

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
Laboratoire CAMB – UMR 7199 CNRS/Université de Strasbourg

THÈSE

présentée par

Zahra KAKHI

soutenue le : **25 septembre 2014**

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

Discipline/Spécialité : Chimie/Chimie biologique et thérapeutique

Conception de constructions liposomiques destinées à la vaccination antitumorale par voie respiratoire

THÈSE dirigée par :

Mme HEURTAULT Béatrice
Mme PONS Françoise

Maître de Conférences, Université de Strasbourg
Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mr LEGRAND Philippe
Mr TSAPIS Nicolas

Professeur, Université Montpellier 1
Chargé de recherche, CNRS/Université Paris-Sud

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr LAGENTE Vincent
Mr ROBINET Eric

Professeur, Université de Rennes 1
Chercheur contractuel, IHU de Strasbourg

Je tiens tout d'abord à exprimer mes sincères remerciements aux membres du jury, le Professeur Philippe Legrand, le Docteur Nicolas Tsapis, le Professeur Vincent Lagente et le Docteur Eric Robinet de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Qu'ils reçoivent ici l'expression de ma reconnaissance et de toute ma considération.

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives (UMR 7199 CNRS/UdS), sous la co-direction de Madame le Docteur Béatrice Heurtault et Madame le Professeur Françoise Pons. Je tiens à leur exprimer ici mes plus nobles remerciements de m'avoir permis de voyager à l'image d'un « liposome furtif » dans le monde passionnant de la recherche. Merci pour votre confiance, votre encadrement, votre disponibilité, votre bienveillance, vos conseils précieux, vos encouragements ainsi que pour le temps accordé à la relecture de ce manuscrit.

J'adresse également ma profonde reconnaissance à Monsieur le Docteur Jean Serge Rémy et Monsieur le Docteur Luc Lebeau, l'actuel et l'ancien Directeur de l'UMR 7199, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives.

Je tiens à exprimer toute ma considération à Monsieur le Docteur Benoît Frisch pour m'avoir offert l'opportunité de faire partie de l'équipe de BioVectorologie, pour sa confiance et ses conseils scientifiques.

Je remercie tout particulièrement le Professeur Line Bourel de nous avoir accompagnées au début de ce projet. Merci pour vos précieux conseils et vos encouragements.

Ma reconnaissance s'adresse également à Madame le Docteur Anne Casset et Monsieur le Docteur Pierre Edouard Kastner, pour leur expérience et leur aide à la réalisation des travaux *in vitro* présentés dans ce manuscrit.

Un grand merci à Marine Oudot pour sa rigueur, son enthousiasme et toute l'aide qu'elle m'a apportée à la réalisation des travaux sur les transfersomes.

Je remercie mes amis, mes collègues, ainsi que toutes celles et ceux qui ont partagé mon quotidien durant ces trois années : Sylvie, Maria, Emilie, Dimitri, Carole, François,

Christophe, Andreas, Patricia, Thida, Célia, Hanadi, Salif, Bouchera, Amina, Laura, Marie, Marc et tous ceux que je n'ai pas nommés. Chacun à sa manière m'a fait bénéficier de son expérience et de ses qualités ; toutes ses rencontres ont agréablement rythmé mes journées et rendu cette expérience plus enrichissante.

Mes chaleureux remerciements vont à mes incontournables « co-bureau »: Cendrine, Philippe, Neila et Corinne. Merci pour votre présence, vos conseils, votre aide dans les manip, votre humour au 2nd degré, vos « forwards » ; sans oublier le café double concentré. Sans vous cette aventure n'aurait pas eu le même goût.

La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien financier du Ministère de l'Enseignement et de la Recherche et de la Ligue contre le cancer, que je tiens ici à remercier.

« And last but not least », j'aimerais remercier ma famille en France mais aussi en Iran qui malgré la distance a été présente. Merci de tout cœur à mon père pour son soutien sans faille ; je te suis reconnaissante, c'est grâce à toi que j'en suis arrivée là. Un grand merci aussi à ma « grande sœur » Linda pour son extrême gentillesse et sa disponibilité. Merci d'avoir vécu au quotidien cette aventure avec moi.

À ma famille, à mon père

Table des matières

<i>Abréviations</i>	1
<i>Résumé de thèse</i>	3
<i>Avant-propos</i>	10

Introduction

1. Immunité et immunothérapie antitumorale	12
1.1. Rappels sur l'immunité	12
1.1.1. Immunité innée	12
1.1.2. Immunité adaptative	16
1.1.3. Interrelations entre réponse innée et réponse adaptative	20
1.2. Immunité antitumorale	22
1.2.1. Rôle du système immunitaire dans le développement tumoral	22
1.2.2. Arguments en faveur d'un rôle protecteur du système immunitaire dans le développement tumoral	23
1.2.3. Mécanismes de la réponse immunitaire antitumorale	25
1.2.4. Mécanismes de l'échappement tumoral	31
1.2.5. Immunothérapie des cancers	33
2. Vecteurs nanoparticulaires en vaccination	37
2.1. Intérêt des vecteurs colloïdaux en vaccination	38
2.2. Différents vecteurs colloïdaux utilisés en vaccination	42
2.3. Liposomes et vaccination antitumorale	45
2.3.1. Généralités sur les liposomes	45
2.3.2. Stratégies d'utilisation des liposomes en vaccination antitumorale	46
2.3.2.1. Liposomes comme adjuvants	46
2.3.2.2. Liposomes comme vecteurs d'ADN ou d'ARNm	48
2.3.2.3. Liposomes comme vecteurs de cytokines	49
2.3.2.4. Liposomes pour optimiser le chargement des CD en antigènes	50
2.3.2.5. Liposomes comme vecteurs de peptides	50
2.3.3. Propriétés physicochimiques des liposomes et vaccination	53
2.3.3.1. Diamètre et charge	53
2.3.3.2. Couplage des antigènes ou d'ADN	54
2.3.3.3. Modification de surface des vaccins peptidiques pour favoriser le ciblage des cellules dendritiques	55
3. Voie respiratoire, une voie prometteuse pour l'administration de vaccins	57
3.1. Anatomie et physiologie du tractus respiratoire	57
3.2. Caractéristiques anatomiques, fonctionnelles et immunologiques de la muqueuse respiratoire	59
3.2.1. Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles	59
3.2.2. Caractéristiques immunologiques.....	64

3.3. Vaccination par voie respiratoire	68
3.3.1. Induction des réponses immunitaires après vaccination par voie respiratoire	68
3.3.2. Place actuelle des systèmes nanoparticulaires dans la vaccination par voie respiratoire	70
3.3.2.1. Vaccination antivirale	71
3.3.2.2. Vaccination antibactérienne	72
3.3.2.3. Vaccination antitumorale	72
3.3.3. Stratégies d'optimisation des systèmes nanoparticulaires en vaccination respiratoire	75
3.3.3.1. Mucoadhésion	75
3.3.3.2. Ciblage des cellules M ou des CPA	77

Objectifs spécifiques des travaux de la thèse.....80

Matériels et méthodes

1. Formulation et caractérisation des vaccins peptidiques synthétiques84

1.1. Réactifs	84
1.1.1. Lipides	84
1.1.2. Peptides.....	85
1.1.3. Agents gélifiants	86
1.1.4. Autres réactifs.....	87
1.2. Formulation des vaccins	88
1.2.1. Formulation des différents types de vecteurs	88
1.2.1.1. Formulation des gros liposomes multilamellaires (MLV) et des petits liposomes unilamellaires (SUV)	88
1.2.1.2. Formulation des REV.....	89
1.2.1.3. Préparation des liposomes ultra-déformables ou transfersomes	90
1.2.2. Couplage des peptides aux liposomes	91
1.2.2.1. Couplage des peptides d'intérêt ErbB2 et Ha sur les différents liposomes	91
1.2.2.2. Couplage du peptide CMT2 sur les SUV	92
1.2.3. Concentration des préparations vaccinales.....	94
1.2.4. Préparation de gels de liposomes SUV.....	95
1.2.5. Conservation des vaccins.....	95
1.3. Caractérisation physicochimique.....	95
1.3.1. Dosage du phosphate inorganique.....	95
1.3.2. Mesure du diamètre moyen par diffusion dynamique de la lumière	96
1.3.3. Dosage de la phosphatidylcholine	96
1.3.4. Dosage des peptides.....	97

