome donnerait une forme particulière au vaccin, favorisant son endophagocytose par les DC, et protégerait le vaccin des protéases extracellulaires (cf.3.3.3.1). Les ligands TLR3 ont été retenus par rapport aux autres ligands TLR du fait qu'ils font partie de plusieurs stratégies vaccinales prometteuses actuellement en essais cliniques.

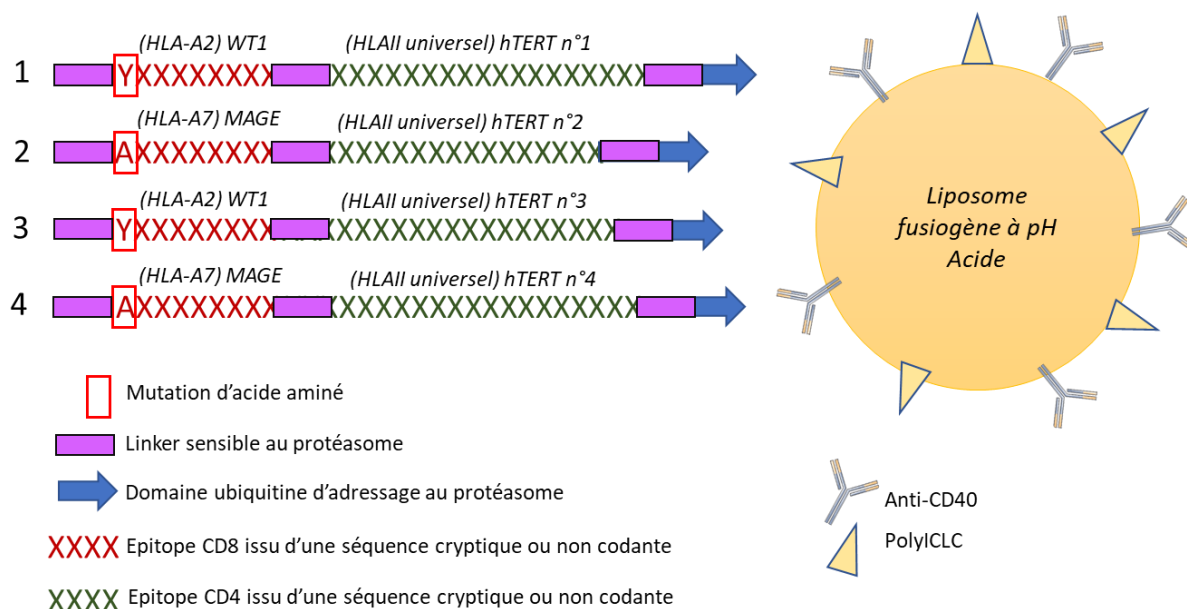


Figure 29 : Le vaccin peptidique antitumoral « idéal ». Figure originale
 (anticorps : smart.servier.com)

Les anticorps CD40 auraient ici un double rôle : provoquer l'internalisation du peptide au niveau des endosomes (cf.3.3.3.1) et stimuler l'immunité innée en synergie avec le polyICLC (cf.3.3.2.3).

L'adressage par anti-CD40 de l'ovalbumine se fait aux endosomes précoces, mais cela n'a pas encore été démontré pour un système particulaire tel que celui-ci. Avec un liposome fusiogène cela importe peu, car l'acidification des endosomes, qu'elle soit rapide ou plus lente, va *in fine* provoquer la fusion entre les membranes liposomales et endosomales et le relargage du contenu vaccinal dans le cytoplasme cellulaire. De là, cette construction peptidique permettra en théorie un adressage au protéasome associé à la génération favorisée des épitopes vaccinaux. Les épitopes CD8 pourront ensuite regagner soit le RE soit l'endosome-phagosome pour être cross-présentés sur le CMHI (cf.1.2.2.3.2), et les épitopes CD4 les endosome-phagosome pour une présentation classique (cf.1.2.2.1).

A la manière du vaccin NeoVax® et de d'autres stratégies vaccinales, chacune de ces constructions serait administrée à un site différent, sans rotation lors des différents rappels. Cela permet ainsi de prévenir une éventuelle compétition épitopique, bien que plusieurs études aient démontré que l'impact du mode d'administration sur la réponse immune était moindre (cf.3.4.2).

Pour l'heure, la vaccination peptidique antitumorale n'a toujours pas montré de bénéfices thérapeutiques en essai clinique de phase III. Pour autant, cela fait à peine 20 ans que la recherche en vaccination antitumorale a débuté, et déjà l'amélioration continue des mécanismes immunologiques vaccinaux a permis le développement de multiples constructions peptidiques optimisées dont certaines sont en phase III. Comparé à la durée moyenne de développement d'un médicament, qui peut s'étirer sur plusieurs dizaines d'années avant commercialisation, on peut s'attendre à ce que le bénéfice clinique de la vaccination thérapeutique soit d'avantage mis en lumière d'ici une dizaine d'années, comme le laisse espérer les résultats des essais de phases précoces présentés dans cette thèse.

Comme mentionné en début de partie 3, les échecs de développement cliniques peuvent être influencés par le fait que les échantillons de patients choisis sont généralement peu immunocompétents (malgré l'utilisation de « tests compagnons » lors de leur inclusion) avec un cancer de stade très avancé. L'impact du choix des biomarqueurs est également à ne pas négliger. De nouveaux biomarqueurs de réponse émergent tels que le statut d'expression d'EGFR (Gainor et al., 2016), le ratio de lymphocytes intra et péri tumoraux (Vasaturo et al., 2016), et l'utilisation du critère RECIST des traitements conventionnels au lieu du critère de réponse immun (Hodi et al., 2016).

La compréhension des effets immunomodulateurs engendrés par les traitements conventionnels et leur cinétique permettra d'établir des combinaisons et schéma thérapeutiques pertinents à l'induction d'une immunité antitumorale. L'étude de telles combinaisons sera compliquée mais s'avère nécessaire, car on sait aujourd'hui que la vaccination antitumorale seule n'est pas suffisante pour induire une régression tumorale complète en monothérapie. En revanche, son utilisation en tant que thérapie consolidante dans la prévention des rechutes post chirurgie ou chimio/radiothérapie semble tout indiquée. De plus, d'après les résultats de l'essai sur Neovax® (cf. Partie 3.5.2), la combinaison ICI/vaccin semble particulièrement pertinente.

En effet, le but d'un vaccin thérapeutique est d'induire une immunité antitumorale, mais celle-ci se retrouve inefficace si l'immunosuppression du microenvironnement tumoral n'est pas levée, et/ou si le système immunitaire n'est pas désinhibé (surtout chez les patients immunodéficients).

D'autres combinaisons de traitements visant à potentialiser l'action du vaccin sont envisageables, notamment avec la radiothérapie (Sharabi et al., 2015) ou les virus oncolytiques (Cf. mécanisme d'action de T-VEC® , Partie 2.2.3) qui favorisent la mort immunogénique des cellules cancéreuses, ou encore des inhibiteurs de MEK ou EGFR, qui augmentent l'expression du CMH par les cellules tumorales (Angell et al., 2014; Kumai et al., 2013).

En conclusion, la vaccination peptidique antitumorale n'est pour l'instant qu'au stade de développement, mais l'évolution des constructions vaccinales et les récents résultats cliniques prometteurs laissent espérer qu'elle fasse un jour partie intégrante de la lutte contre le cancer.

Références

Abdel-Aal, A.-B.M., Lakshminarayanan, V., Thompson, P., Supekar, N., Bradley, J.M., Wolfert, M.A., Cohen, P.A., Gendler, S.J., and Boons, G.-J. (2014). Immune and anticancer responses elicited by fully synthetic aberrantly glycosylated MUC1 tripartite vaccines modified by a TLR2 or TLR9 agonist. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 15, 1508–1513.

Adams, S., and Humphreys, R.E. (1995). Invariant chain peptides enhancing or inhibiting the presentation of antigenic peptides by major histocompatibility complex class II molecules. *Eur. J. Immunol.* 25, 1693–1702.

Adams, S., O'Neill, D.W., Nonaka, D., Hardin, E., Chiriboga, L., Siu, K., Cruz, C.M., Angiulli, A., Angiulli, F., Ritter, E., et al. (2008). Immunization of malignant melanoma patients with full-length NY-ESO-1 protein using TLR7 agonist imiquimod as vaccine adjuvant. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 776–784.

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

Allegra, A., Alonci, A., Penna, G., Innaro, V., Gerace, D., Rotondo, F., and Musolino, C. (2014). The cancer stem cell hypothesis: a guide to potential molecular targets. *Cancer Invest.* 32, 470–495.

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

Angell, T.E., Lechner, M.G., Jang, J.K., LoPresti, J.S., and Epstein, A.L. (2014). MHC class I loss is a frequent mechanism of immune escape in papillary thyroid cancer that is reversed by interferon and selumetinib treatment in vitro. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 20, 6034–6044.

Anwer, F., Shaukat, A.-A., Zahid, U., Husnain, M., McBride, A., Persky, D., Lim, M., Hasan, N., and Riaz, I.B. (2017). Donor origin CAR T cells: graft versus malignancy effect without GVHD, a systematic review. *Immunotherapy* 9, 123–130.

Atkins, M.B., Lotze, M.T., Dutcher, J.P., Fisher, R.I., Weiss, G., Margolin, K., Abrams, J., Sznol, M., Parkinson, D., Hawkins, M., et al. (1999). High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 17, 2105–2116.

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

Baker, K., Rath, T., Flak, M.B., Arthur, J.C., Chen, Z., Glickman, J.N., Zlobec, I., Karamitopoulou, E., Stachler, M.D., Odze, R.D., et al. (2013). Neonatal Fc receptor expression in dendritic cells mediates protective immunity against colorectal cancer. *Immunity* 39, 1095–1107.

Barve, M., Bender, J., Senzer, N., Cunningham, C., Greco, F.A., McCune, D., Steis, R., Khong, H., Richards, D., Stephenson, J., et al. (2008). Induction of immune responses and clinical efficacy in a phase II trial of IDM-2101, a 10-epitope cytotoxic T-lymphocyte vaccine, in metastatic non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 4418–4425.

Basha, G., Omilusik, K., Chavez-Steenbock, A., Reinicke, A.T., Lack, N., Choi, K.B., and Jefferies, W.A. (2012). A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway. *Nat. Immunol.* **13**, 237–245.

Baumgaertner, P., Costa Nunes, C., Cachot, A., Maby-El Hajjami, H., Cagnon, L., Braun, M., Derré, L., Rivals, J.-P., Rimoldi, D., Gnjatich, S., et al. (2016). Vaccination of stage III/IV melanoma patients with long NY-ESO-1 peptide and CpG-B elicits robust CD8+ and CD4+ T-cell responses with multiple specificities including a novel DR7-restricted epitope. *Oncoimmunology* **5**, e1216290.

Baxby, D. (1999). Edward Jenner's Inquiry after 200 years. *BMJ* **318**, 390.

Bellone, M., Calcinotto, A., Filipazzi, P., De Milito, A., Fais, S., and Rivoltini, L. (2013). The acidity of the tumor microenvironment is a mechanism of immune escape that can be overcome by proton pump inhibitors. *Oncoimmunology* **2**.

Benchetrit, F., Gazagne, A., Adotevi, O., Haicheur, N., Godard, B., Badoual, C., Fridman, W.H., and Tartour, E. (2003). [Cytotoxic T lymphocytes: role in immunosurveillance and in immunotherapy]. *Bull. Cancer (Paris)* **90**, 677–685.

Bhatia, A., and Kumar, Y. (2014). Cellular and molecular mechanisms in cancer immune escape: a comprehensive review. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **10**, 41–62.

Bijker, M.S., van den Eeden, S.J.F., Franken, K.L., Melief, C.J.M., van der Burg, S.H., and Offringa, R. (2008). Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* **38**, 1033–1042.

Blanc, C., Granier, C., and Tartour, É. (2017). Vaccination antitumorale. *Innov. Thérapeutiques En Oncol.* **3**, 149–157.

Blum, J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 443–473.

Bonaccorsi, I., Morandi, B., Antsiferova, O., Costa, G., Oliveri, D., Conte, R., Pezzino, G., Vermiglio, G., Anastasi, G.P., Navarra, G., et al. (2014). Membrane transfer from tumor cells overcomes deficient phagocytic ability of plasmacytoid dendritic cells for the acquisition and presentation of tumor antigens. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**, 824–832.

Boross, P., Montfoort, N. van, Stapels, D.A.C., Poel, C.E. van der, Bertens, C., Meeldijk, J., Jansen, J.H.M., Verbeek, J.S., Ossendorp, F., Wubbolts, R., et al. (2014). FcRγ-Chain ITAM Signaling Is Critically Required for Cross-Presentation of Soluble Antibody–Antigen Complexes by Dendritic Cells. *J. Immunol.* **193**, 5506–5514.

Borrelli, A., Tornesello, A.L., Tornesello, M.L., and Buonaguro, F.M. (2018). Cell Penetrating Peptides as Molecular Carriers for Anti-Cancer Agents. *Mol. Basel Switz.* **23**.

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

Bridle, B.W., Nguyen, A., Salem, O., Zhang, L., Koshy, S., Clouthier, D., Chen, L., Pol, J., Swift, S.L., Bowdish, D.M.E., et al. (2016). Privileged Antigen Presentation in Splenic B Cell Follicles Maximizes T Cell Responses in Prime-Boost Vaccination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **196**, 4587–4595.

- Brinckerhoff, L.H., Kalashnikov, V.V., Thompson, L.W., Yamshchikov, G.V., Pierce, R.A., Galavotti, H.S., Engelhard, V.H., and Slingluff, C.L. (1999). Terminal modifications inhibit proteolytic degradation of an immunogenic MART-1(27-35) peptide: implications for peptide vaccines. *Int. J. Cancer* 83, 326–334.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643–1647.
- Burgdorf, S., and Kurts, C. (2008). Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 89–95.
- Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* 13, 1–27.
- Campbell, D.J., and Butcher, E.C. (2002). Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J. Exp. Med.* 195, 135–141.
- Carmenate, T., Pacios, A., Enamorado, M., Moreno, E., Garcia-Martínez, K., Fuente, D., and León, K. (2013). Human IL-2 Mutein with Higher Antitumor Efficacy Than Wild Type IL-2. *J. Immunol.* 190, 6230–6238.
- Cebrian, I., Visentin, G., Blanchard, N., Jouve, M., Bobard, A., Moita, C., Enninga, J., Moita, L.F., Amigorena, S., and Savina, A. (2011). Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 147, 1355–1368.
- Chamuleau, M.E.D., Souwer, Y., Van Ham, S.M., Zevenbergen, A., Westers, T.M., Berkhof, J., Meijer, C.J.L.M., van de Loosdrecht, A.A., and Ossenkoppele, G.J. (2004). Class II-associated invariant chain peptide expression on myeloid leukemic blasts predicts poor clinical outcome. *Cancer Res.* 64, 5546–5550.
- Charpentier, M., Croyal, M., Carbonnelle, D., Fortun, A., Florenceau, L., Rabu, C., Krempf, M., Labarrière, N., and Lang, F. (2016). IRES-dependent translation of the long non coding RNA meloe in melanoma cells produces the most immunogenic MELOE antigens. *Oncotarget* 7, 59704–59713.
- Cheever, M.A., Allison, J.P., Ferris, A.S., Finn, O.J., Hastings, B.M., Hecht, T.T., Mellman, I., Prindiville, S.A., Viner, J.L., Weiner, L.M., et al. (2009). The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 5323–5337.
- Cho, H.-I., and Celis, E. (2009). Optimized Peptide Vaccines Eliciting Extensive CD8 T Cell Responses with Therapeutic Anti-Tumor Effects. *Cancer Res.* 69, 9012–9019.
- Cho, H.-I., Barrios, K., Lee, Y.-R., Linowski, A.K., and Celis, E. (2013). BiVax: a peptide/poly-IC subunit vaccine that mimics an acute infection elicits vast and effective anti-tumor CD8 T-cell responses. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 62, 787–799.
- Choi, B.D., Archer, G.E., Mitchell, D.A., Heimberger, A.B., McLendon, R.E., Bigner, D.D., and Sampson, J.H. (2009). EGFRvIII-Targeted Vaccination Therapy of Malignant Glioma. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 19, 713–723.
- Chou, C.-L., Mirshahidi, S., Su, K.W., Kim, A., Narayan, K., Khoruzhenko, S., Xu, M., and Sadegh-Nasseri, S. (2008). Short peptide sequences mimic HLA-DM functions. *Mol. Immunol.* 45, 1935–1943.

Cibotti, R., Kanellopoulos, J.M., Cabaniols, J.P., Halle-Panenko, O., Kosmatopoulos, K., Sercarz, E., and Kourilsky, P. (1992). Tolerance to a self-protein involves its immunodominant but does not involve its subdominant determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 416–420.

Clementi, R., Locatelli, F., Dupré, L., Garaventa, A., Emmi, L., Bregni, M., Cefalo, G., Moretta, A., Danesino, C., Comis, M., et al. (2005). A proportion of patients with lymphoma may harbor mutations of the perforin gene. *Blood* *105*, 4424–4428.

Cohn, L., Chatterjee, B., Esselborn, F., Smed-Sørensen, A., Nakamura, N., Chalouni, C., Lee, B.-C., Vandlen, R., Keler, T., Lauer, P., et al. (2013). Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3+ dendritic cells at cross presentation. *J. Exp. Med.* *210*, 1049–1063.

Corrales, L., Woo, S.-R., and Gajewski, T.F. (2013). Extremely potent immunotherapeutic activity of a STING agonist in the B16 melanoma model in vivo. *J. Immunother. Cancer* *1*, O15.

Cox, A.L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R.A., Darrow, T.L., Shabanowitz, J., Engelhard, V.H., Hunt, D.F., and Slingluff, C.L. (1994). Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* *264*, 716–719.

Cuburu, N., Kweon, M.-N., Hervouet, C., Cha, H.-R., Pang, Y.-Y.S., Holmgren, J., Stadler, K., Schiller, J.T., Anjuère, F., and Czerkinsky, C. (2009). Sublingual immunization with nonreplicating antigens induces antibody-forming cells and cytotoxic T cells in the female genital tract mucosa and protects against genital papillomavirus infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 7851–7859.

Depil, S., Moral??s, O., Castelli, F.A., Delhem, N., Fran??ois, V., Georges, B., Dufoss??, F., Morschhauser, F., Hammer, J., Mail??re, B., et al. (2007). Determination of a HLA II Promiscuous Peptide Cocktail as Potential Vaccine Against EBV Latency II Malignancies: *J. Immunother.* *30*, 215–226.