2. Evaluation biologique des vaccins98

2.1. Evaluation de l'activité de ciblage du peptide CMT2 <i>in vitro</i>	98
2.1.1. Lignées cellulaires	98
2.1.1.1. Calu-3.....	98
2.1.1.2. Caco-2	98
2.1.2. Evaluation de la capacité du peptide CMT2 à altérer la TEER de monocouches cellulaires.....	99

2.2. Evaluation de l'activité immunostimulatrice et de l'efficacité antitumorale des vaccins <i>in vivo</i> chez la souris	100
2.2.1. Animaux	100
2.2.2. Modes d'administration des vaccins.....	100
2.2.3. Evaluation de l'activité immunostimulatrice des vaccins	101
2.2.3.1. Protocoles d'immunisation et de recueil des échantillons	102
2.2.3.2. Mesure de la réponse immunitaire locale.....	102
a. Réalisation des lavages bronchoalvéolaires.....	102
b. Réalisation des lavages nasaux	102
c. Détermination du nombre total et différentiel de cellules dans les liquides de lavage.....	103
d. Dosage des cytokines et chimiokines dans les liquides de lavage.....	103
2.2.3.3. Mesure de la réponse immunitaire systémique	103
a. Isolement des splénocytes.....	103
b. ELISpot IFN- γ	104
2.2.4. Evaluation de l'efficacité antitumorale des vaccins	105
2.2.4.1. Lignée cellulaire Renca-LacZ-ErbB2	105
2.2.4.2. Modèles de tumeurs chez la souris	105
2.2.4.3. Calendriers de vaccination et d'implantation des tumeurs	106
a. Vaccination par voie respiratoire	106
b. Vaccination par voie nasale	107
c. Vaccination par voie sous-cutanée.....	108
2.2.4.4. Evaluation de l'efficacité des vaccins dans le modèle de tumeurs pulmonaires.....	108
a. Prélèvement des poumons.....	108
b. Comptage des tumeurs pulmonaires	108
c. Dosage des médiateurs dans les tissus pulmonaires	109
2.2.4.5. Evaluation de l'efficacité des vaccins dans le modèle de tumeurs solides s.c.....	109
2.3. Analyse statistique des données.....	109

Résultats

1. Formulation, activité et efficacité du vaccin d'origine après administration respiratoire chez la souris	112
1.1. Formulation du vaccin	112
1.2. Activité immunostimulatrice et efficacité antitumorale du vaccin après administration respiratoire chez la souris.....	114
1.2.1. Activité immunostimulatrice locale.....	114
1.2.2. Activité immunostimulatrice systémique	115
1.2.3. Efficacité antitumorale	116
1.2.3.1. Efficacité antitumorale après vaccination respiratoire prophylactique.....	116
1.2.3.2. Efficacité antitumorale après vaccination respiratoire thérapeutique	118
2. Evaluation et optimisation du vaccin d'origine dans le cadre d'une administration nasale	121
2.1. Evaluation du vaccin d'origine par voie nasale, et influence du diamètre et de la structure des liposomes	121
2.1.1. Formulation des vaccins liposomiques concentrés de type SUV, MLV et REV	122
2.1.2. Activité immunostimulatrice et efficacité antitumorale du vaccin de type SUV	123
2.1.2.1. Activité immunostimulatrice locale	123
2.1.2.2. Activité immunostimulatrice systémique.....	124
2.1.2.3. Efficacité antitumorale	125

2.1.3.	Influence du diamètre et de la structure du vecteur sur l'activité immunostimulatrice et l'efficacité antitumorale du vaccin	127
2.1.3.1.	Activité immunostimulatrice locale	127
2.1.3.2.	Efficacité antitumorale	129
2.2.	Optimisation de la dose vaccinale	130
2.2.1.	Formulation de vaccins liposomiques contenant des proportions variables d'adjuvant	131
2.2.2.	Influence de la proportion d'adjuvant sur l'activité immunostimulatrice et l'efficacité antitumorale	131
2.2.3.	Influence de la dose totale de vaccin sur l'activité immunostimulatrice locale et l'efficacité antitumorale	133
2.3.	Couplage du peptide CMT2 sur les liposomes.....	135
2.3.1.	Formulation de liposomes incorporant le CMT2	136
2.3.2.	Influence de l'incorporation du peptide CMT2 sur l'efficacité du vaccin	139
2.3.2.1.	Evaluation de l'activité de ciblage du peptide CMT2 <i>in vitro</i>	139
2.3.2.2.	Apport du CMT2 à l'efficacité antitumorale du vaccin dilué.....	141
2.4.	Augmentation de la viscosité	143
2.4.1.	Formulation du gel vaccinal	143
2.4.2.	Influence de la viscosité sur l'activité immunostimulatrice du gel vaccinal.....	144
2.5.	Incorporation de 1,2-dipalmitoylgalloyl glycérol ou DPGG	145
2.5.1.	Formulation du vaccin	146
2.5.2.	Influence de l'incorporation de DPGG sur l'activité immunomodulatrice du vaccin.....	147
2.6.	Vaccin à base de liposomes ultra-déformables ou transfersomes.....	148
2.6.1.	Formulation des transfersomes vaccinaux.....	148
2.6.2.	Evaluation de l'activité immunostimulatrice du vaccin à base de transfersomes	150

Discussion

1.	Préparation des constructions vaccinales	151
1.1.	Formulation des vecteurs liposomiques	151
1.2.	Couplage des peptides aux liposomes	153
1.3.	Autres étapes de formulations.....	154
2.	Evaluation biologique des vaccins	155
2.1.	Evaluation du vaccin d'origine	156
2.2.	Optimisation du vaccin d'origine dans le cadre d'une administration nasale	159

Conclusion et Perspectives

1.	Perspectives à court terme	164
1.1.	Rôle des NALT dans l'activité des vaccins après vaccination nasale	164
1.2.	Ciblage des cellules M	165
1.3.	Temps de résidence des vaccins au niveau de la muqueuse nasale.....	166
1.4.	Transfersomes vaccinaux.....	166
2.	Perspectives à long terme.....	167
2.1.	Combiner la vaccination à d'autres formes d'immunothérapie	167
2.2.	Utiliser des modèles murins plus réalistes.....	168

Bibliographie	170
----------------------------	------------

Abréviations

α GC : alpha-GalactosylCéramide
aa : acide aminé
ADCC : « Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity »
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ARN : Acide RiboNucléique
BALT : « Bronchus-Associated Lymphoid Tissue »
LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire
BCR : Récepteur des Lymphocytes B
CAF : Formulation Adjuvante Cationique
C-CPE : Fragment C-terminal de l'Entérotoxine de *Clostridium Perfringens*
CD : Cellule Dendritique
Chol : Cholestérol
CLR : Récepteur des lectines de type C
CMC : CarboxyMéthyl Cellulose
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMT2 : Peptide MT2 modifié par une cystéine en N-terminal
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CPE : Entérotoxine de *Clostridium Perfringens*
CRD : Domaine de Reconnaissance des Carbohydrates
CV : Coefficient de Variation
DAMP : « Damage-Associated Molecular Pattern »
DPGBr : DiPalmitoyl-Glycérol-Bromoacétamide
DPGG : 1,2- DiPalmitoylGalloylGlycérol
DPGMal : DiPalmitoyl-Glycérol-Maléimide
ELISA : « Enzyme-Linked Immunosorbent Assay »
ELISpot : « Enzyme-linked ImmunoSpot »
HIV : « Human Immunodeficiency Virus »
HPMC : HydroxyPropylMéthyl Cellulose
HPV : « Human PapillomaVirus »
GM-CSF : « Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor »
gp : glycoprotéine
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
i.m. : Intramusculaire
i.p. : Intrapéritonéal
ISCOMTM : « Immune Stimulating COMplex »
IT : ImmunoThérapie
i.v. : Intraveineuse
KAR : « Killer Activation Receptor »
KC : « Keratinocyte Chemoattractant »
KIR : « Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor »
LB : Lymphocyte B
LN : Lavage Nasal