Dhainaut, M., and Moser, M. (2014). Regulation of immune reactivity by intercellular transfer. *Front. Immunol.* *5*, 112.

Di Pasquale, A., Preiss, S., Tavares Da Silva, F., and Garçon, N. (2015). Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines* *3*, 320–343.

Disis, M.L., Grabstein, K.H., Sleath, P.R., and Cheever, M.A. (1999). Generation of Immunity to the HER-2/neu Oncogenic Protein in Patients with Breast and Ovarian Cancer Using a Peptide-based Vaccine. *Clin. Cancer Res.* *5*, 1289–1297.

Dolan, B.P., Gibbs, K.D., and Ostrand-Rosenberg, S. (2006). Tumor-specific CD4+ T cells are activated by “cross-dressed” dendritic cells presenting peptide-MHC class II complexes acquired from cell-based cancer vaccines. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 1447–1455.

Domingos-Pereira, S., Decrausaz, L., Derré, L., Bobst, M., Romero, P., Schiller, J.T., Jichlinski, P., and Nardelli-Haeffliger, D. (2013). Intravaginal TLR agonists increase local vaccine-specific CD8 T cells and human papillomavirus-associated genital-tumor regression in mice. *Mucosal Immunol.* *6*, 393–404.

Domingos-Pereira, S., Derré, L., Warpelin-Decrausaz, L., Haeffliger, J.-A., Romero, P., Jichlinski, P., and Nardelli-Haeffliger, D. (2014). Intravaginal and subcutaneous immunization induced vaccine specific CD8 T cells and tumor regression in the bladder. *J. Urol.* *191*, 814–822.

- Dosset, M., Godet, Y., Vauchy, C., Beziaud, L., Lone, Y.C., Sedlik, C., Liard, C., Levionnois, E., Clerc, B., Sandoval, F., et al. (2012). Universal Cancer Peptide-Based Therapeutic Vaccine Breaks Tolerance against Telomerase and Eradicates Established Tumor. *Clin. Cancer Res.* 18, 6284–6295.
- Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., and Mulligan, R.C. (1993). Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 3539–3543.
- Dudda, J.C., Simon, J.C., and Martin, S. (2004). Dendritic cell immunization route determines CD8+ T cell trafficking to inflamed skin: role for tissue microenvironment and dendritic cells in establishment of T cell-homing subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 857–863.
- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* 21, 137–148.
- Eugenín, E.A., Brañes, M.C., Berman, J.W., and Sáez, J.C. (2003). TNF- α Plus IFN- γ Induce Connexin43 Expression and Formation of Gap Junctions Between Human Monocytes/Macrophages That Enhance Physiological Responses. *J. Immunol.* 170, 1320–1328.
- Farnsworth, R.H., Lackmann, M., Achen, M.G., and Stacker, S.A. (2014). Vascular remodeling in cancer. *Oncogene* 33, 3496–3505.
- Fehres, C.M., Bruijns, S.C.M., van Beelen, A.J., Kalay, H., Ambrosini, M., Hooijberg, E., Unger, W.W.J., de Gruijl, T.D., and van Kooyk, Y. (2014). Topical rather than intradermal application of the TLR7 ligand imiquimod leads to human dermal dendritic cell maturation and CD8+ T-cell cross-priming. *Eur. J. Immunol.* 44, 2415–2424.
- Feltkamp, M.C., Smits, H.L., Vierboom, M.P., Minnaar, R.P., de Jongh, B.M., Drijfhout, J.W., ter Schegget, J., Melief, C.J., and Kast, W.M. (1993). Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur. J. Immunol.* 23, 2242–2249.
- Fenoglio, D., Traverso, P., Parodi, A., Tomasello, L., Negrini, S., Kalli, F., Battaglia, F., Ferrera, F., Sciallero, S., Murdaca, G., et al. (2013). A multi-peptide, dual-adjuvant telomerase vaccine (GX301) is highly immunogenic in patients with prostate and renal cancer. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 62, 1041–1052.
- Fenoglio, D., Parodi, A., Lavieri, R., Kalli, F., Ferrera, F., Tagliamacco, A., Guastalla, A., Lamperti, M.G., Giacomini, M., and Filaci, G. (2015). Immunogenicity of GX301 cancer vaccine: Four (telomerase peptides) are better than one. *Hum. Vaccines Immunother.* 11, 838–850.
- Fenstermaker, R.A., Ciesielski, M.J., Qiu, J., Yang, N., Frank, C.L., Lee, K.P., Mechtler, L.R., Belal, A., Ahluwalia, M.S., and Hutson, A.D. (2016). Clinical study of a survivin long peptide vaccine (SurVaxM) in patients with recurrent malignant glioma. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 65, 1339–1352.
- Fu, J., Kanne, D.B., Leong, M., Glickman, L.H., McWhirter, S.M., Lemmens, E., Mechette, K., Leong, J.J., Lauer, P., Liu, W., et al. (2015). STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1 blockade. *Sci. Transl. Med.* 7, 283ra52.
- Gainor, J.F., Shaw, A.T., Sequist, L.V., Fu, X., Azzoli, C.G., Piotrowska, Z., Huynh, T.G., Zhao, L., Fulton, L., Schultz, K.R., et al. (2016). EGFR Mutations and ALK Rearrangements Are Associated with Low

Response Rates to PD-1 Pathway Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer: A Retrospective Analysis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 4585–4593.

Galaine, J., Godet, Y., and Adotévi, O. (2016). Pour comprendre : l'activation lymphocytaire T. *Bull. Cancer (Paris)* 103, S127–S131.

Gallou, C., Rougeot, A., Graff-Dubois, S., Kosmatopoulos, K., and Menez-Jamet, J. (2016). A general strategy to optimize immunogenicity of HLA-B*0702 restricted cryptic peptides from tumor associated antigens: Design of universal neo-antigen like tumor vaccines for HLA-B*0702 positive patients. *Oncotarget* 7, 59417–59428.

Garçon, N., Chomez, P., and Van Mechelen, M. (2007). GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert Rev. Vaccines* 6, 723–739.

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

Gates, J.D., Clifton, G.T., Benavides, L.C., Sears, A.K., Carmichael, M.G., Hueman, M.T., Holmes, J.P., Jama, Y.H., Mursal, M., Zacharia, A., et al. (2010). Circulating regulatory T cells (CD4+CD25+FOXP3+) decrease in breast cancer patients after vaccination with a modified MHC class II HER2/neu (AE37) peptide. *Vaccine* 28, 7476–7482.

Gebhardt, T., Palendira, U., Tschärke, D.C., and Bedoui, S. (2018). Tissue-resident memory T cells in tissue homeostasis, persistent infection, and cancer surveillance. *Immunol. Rev.* 283, 54–76.

Gendler, S.J. (2001). MUC1, the renaissance molecule. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 6, 339–353.

Georgoulas, V., Douillard, J.-Y., Khayat, D., Manegold, C., Rosell, R., Rossi, A., Menez-Jamet, J., Iché, M., Kosmatopoulos, K., and Gridelli, C. (2013). A multicenter randomized phase IIb efficacy study of Vx-001, a peptide-based cancer vaccine as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: treatment rationale and protocol dynamics. *Clin. Lung Cancer* 14, 461–465.

Gerner, M.Y., Casey, K.A., Kastenmuller, W., and Germain, R.N. (2017). Dendritic cell and antigen dispersal landscapes regulate T cell immunity. *J. Exp. Med.* jem.20170335.

Ghanem, E., Fritzsche, S., Al-Balushi, M., Hashem, J., Ghuneim, L., Thomer, L., Kalbacher, H., van Endert, P., Wiertz, E., Tampé, R., et al. (2010). The transporter associated with antigen processing (TAP) is active in a post-ER compartment. *J. Cell Sci.* 123, 4271–4279.

Glaffig, M., Palitzsch, B., Hartmann, S., Schüll, C., Nuhn, L., Gerlitzki, B., Schmitt, E., Frey, H., and Kunz, H. (2014). A fully synthetic glycopeptide antitumor vaccine based on multiple antigen presentation on a hyperbranched polymer. *Chem. Wein. Bergstr. Ger.* 20, 4232–4236.

Godet, Y., Fabre, E., Dosset, M., Lamuraglia, M., Levionnois, E., Ravel, P., Benhamouda, N., Cazes, A., Le Pimpec-Barthes, F., Gaugler, B., et al. (2012). Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T-cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes: potential synergistic effect with chemotherapy response. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 2943–2953.

Goldberg, M.V., and Drake, C.G. (2011). LAG-3 in Cancer Immunotherapy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 344, 269–278.

- Grau, M., Walker, P.R., and Derouazi, M. (2018). Mechanistic insights into the efficacy of cell penetrating peptide-based cancer vaccines. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*.
- Gross, S., Rahal, R., Stransky, N., Lengauer, C., and Hoeflich, K.P. (2015). Targeting cancer with kinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* *125*, 1780–1789.
- Guan, H.H., Budzynski, W., Koganty, R.R., Krantz, M.J., Reddish, M.A., Rogers, J.A., Longenecker, B.M., and Samuel, J. (1998). Liposomal formulations of synthetic MUC1 peptides: effects of encapsulation versus surface display of peptides on immune responses. *Bioconjug. Chem.* *9*, 451–458.
- Gulley, J.L., Madan, R.A., Pachynski, R., Mulders, P., Sheikh, N.A., Trager, J., and Drake, C.G. (2017). Role of Antigen Spread and Distinctive Characteristics of Immunotherapy in Cancer Treatment. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *109*.
- Hage, F.E., Abouzahr-Rifai, S., Meslin, F., Mami-Chouaib, F., and Chouaib, S. (2008). Réponse immune et cancer. *Bull. Cancer (Paris)* *95*, 57–67.
- Hailemichael, Y., and Overwijk, W.W. (2013). Peptide-based anticancer vaccines: The making and unmaking of a T-cell graveyard. *Oncoimmunology* *2*, e24743.
- Hailemichael, Y., Dai, Z., Jaffarad, N., Ye, Y., Medina, M.A., Huang, X.-F., Dorta-Estremera, S.M., Greeley, N.R., Nitti, G., Peng, W., et al. (2013). Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific CD8⁺ T cell sequestration, dysfunction and deletion. *Nat. Med.* *19*, 465–472.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011a). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011b). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Harper, D.M. (2009). Current prophylactic HPV vaccines and gynecologic premalignancies. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* *21*, 457–464.
- Hartgerink, J.D., Beniash, E., and Stupp, S.I. (2001). Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science* *294*, 1684–1688.
- Hazama, S., Nakamura, Y., Takenouchi, H., Suzuki, N., Tsunedomi, R., Inoue, Y., Tokuhisa, Y., Iizuka, N., Yoshino, S., Takeda, K., et al. (2014). A phase I study of combination vaccine treatment of five therapeutic epitope-peptides for metastatic colorectal cancer; safety, immunological response, and clinical outcome. *J. Transl. Med.* *12*, 63.
- Helft, J., Jacquet, A., Joncker, N.T., Grandjean, I., Dorothée, G., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Matzinger, P., and Lantz, O. (2008). Antigen-specific T-T interactions regulate CD4 T-cell expansion. *Blood* *112*, 1249–1258.
- Hervouet, C., Luci, C., Bekri, S., Juhel, T., Bihl, F., Braud, V.M., Czerkinsky, C., and Anjuère, F. (2014). Antigen-bearing dendritic cells from the sublingual mucosa recirculate to distant systemic lymphoid organs to prime mucosal CD8 T cells. *Mucosal Immunol.* *7*, 280–291.

- Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097–1100.
- Höchst, B., Schildberg, F.A., Böttcher, J., Metzger, C., Huss, S., Türlér, A., Overhaus, M., Knoblich, A., Schneider, B., Pantelis, D., et al. (2012). Liver sinusoidal endothelial cells contribute to CD8 T cell tolerance toward circulating carcinoembryonic antigen in mice. *Hepatology* 56, 1924–1933.
- 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.
- Hodi, F.S., Hwu, W.-J., Kefford, R., Weber, J.S., Daud, A., Hamid, O., Patnaik, A., Ribas, A., Robert, C., Gangadhar, T.C., et al. (2016). Evaluation of Immune-Related Response Criteria and RECIST v1.1 in Patients With Advanced Melanoma Treated With Pembrolizumab. *J. Clin. Oncol.* 34, 1510–1517.
- Hoeller, C., Michielin, O., Ascierto, P.A., Szabo, Z., and Blank, C.U. (2016). Systematic review of the use of granulocyte–macrophage colony-stimulating factor in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 65, 1015–1034.
- Hofmann, L., Forschner, A., Loquai, C., Goldinger, S.M., Zimmer, L., Ugurel, S., Schmidgen, M.I., Gutzmer, R., Utikal, J.S., Göppner, D., et al. (2016). Cutaneous, gastrointestinal, hepatic, endocrine, and renal side-effects of anti-PD-1 therapy. *Eur. J. Cancer* 190.
- Hollingsworth, M.A., and Swanson, B.J. (2004). Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat. Rev. Cancer* 4, 45–60.
- Hugues, S., Boissonnas, A., Amigorena, S., and Fetler, L. (2006). The dynamics of dendritic cell-T cell interactions in priming and tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 491–495.
- Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., and Nakachi, K. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet Lond. Engl.* 356, 1795–1799.
- Inderberg-Suso, E.-M., Trachsel, S., Lislérud, K., Rasmussen, A.-M., and Gaudernack, G. (2012). Widespread CD4+ T-cell reactivity to novel hTERT epitopes following vaccination of cancer patients with a single hTERT peptide GV1001. *Oncoimmunology* 1, 670–686.
- Ishioka, G.Y., Disis, M.L., Morse, M.A., Cunningham, C.C., Lenz, H.-J., Figlin, R.A., Chesnut, R.W., and Fikes, J. (2004). A phase I trial of a multi-epitope cancer vaccine (EP-2101) in non-small cell lung (NSCLC) and colon cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 22, 2525–2525.
- Ito, A., Kondo, S., Tada, K., and Kitano, S. (2015). Clinical Development of Immune Checkpoint Inhibitors. *BioMed Res. Int.* 2015, 605478.
- Jamal-Hanjani, M., Quezada, S.A., Larkin, J., and Swanton, C. (2015). Translational implications of tumor heterogeneity. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 21, 1258–1266.
- Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 557–569.

- Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Wurbel, M.-A., Malissen, B., Márquez, G., and Agace, W. (2003). Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant. *J. Exp. Med.* *198*, 963–969.
- Kalli, K.R., Block, M.S., Kasi, P.M., Erskine, C.L., Hobday, T.J., Dietz, A., Padley, D., Gustafson, M.P., Shreeder, B., Puglisi-Knutson, D., et al. (2018). Folate Receptor Alpha Peptide Vaccine generates immunity in Breast and Ovarian Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* clincanres.2499.2017.
- Kamada, N., and Núñez, G. (2014). Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria. *Gastroenterology* *146*, 1477–1488.
- Kenter, G.G., Welters, M.J.P., Valentijn, A.R.P.M., Lowik, M.J.G., Berends-van der Meer, D.M.A., Vloon, A.P.G., Drijfhout, J.W., Wafelman, A.R., Oostendorp, J., Fleuren, G.J., et al. (2008). Phase I immunotherapeutic trial with long peptides spanning the E6 and E7 sequences of high-risk human papillomavirus 16 in end-stage cervical cancer patients shows low toxicity and robust immunogenicity. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 169–177.
- Kenter, G.G., Welters, M.J.P., Valentijn, A.R.P.M., Lowik, M.J.G., Berends-van der Meer, D.M.A., Vloon, A.P.G., Essahsah, F., Fathers, L.M., Offringa, R., Drijfhout, J.W., et al. (2009). Vaccination against HPV-16 Oncoproteins for Vulvar Intraepithelial Neoplasia. *N. Engl. J. Med.* *361*, 1838–1847.
- Khan, A.S., Broderick, K.E., and Sardesai, N.Y. (2014). Clinical development of intramuscular electroporation: providing a “boost” for DNA vaccines. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1121*, 279–289.
- Khong, H., and Overwijk, W.W. (2016). Adjuvants for peptide-based cancer vaccines. *J. Immunother. Cancer* *4*.
- Kim, S., Kim, H.S., Kim, E., Lee, M.G., Shin, E., Paik, S., and Kim, S. (2018). Neopepsee: accurate genome-level prediction of neoantigens by harnessing sequence and amino acid immunogenicity information. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*
- Kirkwood, J.M., Lee, S., Moschos, S.J., Albertini, M.R., Michalak, J.C., Sander, C., Whiteside, T., Butterfield, L.H., and Weiner, L. (2009). Immunogenicity and antitumor effects of vaccination with peptide vaccine+/-granulocyte-monocyte colony-stimulating factor and/or IFN- α 2b in advanced metastatic melanoma: Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Trial E1696. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 1443–1451.
- Klabusay, M. (2015). [The Role of Regulatory T-cells in Antitumor Immune Response]. *Klin. Onkol. Cas. Ceske Slov. Onkol. Spolecnosti* *28 Suppl 4*, 4S23-27.
- Kleindienst, P., and Brocker, T. (2003). Endogenous dendritic cells are required for amplification of T cell responses induced by dendritic cell vaccines in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 2817–2823.
- Kobayashi, N. (1985). Malignant neoplasms in registered cases of primary immunodeficiency syndrome. *Jpn. J. Clin. Oncol.* *15 Suppl 1*, 307–312.
- Kobayashi, K.S., and Elsen, P.J. van den (2012). NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 813–820.
- Korangy, F., Ormandy, L.A., Bleck, J.S., Klemmner, J., Wilkens, L., Manns, M.P., and Greten, T.F. (2004). Spontaneous tumor-specific humoral and cellular immune responses to NY-ESO-1 in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *10*, 4332–4341.