LPS : LipoPolySaccharide
LT : Lymphocyte T
LTC : Lymphocyte T cytotoxique
MALT : « Mucosa-Associated Lymphoid Tissue »
MCP-1 : « Monocyte Chemoattractant Protein-1 »
MIP : « Macrophage Inflammatory Protein »
MLV : « MultiLamellar Vesicle »
MPLA : MonoPhosphoryl Lipid A
MT2 : Peptide de ciblage des cellules M interagissant avec la claudine-4
NALT : « Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue »
NK : « Natural Killer »
NKG2D : « Natural Killer Group 2D »
NKT : « Natural Killer T lymphocyte »
NLR : « NOD-Like Receptor »
NS : Non Significatif
OVA : Ovalbumine
Pam₂CAG : Dipalmitoyl-Cystéinyl-Alanyl-Glycine
PAMP : « Pathogen-Associated Molecular Patterns »
PBS : « Phosphate Buffered Saline »
PC : PhosphatidylCholine
PDI : Indice de PolyDispersité
PG : PhosphatidylGlycérol
PGA : « PolyGlycolic Acid »
PLA : « PolyLactic Acid »
PLGA : « Poly (Lactic-co-Glycolic) Acid »
PRR : « Pattern Recognition Receptor »
REV : « reverse-phase evaporation vesicles »
s.c. : sous-cutanée
SCID : « Severe Combined ImmunoDeficiency »
SLN : « Solid Lipid Nanoparticle »
SP : Surfactant Pulmonaire
SPC : PhosphatidylCholine de Soja
SUV : « Small Unilamellar Vesicle »
TCD4⁺ : Lymphocyte T CD4⁺
TCD8⁺ : Lymphocyte T CD8⁺
TCEP : Tris(2-CarboxyEthyl)Phosphine
TCR : « T Cell Receptor »
TEER : « TransEpithelial Electric Resistance »
TGF : « Transforming Growth Factor »
TLR : « Toll-Like Receptor »
TNF : « Tumor Necrosis Factor »
VEGF : « Vascular Endothelial Growth Factor »

Résumé de thèse

Contexte de l'étude

Le cancer est une cause majeure de mortalité dans le monde, avec 8,2 millions de décès en 2012. Actuellement, son traitement repose essentiellement sur la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie. Cependant, ces approches sont invasives, accompagnées de lourds effets secondaires et/ou coûteuses, avec une efficacité qui dépend de multiples facteurs (type et stade du cancer, âge et hygiène de vie du patient, etc.). Ainsi, face à la progression constante des maladies cancéreuses, la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques reste primordiale.

Avec l'identification des antigènes tumoraux tels que la protéine ErbB2 (qui sera utilisée comme cible dans ce travail) et les progrès dans la compréhension de la réponse immunitaire antitumorale, la vaccination est devenue un champ d'investigation prometteur pour le développement de nouveaux traitements du cancer. En effet, le système immunitaire d'un organisme sain est capable de reconnaître les antigènes tumoraux et de développer une réponse immunitaire spécifique visant à éliminer les cellules tumorales exprimant ces antigènes. La vaccination antitumorale vise à déclencher et à amplifier cette réponse immunitaire naturelle, aussi bien dans un contexte prophylactique que thérapeutique.

Une des approches envisagées pour concevoir des vaccins antitumoraux est l'utilisation de vecteurs nanoparticulaires permettant de véhiculer et de présenter aux cellules du système immunitaire, et en particulier aux cellules présentatrices de l'antigène, un ou plusieurs peptides antigéniques issus d'antigènes tumoraux. Parmi ces vecteurs, les liposomes sont largement utilisés. Vésicules à cœur aqueux constituées de bicouches phospholipidiques similaires aux membranes biologiques, les liposomes peuvent vectoriser des substances lipophiles insérées dans leur bicouche lipidique, des substances hydrophiles encapsulées dans leur cavité aqueuse et/ou des molécules fixées à leur surface. Ces structures peuvent également subir des modifications de surface visant à moduler leur pharmacocinétique, ce qui leur confère une versatilité particulièrement intéressante. Enfin, les liposomes sont biocompatibles et non immunogènes.

Dans notre laboratoire, les liposomes ont déjà montré leur intérêt dans la vaccination antitumorale. Ainsi, des constructions liposomiques vaccinales contenant les épitopes peptidiques TCD8⁺ ErbB2 (issu de la protéine ErbB2 surexprimée dans un grand nombre de tumeurs notamment du sein) et TCD4⁺ Ha (issu de l'hémagglutinine du virus de la grippe),

associés à une molécule adjuvante, le Pam₂CAG (ligand des récepteurs Toll-like) ont été évaluées chez des souris porteuses de cellules tumorales surexprimant la protéine ErbB2. Dans ce modèle, ces constructions ont permis d'inhiber totalement le développement de tumeurs sous-cutanées ou pulmonaires après vaccination prophylactique ou thérapeutique par voie sous-cutanée.

Depuis quelques années, beaucoup d'études se concentrent sur la vaccination par voies muqueuses, dont la voie respiratoire. En effet, la muqueuse respiratoire, et en particulier la muqueuse nasale, renferme des tissus lymphoïdes secondaires contenant toutes les cellules immunitaires impliquées dans le développement d'une réponse immunitaire adaptative spécifique (cellules B, cellules TCD4⁺ ou CD8⁺, macrophages et cellules dendritiques). Elle est par ailleurs facile d'accès et non invasive. Enfin, l'administration d'un vaccin par cette voie conduit à une réponse immunitaire locale et distale, ce qui pourrait permettre la vaccination à distance. La voie respiratoire est déjà étudiée, voire utilisée en vaccination antibactérienne et antivirale (Fluenz[®]). Dans notre laboratoire, une réponse immunitaire antibactérienne a pu être induite après administration pulmonaire de constructions liposomiques dans lesquelles l'épitope TCD8⁺ a été remplacé par un épitope B issu de *Pseudomonas aeruginosa*. Mais peu d'études ont encore exploré la voie respiratoire pour la vaccination antitumorale.

Objectifs de la thèse

Dans ce contexte, l'objectif général du travail de thèse est de concevoir de nouveaux nanovecteurs liposomiques et d'explorer leur potentiel dans la vaccination antitumorale par voie respiratoire, ceci en modifiant et en optimisant un grand nombre de paramètres physicochimiques susceptibles d'influencer leur efficacité (taille, composition, structure...). Plus spécifiquement, il s'agit de concevoir des vaccins à base de liposomes permettant d'obtenir une efficacité antitumorale après administration respiratoire ou plus spécifiquement nasale, en prophylactique ou thérapeutique dans un modèle de tumeurs locales (i.e. pulmonaires) ou solides à distance (i.e. sous-cutanées) chez la souris.

Pour répondre à ces objectifs, nos travaux ont consisté à :

1. **Construire et optimiser le vecteur liposomique**, à partir de la construction précédemment validée au laboratoire pour une vaccination par voie sous-cutanée. Cette construction d'origine, à base de petites vésicules unilamellaires (SUV), contient les épitopes peptidiques

TCD8⁺ ErbB2 et TCD4⁺ Ha, ainsi que la molécule adjuvante, Pam₂CAG (figure 1).