- Kotsakis, A., Papadimitraki, E., Vetsika, E.K., Aggouraki, D., Dermitzaki, E.K., Hatzidaki, D., Kentepozidis, N., Mavroudis, D., and Georgoulas, V. (2014). A phase II trial evaluating the clinical and immunologic response of HLA-A2(+) non-small cell lung cancer patients vaccinated with an hTERT cryptic peptide. *Lung Cancer Amst. Neth.* *86*, 59–66.
- Koury, J., Lucero, M., Cato, C., Chang, L., Geiger, J., Henry, D., Hernandez, J., Hung, F., Kaur, P., Teskey, G., et al. (2018). Immunotherapies: Exploiting the Immune System for Cancer Treatment. *J. Immunol. Res.* *2018*.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., and Zitvogel, L. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 51–72.
- Krug, L.M., Dao, T., Brown, A.B., Maslak, P., Travis, W., Bekele, S., Korontsvit, T., Zakhaleva, V., Wolchok, J., Yuan, J., et al. (2010). WT1 PEPTIDE VACCINATIONS INDUCE CD4 AND CD8 T CELL IMMUNE RESPONSES IN PATIENTS WITH MESOTHELIOMA AND NON-SMALL CELL LUNG CANCER. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *59*, 1467–1479.
- Kuball, J., de Boer, K., Wagner, E., Wattad, M., Antunes, E., Weeratna, R.D., Vicari, A.P., Lotz, C., van Dorp, S., Hol, S., et al. (2011). Pitfalls of vaccinations with WT1-, Proteinase3- and MUC1-derived peptides in combination with MontanideISA51 and CpG7909. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *60*, 161–171.
- Kumai, T., Matsuda, Y., Oikawa, K., Aoki, N., Kimura, S., Harabuchi, Y., Celis, E., and Kobayashi, H. (2013). EGFR inhibitors augment antitumour helper T-cell responses of HER family-specific immunotherapy. *Br. J. Cancer* *109*, 2155–2166.
- Kumai, T., Kobayashi, H., Harabuchi, Y., and Celis, E. (2017). Peptide vaccines in cancer - old concept revisited. *Curr. Opin. Immunol.* *45*, 1–7.
- Kumar, V., and Gabrilovich, D.I. (2014). Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment. *Immunology* *143*, 512–519.
- Kumar, S., Kesharwani, S.S., Kuppast, B., Bakkari, M.A., and Tummala, H. (2017). Pathogen-mimicking vaccine delivery system designed with a bioactive polymer (inulin acetate) for robust humoral and cellular immune responses. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *261*, 263–274.
- Lai, C., Duan, S., Ye, F., Hou, X., Li, X., Zhao, J., Yu, X., Hu, Z., Tang, Z., Mo, F., et al. (2018). The enhanced antitumor-specific immune response with mannose- and CpG-ODN-coated liposomes delivering TRP2 peptide. *Theranostics* *8*, 1723–1739.
- Lattanzi, L., Rozera, C., Marescotti, D., D'Agostino, G., Santodonato, L., Cellini, S., Belardelli, F., Gavioli, R., and Ferrantini, M. (2011). IFN- α boosts epitope cross-presentation by dendritic cells via modulation of proteasome activity. *Immunobiology* *216*, 537–547.
- Laumont, C.M., Daouda, T., Laverdure, J.-P., Bonneil, É., Caron-Lizotte, O., Hardy, M.-P., Granados, D.P., Durette, C., Lemieux, S., Thibault, P., et al. (2016). Global proteogenomic analysis of human MHC class I-associated peptides derived from non-canonical reading frames. *Nat. Commun.* *7*, 10238.
- Leucci, E. (2018). Cancer development and therapy resistance: spotlights on the dark side of the genome. *Pharmacol. Ther.*
- Li, L., and Li, W. (2015). Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. *Pharmacol. Ther.* *150*, 33–46.

- Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., and Cao, X. (2009). Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 240–249.
- Li, J., Li, H., Liu, J., Feng, B., Feng, M., Lv, B., Cheng, S., and Yang, X. (2016). The Clinical Implications of Human Telomerase Reverse Transcriptase Expression in Grade and Prognosis of Gliomas: a Systematic Review and Meta-analysis. *Mol. Neurobiol.* **53**, 2887–2893.
- Li, L., Kim, S., Herndon, J.M., Goedegebuure, P., Belt, B.A., Satpathy, A.T., Fleming, T.P., Hansen, T.H., Murphy, K.M., and Gillanders, W.E. (2012). Cross-dressed CD8 α ⁺/CD103⁺ dendritic cells prime CD8⁺ T cells following vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 12716–12721.
- Liberti, M.V., and Locasale, J.W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* **41**, 211–218.
- Linch, S.N., McNamara, M.J., and Redmond, W.L. (2015). OX40 Agonists and Combination Immunotherapy: Putting the Pedal to the Metal. *Front. Oncol.* **5**.
- Love, W.E., Bernhard, J.D., and Bordeaux, J.S. (2009). Topical imiquimod or fluorouracil therapy for basal and squamous cell carcinoma: a systematic review. *Arch. Dermatol.* **145**, 1431–1438.
- Lu, J., Higashimoto, Y., Appella, E., and Celis, E. (2004). Multiepitope Trojan antigen peptide vaccines for the induction of antitumor CTL and Th immune responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**, 4575–4582.
- Machiels, J.-P., van Baren, N., and Marchand, M. (2002). Peptide-based cancer vaccines. *Semin. Oncol.* **29**, 494–502.
- Mamessier, E., Sylvain, A., Thibult, M.-L., Houvenaeghel, G., Jacquemier, J., Castellano, R., Gonçalves, A., André, P., Romagné, F., Thibault, G., et al. (2011). Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J. Clin. Invest.* **121**, 3609–3622.
- Mandelboim, O., Vadai, E., Fridkin, M., Katz-Hillel, A., Feldman, M., Berke, G., and Eisenbach, L. (1995). Regression of established murine carcinoma metastases following vaccination with tumour-associated antigen peptides. *Nat. Med.* **1**, 1179–1183.
- Mandragu, R., Murray, S., Forman, J., and Pasare, C. (2014). Differential ability of surface and endosomal TLRs to induce CD8 T cell responses in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**, 4303–4315.
- Marrack, P., McKee, A.S., and Munks, M.W. (2009). Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 287–293.
- Maslak, P.G., Dao, T., Bernal, Y., Chanel, S.M., Zhang, R., Frattini, M., Rosenblat, T., Jurcic, J.G., Brentjens, R.J., Arcila, M.E., et al. (2018). Phase 2 trial of a multivalent WT1 peptide vaccine (galinpepimut-S) in acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* **2**, 224–234.
- Maude, S.L., Frey, N., Shaw, P.A., Aplenc, R., Barrett, D.M., Bunin, N.J., Chew, A., Gonzalez, V.E., Zheng, Z., Lacey, S.F., et al. (2014). Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1507–1517.
- May, R.J., Dao, T., Pinilla-Ibarz, J., Korontsvit, T., Zakhaleva, V., Zhang, R.H., Maslak, P., and Scheinberg, D.A. (2007). Peptide epitopes from the Wilms' tumor 1 oncoprotein stimulate CD4⁺ and

CD8+ T cells that recognize and kill human malignant mesothelioma tumor cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 4547–4555.

McCarthy, E.F. (2006). The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *Iowa Orthop. J.* 26, 154–158.

McWilliams, J.A., Sanchez, P.J., Haluszczak, C., Gapin, L., and Kedl, R.M. (2010). Multiple Innate Signaling Pathways Cooperate with CD40 to Induce potent, CD70-dependent Cellular Immunity. *Vaccine* 28, 1468.

Mendoza-Naranjo, A., Saéz, P.J., Johansson, C.C., Ramírez, M., Mandakovic, D., Pereda, C., López, M.N., Kiessling, R., Sáez, J.C., and Salazar-Onfray, F. (2007). Functional gap junctions facilitate melanoma antigen transfer and cross-presentation between human dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 6949–6957.

Menez-Jamet, J., Gallou, C., Rougeot, A., and Kosmatopoulos, K. (2016). Optimized tumor cryptic peptides: the basis for universal neo-antigen-like tumor vaccines. *Ann. Transl. Med.* 4.

Mikhak, Z., Strassner, J.P., and Luster, A.D. (2013). Lung dendritic cells imprint T cell lung homing and promote lung immunity through the chemokine receptor CCR4. *J. Exp. Med.* 210, 1855–1869.

Mitchell, D., Yong, M., Schroder, W., Black, M., Tirrell, M., and Olive, C. (2010). Dual stimulation of MyD88-dependent Toll-like receptors induces synergistically enhanced production of inflammatory cytokines in murine bone marrow-derived dendritic cells. *J. Infect. Dis.* 202, 318–329.

Mittendorf, E.A., Ardavanis, A., Symanowski, J., Murray, J.L., Shumway, N.M., Litton, J.K., Hale, D.F., Perez, S.A., Anastasopoulou, E.A., Pistamaltzian, N.F., et al. (2016). Primary analysis of a prospective, randomized, single-blinded phase II trial evaluating the HER2 peptide AE37 vaccine in breast cancer patients to prevent recurrence. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 27, 1241–1248.

Miwa, H. (1984). Identification and prognostic implications of tumor infiltrating lymphocytes--a review. *Acta Med. Okayama* 38, 215–218.

van Montfoort, N., Mangsbo, S.M., Camps, M.G.M., van Maren, W.W.C., Verhaart, I.E.C., Waisman, A., Drijfhout, J.W., Melief, C.J.M., Verbeek, J.S., and Ossendorp, F. (2012). Circulating specific antibodies enhance systemic cross-priming by delivery of complexed antigen to dendritic cells in vivo. *Eur. J. Immunol.* 42, 598–606.

Mortellaro, A., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2011). From vaccine practice to vaccine science: the contribution of human immunology to the prevention of infectious disease. *Immunol. Cell Biol.* 89, 332–339.

Naik, S., Bouladoux, N., Wilhelm, C., Molloy, M.J., Salcedo, R., Kastenmuller, W., Deming, C., Quinones, M., Koo, L., Conlan, S., et al. (2012). Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science* 337, 1115–1119.

Nair-Gupta, P., Baccarini, A., Tung, N., Seyffer, F., Florey, O., Huang, Y., Banerjee, M., Overholtzer, M., Roche, P.A., Tampé, R., et al. (2014). TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation. *Cell* 158, 506–521.

Nakayama, M. (2014). Antigen Presentation by MHC-Dressed Cells. *Front. Immunol.* 5, 672.

- Nakayama, M., Takeda, K., Kawano, M., Takai, T., Ishii, N., and Ogasawara, K. (2011). Natural killer (NK)-dendritic cell interactions generate MHC class II-dressed NK cells that regulate CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 18360–18365.
- Neijssen, J., Herberts, C., Drijfhout, J.W., Reits, E., Janssen, L., and Neefjes, J. (2005). Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* *434*, 83–88.
- Netea, M.G., Van der Meer, J.W.M., Suttmüller, R.P., Adema, G.J., and Kullberg, B.-J. (2005). From the Th1/Th2 paradigm towards a Toll-like receptor/T-helper bias. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 3991–3996.
- Nielsen, M., and Andreatta, M. (2016). NetMHCpan-3.0; improved prediction of binding to MHC class I molecules integrating information from multiple receptor and peptide length datasets. *Genome Med.* *8*, 33.
- Nizard, M., Diniz, M.O., Roussel, H., Tran, T., Ferreira, L.C., Badoual, C., and Tartour, E. (2014). Mucosal vaccines: novel strategies and applications for the control of pathogens and tumors at mucosal sites. *Hum. Vaccines Immunother.* *10*, 2175–2187.
- Nizard, M., Roussel, H., and Tartour, E. (2016). Resident Memory T Cells as Surrogate Markers of the Efficacy of Cancer Vaccines. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *22*, 530–532.
- Noguchi, Y., Chen, Y.T., and Old, L.J. (1994). A mouse mutant p53 product recognized by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 3171–3175.
- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* *194*, 23–28.
- Ohtake, J., Ohkuri, T., Togashi, Y., Kitamura, H., Okuno, K., and Nishimura, T. (2014). Identification of novel helper epitope peptides of Survivin cancer-associated antigen applicable to developing helper/killer-hybrid epitope long peptide cancer vaccine. *Immunol. Lett.* *161*, 20–30.
- Okada, H., Butterfield, L.H., Hamilton, R.L., Hoji, A., Sakaki, M., Ahn, B.J., Kohanbash, G., Drappatz, J., Engh, J., Amankulor, N., et al. (2015). Induction of robust type-I CD8+ T-cell responses in WHO grade 2 low-grade glioma patients receiving peptide-based vaccines in combination with poly-ICLC. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *21*, 286–294.
- Ott, P.A., Hu, Z., Keskin, D.B., Shukla, S.A., Sun, J., Bozym, D.J., Zhang, W., Luoma, A., Giobbie-Hurder, A., Peter, L., et al. (2017). An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* *547*, 217–221.
- Panina-Bordignon, P., Tan, A., Termijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G., and Lanzavecchia, A. (1989). Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur. J. Immunol.* *19*, 2237–2242.
- Parmiani, G., Castelli, C., Pilla, L., Santinami, M., Colombo, M.P., and Rivoltini, L. (2007). Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *18*, 226–232.
- Perez, S.A., Kallinteris, N.L., Bisias, S., Tzonis, P.K., Georgakopoulou, K., Varla-Leftherioti, M., Papamichail, M., Thanos, A., von Hofe, E., and Baxevanis, C.N. (2010). Results from a phase I clinical study of the novel li-Key/HER-2/neu(776-790) hybrid peptide vaccine in patients with prostate cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 3495–3506.

Pfreundschuh, M., Shiku, H., Takahashi, T., Ueda, R., Ransohoff, J., Oettgen, H.F., and Old, L.J. (1978). Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 5122–5126.

Pilla, L., Patuzzo, R., Rivoltini, L., Maio, M., Pennacchioli, E., Lamaj, E., Maurichi, A., Massarut, S., Marchianò, A., Santantonio, C., et al. (2006). A phase II trial of vaccination with autologous, tumor-derived heat-shock protein peptide complexes Gp96, in combination with GM-CSF and interferon- α in metastatic melanoma patients. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 55, 958–968.

Pinilla-Ibarz, J., May, R.J., Korontsvit, T., Gomez, M., Kappel, B., Zakhaleva, V., Zhang, R.H., and Scheinberg, D.A. (2006). Improved human T-cell responses against synthetic HLA-0201 analog peptides derived from the WT1 oncoprotein. *Leukemia* 20, 2025–2033.

Pitti, R.M., Marsters, S.A., Lawrence, D.A., Roy, M., Kischkel, F.C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C.J., Sherwood, S.W., Baldwin, D.T., et al. (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396, 699–703.

Plotkin, S. (2014). History of vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 12283–12287.

van Poelgeest, M.I.E., Welters, M.J.P., Vermeij, R., Stynenbosch, L.F.M., Loof, N.M., Berends-van der Meer, D.M.A., Löwik, M.J.G., Hamming, I.L.E., van Esch, E.M.G., Hellebrekers, B.W.J., et al. (2016). Vaccination against Oncoproteins of HPV16 for Noninvasive Vulvar/Vaginal Lesions: Lesion Clearance Is Related to the Strength of the T-Cell Response. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 2342–2350.

Pouniotis, D., Tang, C.-K., Apostolopoulos, V., and Pietersz, G. (2016). Vaccine delivery by penetratin: mechanism of antigen presentation by dendritic cells. *Immunol. Res.* 64, 887–900.

Pouniotis, D.S., Esparon, S., Apostolopoulos, V., and Pietersz, G.A. (2011). Whole protein and defined CD8(+) and CD4(+) peptides linked to penetratin targets both MHC class I and II antigen presentation pathways. *Immunol. Cell Biol.* 89, 904–913.

Powell, D.J., and Rosenberg, S.A. (2004). Phenotypic and Functional Maturation of Tumor Antigen-Reactive CD8+ T Lymphocytes in Patients Undergoing Multiple Course Peptide Vaccination. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 27, 36–47.

Prongidi-Fix, L., Sugawara, M., Bertani, P., Raya, J., Leborgne, C., Kichler, A., and Bechinger, B. (2007). Self-promoted cellular uptake of peptide/DNA transfection complexes. *Biochemistry (Mosc.)* 46, 11253–11262.

Qi, X., Zhang, F., Wu, H., Liu, J., Zong, B., Xu, C., and Jiang, J. (2015). Wilms' tumor 1 (WT1) expression and prognosis in solid cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 5.

Qin, Z., and Blankenstein, T. (2000). CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* 12, 677–686.

Ragupathi, G., Gardner, J.R., Livingston, P.O., and Gin, D.Y. (2011). Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer. *Expert Rev. Vaccines* 10, 463–470.

Ramakrishnan, S., Patricia, S., and Mathan, G. (2015). Overview of high-risk HPV's 16 and 18 infected cervical cancer: pathogenesis to prevention. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 70, 103–110.

- Reddy, S.T., Rehor, A., Schmoekel, H.G., Hubbell, J.A., and Swartz, M.A. (2006). In vivo targeting of dendritic cells in lymph nodes with poly(propylene sulfide) nanoparticles. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *112*, 26–34.
- Robbins, P.F., Kassim, S.H., Tran, T.L.N., Crystal, J.S., Morgan, R.A., Feldman, S.A., Yang, J.C., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Sherry, R.M., et al. (2015). A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *21*, 1019–1027.
- Roberts, E.W., Broz, M.L., Binnewies, M., Headley, M.B., Nelson, A.E., Wolf, D.M., Kaisho, T., Bogunovic, D., Bhardwaj, N., and Krummel, M.F. (2016). Critical Role for CD103(+)/CD141(+) Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. *Cancer Cell* *30*, 324–336.
- Romero-Garcia, S., Moreno-Altamirano, M.M.B., Prado-Garcia, H., and Sánchez-García, F.J. (2016). Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. *Front. Immunol.* *7*.
- Rosenberg, S.A., Sherry, R.M., Morton, K.E., Yang, J.C., Topalian, S.L., Royal, R.E., Kammula, U.S., Restifo, N.P., Hughes, M.S., Schwarz, S.L., et al. (2006). Altered CD8(+) T-cell responses when immunizing with multiepitope peptide vaccines. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* *29*, 224–231.
- 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.
- Sabbatini, P., Tsuji, T., Ferran, L., Ritter, E., Sedrak, C., Tuballes, K., Jungbluth, A.A., Ritter, G., Aghajanian, C., Bell-McGuinn, K., et al. (2012). Phase I trial of overlapping long peptides from a tumor self-antigen and poly-ICLC shows rapid induction of integrated immune response in ovarian cancer patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 6497–6508.
- Salerno, E.P., Shea, S.M., Olson, W.C., Petroni, G.R., Smolkin, M.E., McSkimming, C., Chianese-Bullock, K.A., and Slingsluff, C.L. (2013). Activation, dysfunction and retention of T cells in vaccine sites after injection of incomplete Freund's adjuvant, with or without peptide. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *62*, 1149–1159.
- Salmon, D., and Smith, T. (1880). On a new method of producing immunity from contagious diseases. *Proc. Biol. Soc. Wash.* *3*, 29–33.
- Sanchez, P.J., McWilliams, J.A., Haluszczak, C., Yagita, H., and Kedl, R.M. (2007). Combined TLR/CD40 stimulation mediates potent cellular immunity by regulating dendritic cell expression of CD70 in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 1564–1572.
- Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I.C., Lennon-Duménil, A.-M., Seabra, M.C., Raposo, G., and Amigorena, S. (2006). NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* *126*, 205–218.
- Schuetz, V., and Burgdorf, S. (2014a). The ins-and-outs of endosomal antigens for cross-presentation. *Curr. Opin. Immunol.* *26*, 63–68.
- Schuetz, V., and Burgdorf, S. (2014b). The ins-and-outs of endosomal antigens for cross-presentation. *Curr. Opin. Immunol.* *26*, 63–68.