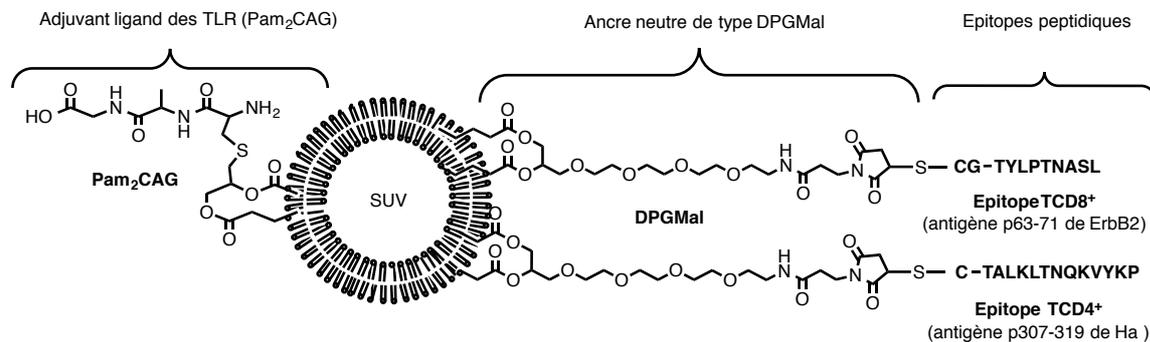


Figure 1 : Représentation schématique de la construction d'origine.

Dans ce travail, différentes formulations ont été obtenues à partir de cette première construction, en faisant varier ses caractéristiques physico-chimiques :

- **la taille et la structure des constructions**, par formulation de gros liposomes unilamellaires REV (en anglais, reverse-phase evaporation vesicles) et de gros liposomes multilamellaires MLV (en anglais, multilamellar vesicles), susceptibles de modifier le temps de résidence du vaccin au niveau mucosal, mais également son interaction avec les cellules de la muqueuse respiratoire, dont les cellules immunitaires et leur environnement ;
- **la composition du vaccin** par : 1- diminution de la proportion d'adjuvant lipopeptidique, afin de limiter d'éventuels effets indésirables ; 2- couplage d'un peptide, le peptide CMT2, permettant le ciblage des cellules M spécialisées dans le transport des antigènes au niveau de certaines muqueuses ; 3- incorporation d'un lipide présentant des propriétés adhésives pour les lipides et les protéines, afin de tenter de favoriser le contact du vaccin avec la muqueuse respiratoire. Des transfersomes, qui sont des liposomes incorporant un agent tensioactif, ont également été évalués, en raison de la flexibilité importante de leur bicouche ;
- **la viscosité des préparations vaccinales**, par incorporation d'agents viscosifiants, susceptibles de modifier le temps de résidence du vaccin au niveau mucosal.

Les liposomes ont été obtenus par la méthode classique d'hydratation d'un film lipidique pour les MLV, suivie d'une sonication pour les SUV ou d'une extrusion pour la préparation des transfersomes. Les REV ont été obtenus par évaporation en phase inverse. Le greffage des peptides sur les liposomes a été réalisé par addition de Michaël via l'ancre dipalmitoyl-glycérol-maléimide (DPGMal) (figure 2) insérée dans la bicouche lipidique.

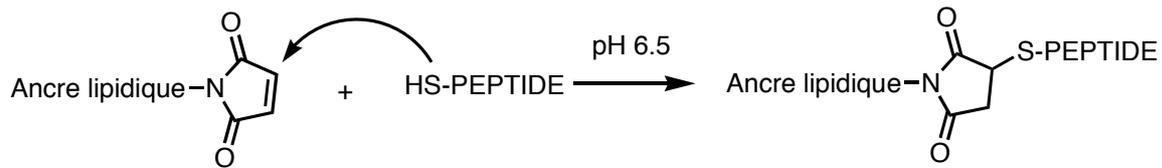


Figure 2 : Conjugaison des peptides à l’ancre DPGMal par addition de Michaël. L’ancre lipidique est insérée dans la bicouche des liposomes.

Toutes les constructions vaccinales ont été caractérisées d’un point de vue physico-chimique, afin de contrôler la qualité de nos formulations. Le diamètre moyen des liposomes a été mesuré par la technique de diffusion dynamique de lumière. La composition des liposomes en phospholipidiques, peptides et adjuvant a été déterminée par des dosages biochimiques.

2. Evaluer *in vivo* chez la souris l’activité immunostimulatrice et l’efficacité antitumorale des différents vaccins après administration respiratoire ou nasale. En effet, l’administration des vaccins a été réalisée par instillation nasale, selon deux procédures : une procédure assurant une distribution du vaccin dans l’ensemble des voies respiratoires (nez + voies respiratoires inférieures), appelé « administration/vaccination respiratoire », et une procédure visant à n’atteindre que la cavité nasale, appelé « administration/vaccination nasale ». L’activité immunostimulatrice des constructions a été évaluée au niveau local, par prélèvement et analyse des liquides de lavages bronchoalvéolaires ou nasaux, et au niveau systémique, par mise en culture et restimulation *ex vivo* des splénocytes. L’efficacité antitumorale des vaccins a été étudiée dans un modèle de tumeurs locales (i.e. pulmonaires) et/ou un modèle de tumeurs solides à distance (i.e. sous-cutanées) suite à une vaccination prophylactique et/ou thérapeutique.

Résultats obtenus

Formulation des constructions vaccinales

L'ensemble des constructions vaccinales envisagées a pu être formulé. La construction originale, de type SUV, présentait un diamètre moyen inférieur à 100 nm, de distribution étroite avec un taux de couplage peptidique supérieur à 75%, quelle que soit la proportion d'adjuvant. L'incorporation de ces liposomes dans un gel d'HPMC s'est avérée optimale pour 1% d'HPMC (P/V) sans modification des caractéristiques du vaccin (diamètre et couplage peptidique). La présence du peptide CMT2 dans la composition des liposomes SUV, sans modifier le diamètre moyen des liposomes et le taux de couplage peptidique, a toutefois élargi leur distribution. Les liposomes REV présentaient un diamètre d'environ 230 nm avec une distribution étroite. Le taux de couplage peptidique pour ce vaccin était de l'ordre de 70%. Pour le vaccin MLV, nous avons obtenu une population polydisperse de liposomes de diamètre compris entre 100 et 1000 nm et un taux de couplage peptidique de l'ordre de 80%. L'ensemble des protocoles de formulation a conduit à des résultats reproductibles.

Evaluation de l'activité immunostimulatrice et de l'efficacité antitumorale des différentes constructions vaccinales

Dans un premier temps, cette évaluation a été conduite avec le vaccin original par voie pulmonaire ou nasale. Dans un deuxième temps, nous nous sommes concentrés sur la voie nasale, cette voie étant plus facilement transposable chez l'Homme. L'ensemble des formulations a alors été testé.

L'analyse des liquides bronchoalvéolaires ou nasaux et la restimulation des splénocytes *ex vivo* ont montré une activité immunostimulatrice locale et systémique du vaccin original suite à son administration respiratoire. La vaccination prophylactique par cette voie a conduit à une efficacité antitumorale totale, quel que soit le type de tumeur, pulmonaire ou solide, sachant que 100% des souris non vaccinées ont développé des tumeurs. En vaccination pulmonaire thérapeutique, la construction originale a montré une efficacité partielle contre des tumeurs pulmonaires, mais aucune efficacité face à des tumeurs solides.

Après administration nasale, le vaccin original conduit également à une efficacité antitumorale locale après vaccination prophylactique, mais qui reste partielle. Cette activité dépend de la dose de vaccin ou de la proportion d'adjuvant incorporé aux liposomes.

L'impact d'un certain nombre de paramètres physicochimiques susceptibles d'influencer l'efficacité de la construction d'origine a été évalué dans le cadre d'une vaccination prophylactique par voie nasale contre des tumeurs locales. Les résultats de ces travaux n'ont pas montré d'influence du diamètre et de la structure des liposomes dans l'efficacité du vaccin. En revanche, la fluidité membranaire de ces liposomes pourrait être un facteur favorisant son efficacité. Les deux stratégies visant à favoriser le contact du vaccin avec la muqueuse nasale n'ont pas apporté, à ce stade, de résultats probants, tout comme la stratégie de ciblage des cellules M.

Conclusion

L'immunothérapie antitumorale est en pleine expansion, et la vaccination en particulier est une des stratégies envisagées. L'intérêt des vecteurs nanoparticulaires dans ce cadre est évident, mais ils demeurent essentiellement exploités pour vectoriser des protéines. Les vaccins peptidiques dans la vaccination antitumorale présentent pourtant de multiples atouts comme leur spécificité, leur simplicité de fabrication et la possibilité de réaliser des constructions entièrement synthétiques. Dans ce cadre, nos travaux de thèse ont permis de mettre en évidence un intérêt indéniable des vaccins peptidiques nanoparticulaires à base de liposomes dans la vaccination antitumorale par voie respiratoire et/ou nasale. De plus, ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives de recherche pour optimiser le développement de ces vaccins synthétiques.

Publication et communications

Publication

1. Z. Kakhi, F. Pons, L. Bourel, B. Frisch, B. Heurtault, et al. Respiratory administration of highly versatile liposomal constructs for antitumoral vaccination. En préparation

Communications

1. Z. Kakhi, F. Pons, M. Ittel, B. Frisch, B. Heurtault, Pulmonary administration of highly versatile liposomal constructs for antitumoral vaccination, GTRV, Paris, 2012. Communication orale

2. Z. Kakhi, F. Pons, M. Ittel, B. Frisch, B. Heurtault. Antitumoral vaccination with highly versatile liposomal constructs by respiratory route. Journée scientifique de l'UMR 7199, 2012, Illkirch. Communication orale

3. Z. Kakhi, F. Pons, M. Ittel, B. Frisch, B. Heurtault, Intranasal immunization with a liposomal vaccine prevents the development of lung tumor in the mouse, GTRV, Bruxelles, 2011. Communication affichée

Avant-propos

Le cancer est une cause majeure de mortalité dans le monde, avec 8,2 millions de décès en 2012. Actuellement, son traitement repose essentiellement sur la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie. Cependant, ces approches sont invasives, accompagnées de lourds effets secondaires et/ou coûteuses, avec une efficacité qui dépend de multiples facteurs (type et stade du cancer, âge et hygiène de vie du patient, etc.). Ainsi, face à la progression constante des maladies cancéreuses, la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques reste primordiale.

Avec l'identification des antigènes tumoraux tels que la protéine ErbB2 (qui sera utilisée comme cible dans ce travail) et les progrès dans la compréhension de la réponse immunitaire antitumorale, la vaccination est devenue un champ d'investigation prometteur pour le développement de nouveaux traitements du cancer. En effet, le système immunitaire d'un organisme sain est capable de reconnaître les antigènes tumoraux et de développer une réponse immunitaire spécifique visant à éliminer les cellules tumorales exprimant ces antigènes. La vaccination antitumorale vise à déclencher et à amplifier cette réponse immunitaire naturelle, aussi bien dans un contexte prophylactique que thérapeutique.

Une des approches envisagées pour concevoir des vaccins antitumoraux est l'utilisation de vecteurs nanoparticulaires permettant de véhiculer et de présenter aux cellules du système immunitaire, et en particulier aux cellules présentatrices de l'antigène, un ou plusieurs peptides antigéniques issus d'antigènes tumoraux. Parmi ces vecteurs, les liposomes sont largement utilisés. Vésicules à cœur aqueux constituées de bicouches phospholipidiques similaires aux membranes biologiques, les liposomes peuvent vectoriser des substances lipophiles insérées dans leur bicouche lipidique, des substances hydrophiles encapsulées dans leur cavité aqueuse et/ou des molécules fixées à leur surface. Ces structures peuvent également subir des modifications de surface visant à moduler leur pharmacocinétique ou à cibler un tissu ou un type cellulaire, ce qui leur confère une versatilité particulièrement intéressante. Enfin, les liposomes sont biocompatibles et non immunogènes. Toutefois, à ce jour, peu d'études ont exploré le potentiel des liposomes pour la vaccination antitumorale.

Depuis quelques années, beaucoup d'études se concentrent sur la vaccination par voies muqueuses, dont la voie respiratoire. En effet, la muqueuse respiratoire renferme des tissus lymphoïdes secondaires contenant toutes les cellules immunitaires impliquées dans le développement d'une réponse immunitaire adaptative spécifique (cellules B, cellules TCD4⁺ ou CD8⁺, macrophages et cellules dendritiques). Elle est par ailleurs facile d'accès et non

invasive. Enfin, l'administration d'un vaccin par cette voie conduit à une réponse immunitaire locale et distale, ce qui pourrait permettre la vaccination à distance. La voie respiratoire est déjà étudiée, voire utilisée en vaccination antibactérienne et antivirale (Fluenz[®]).

L'objectif du travail de thèse a été de concevoir des constructions vaccinales minimalistes, entièrement synthétiques, destinées à la vaccination antitumorale par voie respiratoire, et d'explorer leur activité et leur efficacité *in vivo* chez la souris. Avant de présenter les matériels et méthodes utilisés ainsi que les résultats obtenus au cours de ces travaux, nous présenterons un état de l'art du sujet décomposé en 3 grandes parties. La première partie sera consacrée à l'immunité antitumorale et l'immunothérapie des cancers. Dans une seconde partie, nous verrons les principaux vecteurs nanoparticulaires utilisés en vaccination ainsi que leurs intérêts et leurs applications, avant de développer plus particulièrement les liposomes. La troisième partie portera sur la voie respiratoire, comme voie d'administration de vaccins.

Introduction

1. Immunité et immunothérapie antitumorale

1.1. Rappels sur l'immunité

L'immunité comprend l'ensemble des mécanismes de défense de notre organisme face aux agressions externes ou internes reconnues comme pathogènes (virus, bactéries, parasites, dommages tissulaires, ...). Ces mécanismes sont divisés en deux systèmes, **l'immunité innée** (ou naturelle) et **l'immunité adaptative** (ou acquise), offrant 3 lignes de défense à l'organisme (figure 1).

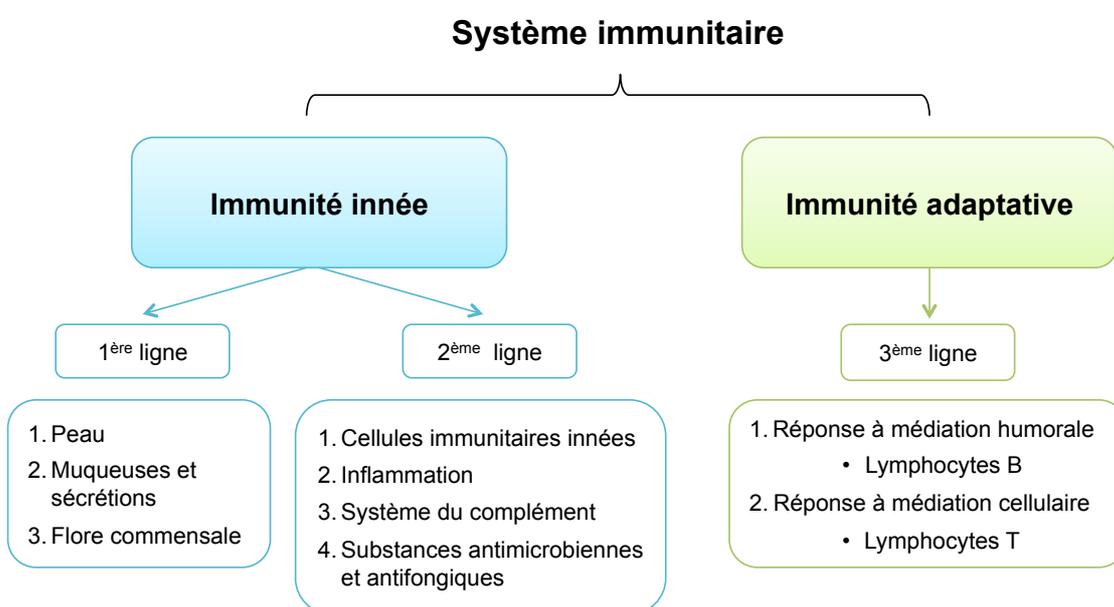


Figure 1 : Différentes lignes de défense du système immunitaire inné et adaptatif.