- Schwartzentruber, D.J., Lawson, D.H., Richards, J.M., Conry, R.M., Miller, D.M., Treisman, J., Gailani, F., Riley, L., Conlon, K., Pockaj, B., et al. (2011). gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* 364, 2119–2127.
- Seavey, M.M., and Mosmann, T.R. (2009). Estradiol-induced vaginal mucus inhibits antigen penetration and CD8(+) T cell priming in response to intravaginal immunization. *Vaccine* 27, 2342–2349.
- Sehgal, K., Ragheb, R., Fahmy, T.M., Dhodapkar, M.V., and Dhodapkar, K.M. (2014). Nanoparticle-mediated combinatorial targeting of multiple human dendritic cell (DC) subsets leads to enhanced T cell activation via IL-15-dependent DC crosstalk. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 2297–2305.
- Sharabi, A.B., Nirschl, C.J., Kochel, C.M., Nirschl, T.R., Francica, B.J., Velarde, E., Deweese, T.L., and Drake, C.G. (2015). Stereotactic Radiation Therapy Augments Antigen-Specific PD-1-Mediated Antitumor Immune Responses via Cross-Presentation of Tumor Antigen. *Cancer Immunol. Res.* 3, 345–355.
- Shen, L., Sigal, L.J., Boes, M., and Rock, K.L. (2004). Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 21, 155–165.
- Shirai, M., Pendleton, C.D., Ahlers, J., Takeshita, T., Newman, M., and Berzofsky, J.A. (1994). Helper-cytotoxic T lymphocyte (CTL) determinant linkage required for priming of anti-HIV CD8+ CTL in vivo with peptide vaccine constructs. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 152, 549–556.
- Sikora, A.G., Jaffarad, N., Hailemichael, Y., Gelbard, A., Stonier, S.W., Schluns, K.S., Frasca, L., Lou, Y., Liu, C., Andersson, H.A., et al. (2009). IFN- α Enhances Peptide Vaccine-Induced CD8+ T Cell Numbers, Effector Function, and Antitumor Activity. *J. Immunol.* 182, 7398–7407.
- Sinha, P., Clements, V.K., Bunt, S.K., Albelda, S.M., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 977–983.
- Slingluff, C.L. (2011). The present and future of peptide vaccines for cancer: single or multiple, long or short, alone or in combination? *Cancer J. Sudbury Mass* 17, 343–350.
- Slingluff, C.L., Petroni, G.R., Chianese-Bullock, K.A., Smolkin, M.E., Ross, M.I., Haas, N.B., von Mehren, M., and Grosh, W.W. (2011). Randomized multicenter trial of the effects of melanoma-associated helper peptides and cyclophosphamide on the immunogenicity of a multi-peptide melanoma vaccine. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 2924–2932.
- Slingluff, C.L., Lee, S., Zhao, F., Chianese-Bullock, K.A., Olson, W.C., Butterfield, L.H., Whiteside, T.L., Leming, P.D., and Kirkwood, J.M. (2013). A randomized phase II trial of multi-peptide vaccination with melanoma peptides for cytotoxic T cells and helper T cells for patients with metastatic melanoma (E1602). *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 4228–4238.
- Soiffer, R., Lynch, T., Mihm, M., Jung, K., Rhuda, C., Schmollinger, J.C., Hodi, F.S., Lieber, L., Lam, P., Mentzer, S., et al. (1998). Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13141–13146.
- Soriano, C., Mukaro, V., Hodge, G., Ahern, J., Holmes, M., Jersmann, H., Moffat, D., Meredith, D., Jurisevic, C., Reynolds, P.N., et al. (2012). Increased proteinase inhibitor-9 (PI-9) and reduced granzyme B in lung cancer: mechanism for immune evasion? *Lung Cancer Amst. Neth.* 77, 38–45.

- Sosman, J.A., and Sondak, V.K. (2003). Melacine: an allogeneic melanoma tumor cell lysate vaccine. *Expert Rev. Vaccines* 2, 353–368.
- Spangler, J.B., Tomala, J., Luca, V.C., Jude, K.M., Dong, S., Ring, A.M., Votavova, P., Pepper, M., Kovar, M., and Garcia, K.C. (2015). Antibodies to Interleukin-2 Elicit Selective T Cell Subset Potentiation through Distinct Conformational Mechanisms. *Immunity* 42, 815–825.
- Strand, S., Hofmann, W.J., Hug, H., Müller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S.M., Stremmel, W., Krammer, P.H., and Galle, P.R. (1996). Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat. Med.* 2, 1361–1366.
- Sun, T., Zhou, Y., Li, H., Han, X., Shi, Y., Wang, L., Miao, X., Tan, W., Zhao, D., Zhang, X., et al. (2005). FASL -844C polymorphism is associated with increased activation-induced T cell death and risk of cervical cancer. *J. Exp. Med.* 202, 967–974.
- Takahashi, N., Ohkuri, T., Homma, S., Ohtake, J., Wakita, D., Togashi, Y., Kitamura, H., Todo, S., and Nishimura, T. (2012). First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen. *Cancer Sci.* 103, 150–153.
- Thomas, L. (1982). On immunosurveillance in human cancer. *Yale J. Biol. Med.* 55, 329–333.
- Thommen, D.S., Schuster, H., Keller, M., Kapoor, S., Weinzierl, A.O., Chennakesava, C.S., Wang, X., Rohrer, L., Eckardstein, A. von, Stevanovic, S., et al. (2012). Two Preferentially Expressed Proteins Protect Vascular Endothelial Cells from an Attack by Peptide-Specific CTL. *J. Immunol.* 188, 5283–5292.
- Thompson, E.A., Liang, F., Lindgren, G., Sandgren, K.J., Quinn, K.M., Darrah, P.A., Koup, R.A., Seder, R.A., Kedl, R.M., and Loré, K. (2015). Human Anti-CD40 Antibody and Poly IC:LC Adjuvant Combination Induces Potent T Cell Responses in the Lung of Nonhuman Primates. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 195, 1015–1024.
- Thompson, L.W., Garbee, C.F., Hibbitts, S., Brinckerhoff, L.H., Pierce, R.A., Chianese-Bullock, K.A., Deacon, D.H., Engelhard, V.H., and Slingluff, C.L. (2004). Competition among peptides in melanoma vaccines for binding to MHC molecules. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* 27, 425–431.
- Toes, R.E., Blom, R.J., Offringa, R., Kast, W.M., and Melief, C.J. (1996). Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 156, 3911–3918.
- Tomać, V. (2016). Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites. *Cancers* 8.
- Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., et al. (2012). Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 2443–2454.
- Tourdot, S., Scardino, A., Saloustrou, E., Gross, D.A., Pascolo, S., Cordopatis, P., Lemonnier, F.A., and Kosmatopoulos, K. (2000). A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2. 1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes. *Eur. J. Immunol.* 30, 3411–3421.
- Toussi, D.N., and Massari, P. (2014). Immune Adjuvant Effect of Molecularly-defined Toll-Like Receptor Ligands. *Vaccines* 2, 323–353.

- Trambas, C.M., and Griffiths, G.M. (2003). Delivering the kiss of death. *Nat. Immunol.* 4, 399–403.
- Tummers, B., and Van Der Burg, S.H. (2015). High-Risk Human Papillomavirus Targets Crossroads in Immune Signaling. *Viruses* 7, 2485–2506.
- Vaishampayan, U., Abrams, J., Darrah, D., Jones, V., and Mitchell, M.S. (2002). Active immunotherapy of metastatic melanoma with allogeneic melanoma lysates and interferon alpha. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 3696–3701.
- Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W.J., Ammerer, G., and Hall, B.D. (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 298, 347–350.
- Vambutas, A., DeVoti, J., Nouri, M., Drijfhout, J.W., Lipford, G.B., Bonagura, V.R., van der Burg, S.H., and Melief, C.J.M. (2005). Therapeutic vaccination with papillomavirus E6 and E7 long peptides results in the control of both established virus-induced lesions and latently infected sites in a pre-clinical cottontail rabbit papillomavirus model. *Vaccine* 23, 5271–5280.
- Vasaturo, A., Halilovic, A., Bol, K.F., Verweij, D.I., Blokx, W.A.M., Punt, C.J.A., Groenen, P.J.T.A., van Krieken, J.H.J.M., Textor, J., de Vries, I.J.M., et al. (2016). T-cell Landscape in a Primary Melanoma Predicts the Survival of Patients with Metastatic Disease after Their Treatment with Dendritic Cell Vaccines. *Cancer Res.* 76, 3496–3506.
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 235–271.
- Vetsika, E.-K., Konsolakis, G., Aggouraki, D., Kotsakis, A., Papadimitraki, E., Christou, S., Menez-Jamet, J., Kosmatopoulos, K., Georgoulas, V., and Mavroudis, D. (2012). Immunological responses in cancer patients after vaccination with the therapeutic telomerase-specific vaccine Vx-001. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 61, 157–168.
- Vinay, D.S., and Kwon, B.S. (2014). 4-1BB (CD137), an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy. *BMB Rep.* 47, 122–129.
- Vita, R., Overton, J.A., Greenbaum, J.A., Ponomarenko, J., Clark, J.D., Cantrell, J.R., Wheeler, D.K., Gabbard, J.L., Hix, D., Sette, A., et al. (2015). The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Res.* 43, D405–D412.
- Wada, H., Isobe, M., Kakimi, K., Mizote, Y., Eikawa, S., Sato, E., Takigawa, N., Kiura, K., Tsuji, K., Iwatsuki, K., et al. (2014). Vaccination with NY-ESO-1 overlapping peptides mixed with Picibanil OK-432 and montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* 37, 84–92.
- Wakabayashi, A., Nakagawa, Y., Shimizu, M., Moriya, K., Nishiyama, Y., and Takahashi, H. (2008). Suppression of an already established tumor growing through activated mucosal CTLs induced by oral administration of tumor antigen with cholera toxin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 4000–4010.
- Warburg, O. (1925). The Metabolism of Carcinoma Cells. *J. Cancer Res.* 9, 148–163.
- Warger, T., Osterloh, P., Rechtsteiner, G., Fassbender, M., Heib, V., Schmid, B., Schmitt, E., Schild, H., and Radsak, M.P. (2006). Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. *Blood* 108, 544–550.