1.1.1. Immunité innée

L'immunité innée, omniprésente et préexistante à l'agression, constitue la première ligne de défense de l'organisme face aux agressions. Elle repose tout d'abord sur un ensemble de **barrières anatomo-physiologiques**, telles que la peau et les muqueuses. Ces barrières sont physiquement étanches, grâce aux **jonctions serrées intercellulaires**, et disposent de moyens mécaniques et/ou chimiques d'éliminer ou de neutraliser les agents pathogènes. Ainsi, au niveau de la peau, la desquamation continue de la couche cornée permet d'éliminer les agents pathogènes. Au niveau de la muqueuse respiratoire, l'action concertée du **mucus** et des cils présents à la surface des cellules épithéliales permet de

capturer et de faire remonter le long du tractus respiratoire les micro-organismes ou les particules inhalés. Par ailleurs, le mucus ou les autres liquides sécrétés au niveau des muqueuses (larmes, salive) contiennent différentes **protéines ou polypeptides à activité antimicrobienne** tels que le lysozyme, les défensines, la lactoferrine ou les interférons (IFN) de type I. Enfin, en réponse à une agression, l'épithélium est capable de produire tout un arsenal de **cytokines et de chimiokines** permettant le recrutement des cellules immunitaires nécessaires à l'élimination du pathogène. A titre d'exemple, la figure 2 illustre les mécanismes de défense innée de l'épithélium respiratoire contre les virus (Vareille et al., 2011).

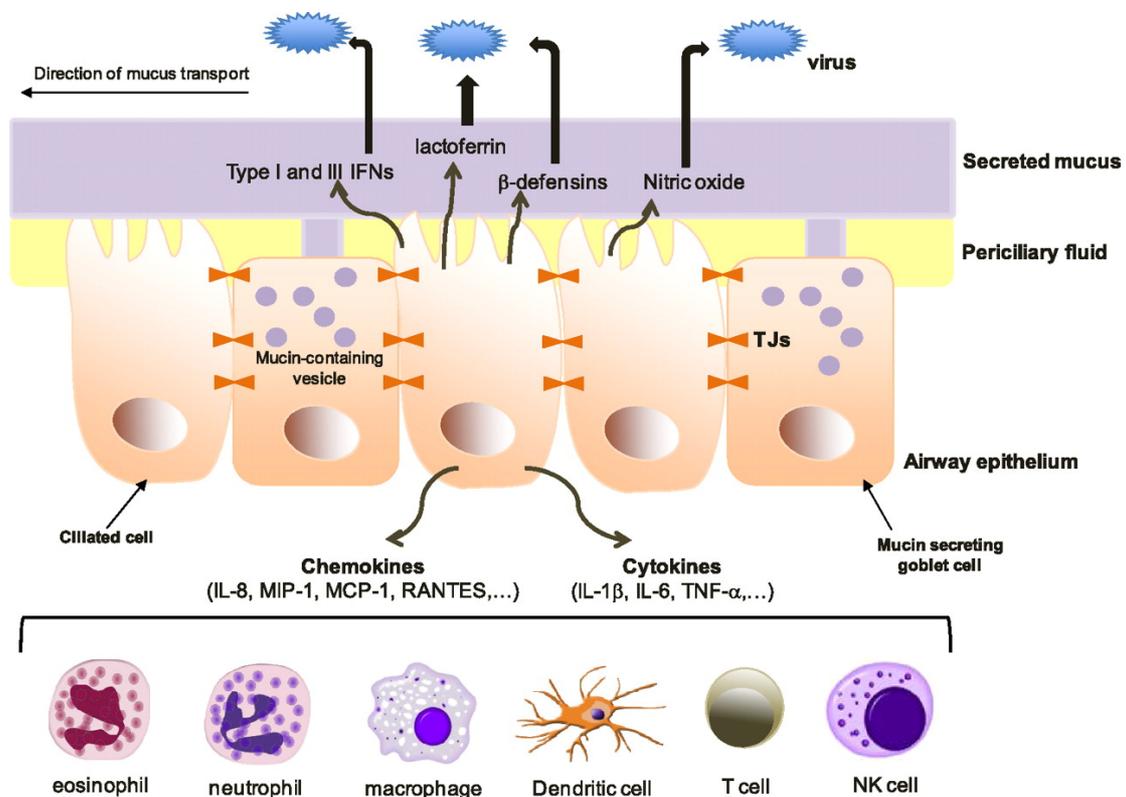


Figure 2 : Rôle de l'épithélium respiratoire dans l'immunité innée (Vareille et al., 2011).

Dans certains cas, malgré des barrières anatomiques bien développées, les agents pathogènes réussissent à engendrer une infection. Une **réponse inflammatoire rapide**, intervenant dans les heures suivant l'infection, se met alors en place. Cette réponse met en jeu les cellules épithéliales qui constituent la surface des muqueuses, mais surtout tout un réseau de cellules immunitaires sentinelles et des facteurs solubles. Les cellules immunitaires

impliquées dans cette réponse comprennent des cellules spécialisées dans la **phagocytose** (macrophages et neutrophiles) ou la **cytotoxicité** (cellules NK (en anglais, Natural killer)), dont l'activation vise à éliminer ou tuer le pathogène. Les facteurs solubles incluent des **protéines du complément** permettant la lyse des pathogènes ou leur opsonisation en vue de leur phagocytose, mais également des **cytokines/chimiokines**. Produites par les cellules épithéliales ou les cellules immunitaires innées elles-mêmes, ces cytokines/chimiokines contribuent à la maturation et/ou au recrutement des cellules immunitaires, et donc à l'amplification de la réponse innée initiale (figure 3).

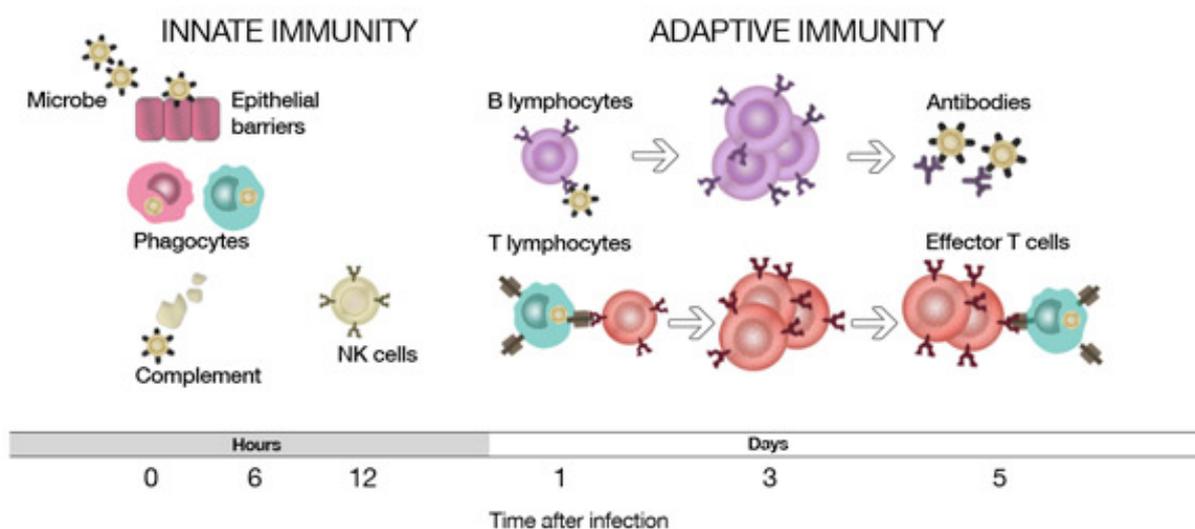


Figure 3 : Principaux mécanismes de l'immunité innée et adaptative et leur chronologie (<http://www.brianlischer.com>).

La réponse immunitaire innée est initiée par la reconnaissance, par les cellules épithéliales ou les cellules immunitaires innées, de **signaux de dangers**. Ces signaux de danger sont soit des **PAMP** (en anglais, Pathogen-Associated Molecular Pattern), c'est-à-dire des motifs moléculaires spécifiques des pathogènes (flagellines, polysaccharides ou acides nucléiques), soit des **DAMP** (en anglais, Damage-Associated Molecular Pattern), c'est-à-dire des molécules produites par les cellules de l'hôte lors de dommages cellulaires (acide urique, défensines,...). La reconnaissance de ces signaux par les cellules épithéliales et les cellules immunitaires innées se fait grâce à une multitude de récepteurs membranaires ou intracellulaires exprimés par les cellules de l'hôte, les **PRR** (en anglais, Pattern Recognition Receptor) (Takeuchi and Akira, 2010). La reconnaissance des PAMP ou des DAMP par les

PRR, active, au sein de la cellule de l'hôte, une cascade de signalisation aboutissant, selon la cellule concernée, au déclenchement de la phagocytose ou de la cytotoxicité, ou à la production de cytokines et/ou de chimiokines.

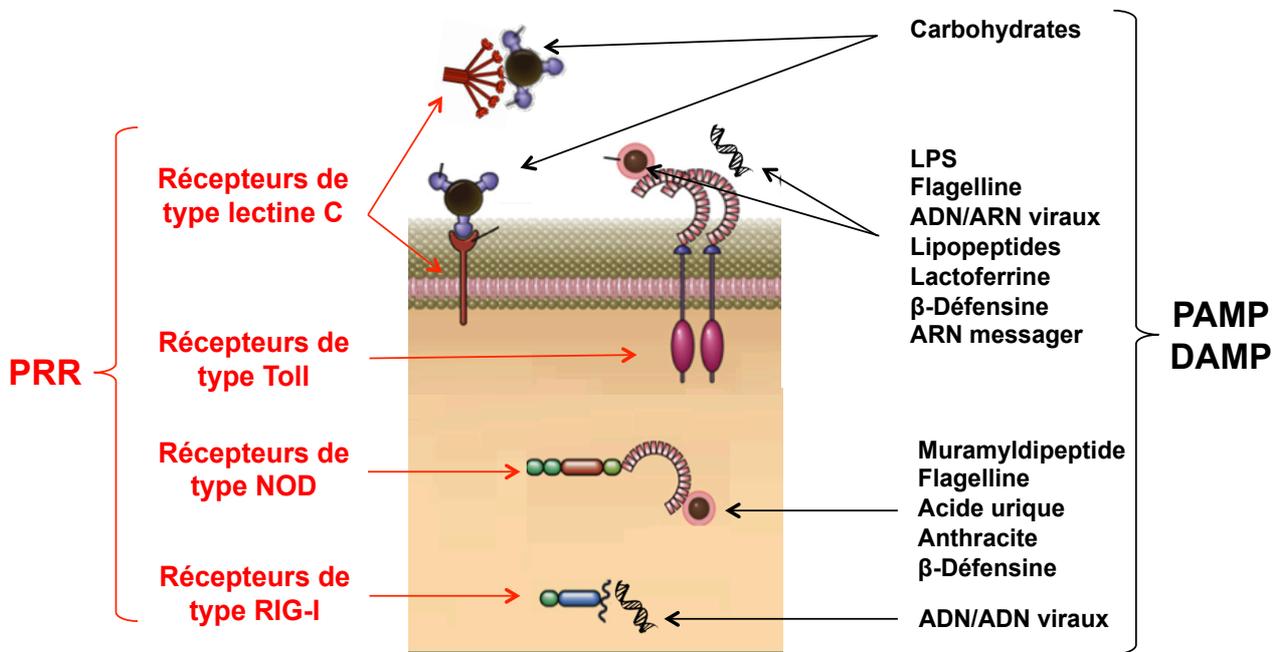


Figure 4 : Principaux PRR et leurs ligands (Chotirmall et al., 2011; Fukata et al., 2009; Takeuchi and Akira, 2010). ADN (acide désoxyribonucléique), ARN (acide ribonucléique), LPS (lipopolysaccharide).

A ce jour, quatre principales familles de PRR, classés en récepteurs transmembranaires, cytosoliques et sécrétés, ont été décrites chez l'homme et la souris (figure 4). Parmi ces 4 familles de PRR, la plus étudiée est la famille des **récepteurs Toll-Like** (TLR), qui comprend 10 membres chez l'homme et 12 chez la souris (Takeuchi and Akira, 2010). Protéines transmembranaires hautement conservées au cours de l'évolution, les TLR sont spécialisés dans la reconnaissance d'une large gamme de PAMP ou de DAMP, dont le plus connu est le LPS (tableau 1). Ils reconnaissent leurs ligands sous la forme de monomère ou d'hétérodimère.

Tableau 1 : Récepteurs TLR et leurs ligands chez l'homme et la souris (Chotirmall et al., 2011; Fukata et al., 2009; Takeuchi and Akira, 2010).

TLR	PAMP	DAMP
TLR 1/2	Lipopeptides diacylés	β -defensine-3
TLR2	Lipoprotéines Peptidoglycane	Sérum amyloïde A, élastases, surfactant A et D, fragments d'acide hyaluronique
TLR2/6	Lipoprotéines diacylées	Fragments d'acide hyaluronique Protéoglycane
TLR3	ARN double brin siARN	ARN messenger ARNt
TLR4	LPS	Lactoferrine, acide gras saturés, fibronectine, β -defensine-2, élastases
TLR5	Flagelline	
TLR7	ARN simple brin Imidazoquinolines	ARN simple brin
TLR7/8	sARN riche en guanosine et uridine	Anticorps anti-phospholipides
TLR9	CpG non-méthylés d'ADN	Complexe IgG-chromatine
TLR10	Profiline	
TLR11/12 (souris)	Profiline	

1.1.2. Immunité adaptative

L'immunité adaptative est mise en jeu lorsque le système immunitaire inné ne parvient pas à éliminer l'agent pathogène. Contrairement à l'immunité innée, elle requiert du temps pour se mettre en place, mais elle vise à éliminer spécifiquement, et plus efficacement, le pathogène. Pour cela, elle fait intervenir la **reconnaissance d'antigènes ou d'épitopes issus de l'agent pathogène** par les cellules effectrices de l'immunité adaptative que sont les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB) (figure 3). Selon la cellule lymphocytaire impliquée dans cette reconnaissance (LB ou LT), la réponse effectrice qui découle de cette reconnaissance est une **réponse à médiation cellulaire** ou une **réponse à médiation humorale** (figure 5).