- Wei, C.-H., and Sherman, L.A. (2007). N-terminal trimer extension of nominal CD8 T cell epitopes is sufficient to promote cross-presentation to cognate CD8 T cells in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 8280–8286.
- Welters, M.J.P., Kenter, G.G., Piersma, S.J., Vloon, A.P.G., Löwik, M.J.G., Berends-van der Meer, D.M.A., Drijfhout, J.W., Valentijn, A.R.P.M., Wafelman, A.R., Oostendorp, J., et al. (2008). Induction of tumor-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 178–187.
- Wong, S.B.J., Bos, R., and Sherman, L.A. (2008). Tumor-specific CD4+ T cells render the tumor environment permissive for infiltration by low-avidity CD8+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 3122–3131.
- Woo, S.-R., Fuertes, M.B., Corrales, L., Spranger, S., Furdyna, M.J., Leung, M.Y.K., Duggan, R., Wang, Y., Barber, G.N., Fitzgerald, K.A., et al. (2014). STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity* **41**, 830–842.
- Xia, W., Wang, J., Xu, Y., Jiang, F., and Xu, L. (2014). L-BLP25 as a peptide vaccine therapy in non-small cell lung cancer: a review. *J. Thorac. Dis.* **6**, 1513–1520.
- Xu, M., Kallinteris, N.L., and von Hofe, E. (2012). CD4+ T-cell activation for immunotherapy of malignancies using Ii-Key/MHC class II epitope hybrid vaccines. *Vaccine* **30**, 2805–2810.
- Xu, X.D., Shao, S.X., Jiang, H.P., Cao, Y.W., Wang, Y.H., Yang, X.C., Wang, Y.L., Wang, X.S., and Niu, H.T. (2015). Warburg effect or reverse Warburg effect? A review of cancer metabolism. *Oncol. Res. Treat.* **38**, 117–122.
- Yu, H., Kago, G., Yellman, C.M., and Matouschek, A. (2016). Ubiquitin-like domains can target to the proteasome but proteolysis requires a disordered region. *EMBO J.* **35**, 1522–1536.
- Zamani, P., Momtazi-Borojeni, A.A., Nik, M.E., Oskuee, R.K., and Sahebkar, A. (2018). Nanoliposomes as the adjuvant delivery systems in cancer immunotherapy. *J. Cell. Physiol.* **233**, 5189–5199.
- Zandberg, D.P., Rollins, S., Goloubeva, O., Morales, R.E., Tan, M., Taylor, R., Wolf, J.S., Schumaker, L.M., Cullen, K.J., Zimrin, A., et al. (2015). A phase I dose escalation trial of MAGE-A3- and HPV16-specific peptide immunomodulatory vaccines in patients with recurrent/metastatic (RM) squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Cancer Immunol. Immunother.* **64**, 367–379.
- Zanetti, M. (2017). A second chance for telomerase reverse transcriptase in anticancer immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 115–128.
- Zauderer, M.G., Tsao, A.S., Dao, T., Panageas, K., Lai, W.V., Rimner, A., Rusch, V.W., Adusumilli, P.S., Ginsberg, M.S., Gomez, D., et al. (2017). A Randomized Phase II Trial of Adjuvant Galinpepimut-S, WT-1 Analogue Peptide Vaccine, After Multimodality Therapy for Patients with Malignant Pleural Mesothelioma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**, 7483–7489.
- Zeng, F., and Morelli, A.E. (2018). Extracellular vesicle-mediated MHC cross-dressing in immune homeostasis, transplantation, infectious diseases, and cancer. *Semin. Immunopathol.*
- Zhang, Q.-J., Li, X.-L., Wang, D., Huang, X.-C., Mathis, J.M., Duan, W.-M., Knight, D., Shi, R., Glass, J., Zhang, D.-Q., et al. (2008). Trogocytosis of MHC-I/Peptide Complexes Derived from Tumors and Infected Cells Enhances Dendritic Cell Cross-Priming and Promotes Adaptive T Cell Responses. *PLOS ONE* **3**, e3097.

Zilberberg, J., Feinman, R., and Korngold, R. (2015). Strategies for the Identification of T Cell–Recognized Tumor Antigens in Hematological Malignancies for Improved Graft-versus-Tumor Responses after Allogeneic Blood and Marrow Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 21, 1000–1007.

Zimmer, L., Goldinger, S.M., Hofmann, L., Loquai, C., Ugurel, S., Thomas, I., Schmidgen, M.I., Gutzmer, R., Utikal, J.S., Göppner, D., et al. (2016). Neurological, respiratory, musculoskeletal, cardiac and ocular side-effects of anti-PD-1 therapy. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990.

Zom, G.G., Khan, S., Britten, C.M., Sommandas, V., Camps, M.G.M., Loof, N.M., Budden, C.F., Meeuwenoord, N.J., Filippov, D.V., van der Marel, G.A., et al. (2014). Efficient induction of antitumor immunity by synthetic toll-like receptor ligand-peptide conjugates. *Cancer Immunol. Res.* 2, 756–764.

Zom, G.G., Welters, M.J.P., Loof, N.M., Goedemans, R., Loughheed, S., Valentijn, R.R.P.M., Zandvliet, M.L., Meeuwenoord, N.J., Melief, C.J.M., de Gruijl, T.D., et al. (2016). TLR2 ligand-synthetic long peptide conjugates effectively stimulate tumor-draining lymph node T cells of cervical cancer patients. *Oncotarget* 7, 67087–67100.

Zwaveling, S., Ferreira Mota, S.C., Nouta, J., Johnson, M., Lipford, G.B., Offringa, R., van der Burg, S.H., and Melief, C.J.M. (2002). Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 169, 350–358.

(1990). Antiviral cytotoxic T cell response induced by in vivo priming with a free synthetic peptide. *J. Exp. Med.* 171, 1815–1820.

Vu, le Président du jury,

Berthe-Marie IMBERT

Vu, le Directeur de thèse,

Catherine RABU

Vu, le Directeur de l'UFR,

Gaël GRIMANDI

Nom - Prénoms : Robert Delphine, Marion, Emilie

Titre de la thèse : Le développement de la vaccination peptidique en oncologie

Résumé de la thèse :

Le rôle de notre système immunitaire est de nous protéger contre toute forme de menace extérieure (virus, bactéries) mais aussi intérieure (cancers). La survenue de cancers montre qu'il n'est cependant pas infailible. La vaccination thérapeutique antitumorale a pour but d'induire chez les patients cancéreux une immunité protectrice active et durable envers des antigènes tumoraux, afin de permettre la destruction spécifique des cellules cancéreuses. Elle présente un rapport bénéfice/risque optimal comparée aux traitements classiques, lourds en effets secondaires et sujets au développement de résistances. Elle pourrait notamment permettre de prévenir les rechutes tumorales au long cours.

Il existe différents types de vaccins antitumoraux selon la nature de l'immunogène vaccinal (lysat tumoral, ADN/ARN, peptides, ...). Simples à produire, peu toxiques et très stables, les peptides peuvent s'adapter à une grande diversité de formulations et d'adjuvants. La vaccination peptidique est aujourd'hui une voie très active de recherche du fait de l'amélioration continue des connaissances en immunologie permettant de concevoir de façon rationnelle de nouveaux design vaccinaux, aux résultats cliniques prometteurs. L'objectif de cette thèse est de présenter l'évolution des stratégies vaccinales peptidiques (de manière non exhaustive), ainsi que l'influence de la formulation et de l'administration sur l'immunogénicité et l'efficacité vaccinale.

MOTS CLÉS : VACCINATION PEPTIDES CANCER

JURY

**PRÉSIDENT : Mme Berthe-Marie IMBERT, Professeur de Virologie
Faculté de Pharmacie de Nantes**

**ASSESEURS : Mme Catherine RABU, Maître de Conférences de Pharmacologie
Faculté de Pharmacie de Nantes**

**Mr Franck HALARY, Chargé de recherche 1^{ère} classe INSERM
Université de Nantes**

Adresse de l'auteur : 43 B avenue de la pépinières 44380 PORNICHET