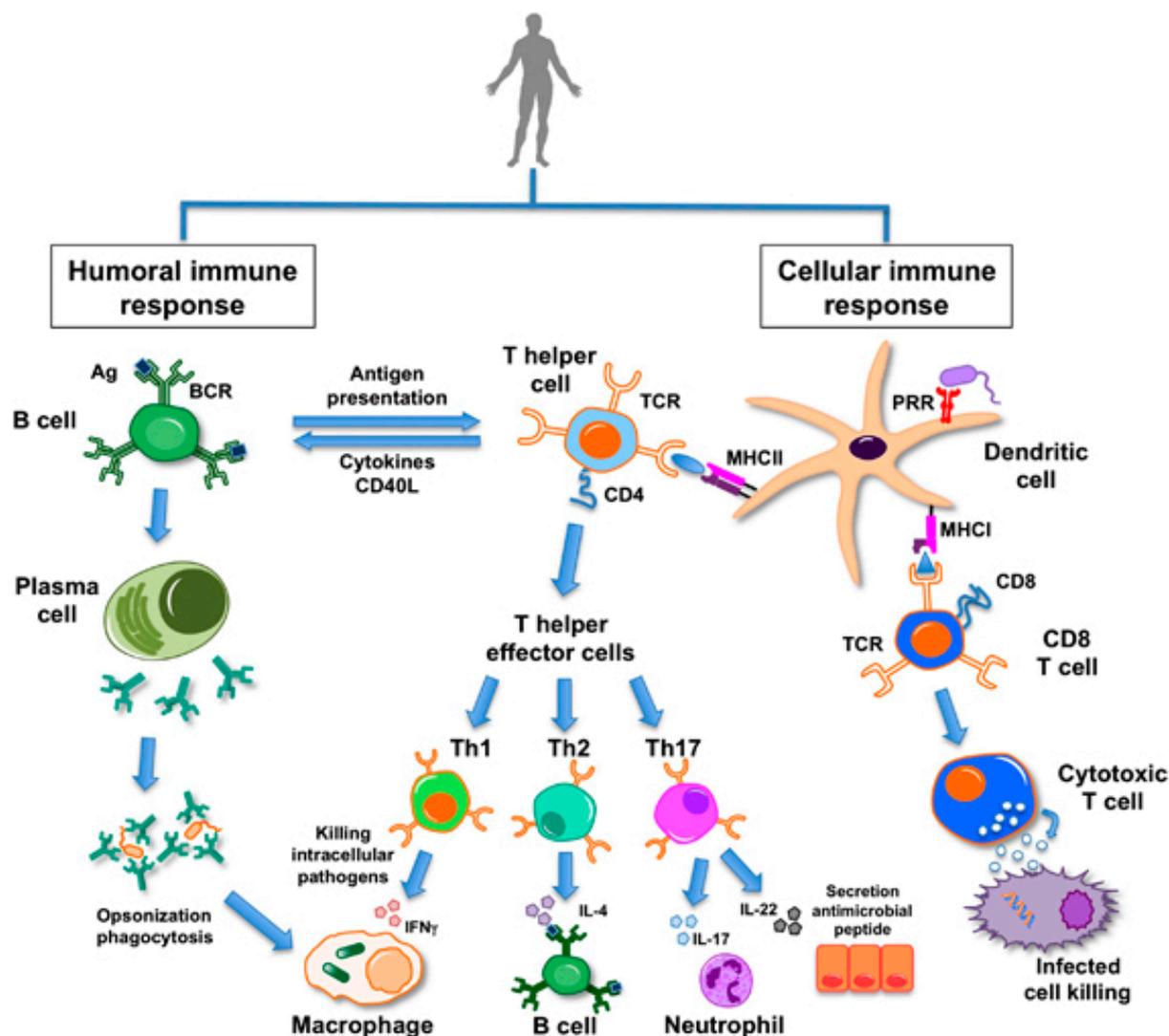


Figure 5 : Réponse adaptative à médiation humorale et cellulaire (www.thelifeofapremed.tumblr.com).

La réponse à médiation cellulaire est initiée par la capture de l'agent pathogène par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) immatures (figure 6). À la suite de cette capture, les CPA apprêtent les antigènes issus du pathogène en épitopes TCD8⁺ ou TCD4⁺ ou en épitopes B, tout en subissant un processus de maturation caractérisé par une augmentation de leur capacité à présenter efficacement l'antigène. Les CPA devenues matures migrent alors vers les organes lymphoïdes locaux où elles présentent le(s) épitope(s) TCD8⁺ et TCD4⁺ issus du pathogène aux lymphocytes TCD8⁺ et TCD4⁺ naïfs via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) I et II, respectivement. Les LT reconnaissent le complexe épitope-molécule du CMH présenté par les CPA grâce à leur TCR (en anglais, T Cell Receptor). Cette reconnaissance est à l'origine de la formation d'une synapse

immunologique et d'un flux d'information assuré par les molécules de costimulation (figure 6) (Grakoui et al., 1999).

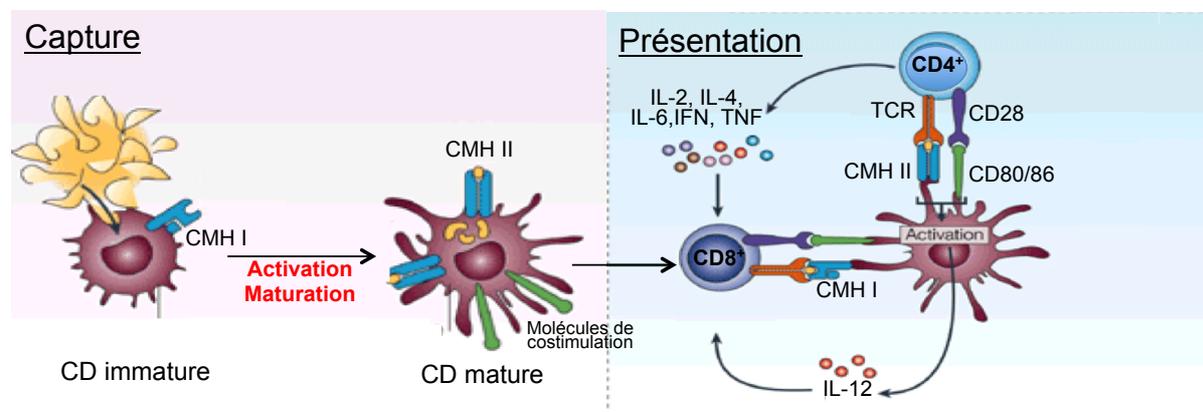


Figure 6 : Capture et présentation de l'agent pathogène par les CPA (d'après Gaborilovich, 2004).

Suite à cette activation, les cellules T immatures ayant reconnu un épitope se différencient en cellules T effectrices, mémoires ou régulatrices ou en cellules T tueuses (figure 7). Les lymphocytes TCD8⁺ se différencient en lymphocytes T cytotoxiques (LTC), ayant pour rôle de tuer les cellules cibles présentant ce même épitope par différents mécanismes : la voie de signalisation du TNF/TNF-R, la voie de signalisation Fas/FasL ou la production de médiateurs cytotoxiques (granzymes/perforine) (Gachlin et al., 2001). Après activation, les cellules TCD4⁺, dont la fonction majeure est de réguler la réponse immunitaire induite, prolifèrent et se différencient en cellules effectrices Th1, Th2 ou Th17 (Bettelli et al., 2008; Luckheeram et al., 2012). Les cellules Th1 secrètent principalement de l'IFN- γ et de l'IL-2 qui favorisent la prolifération et la différenciation des cellules TCD8⁺ en LTC et cellules CD8⁺ mémoires. Les cellules Th2 participent à l'activation des cellules B en produisant de l'IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, GM-CSF et TNF- β (Gachlin et al., 2001; Luckheeram et al., 2012). Les cellules Th17 produisent principalement de l'IL-17 et de l'IL-22. L'IL-17 induit la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , MIP-2) et conduit ainsi au recrutement et à l'activation des neutrophiles et des macrophages (Mills, 2008; Vignali et al., 2008).

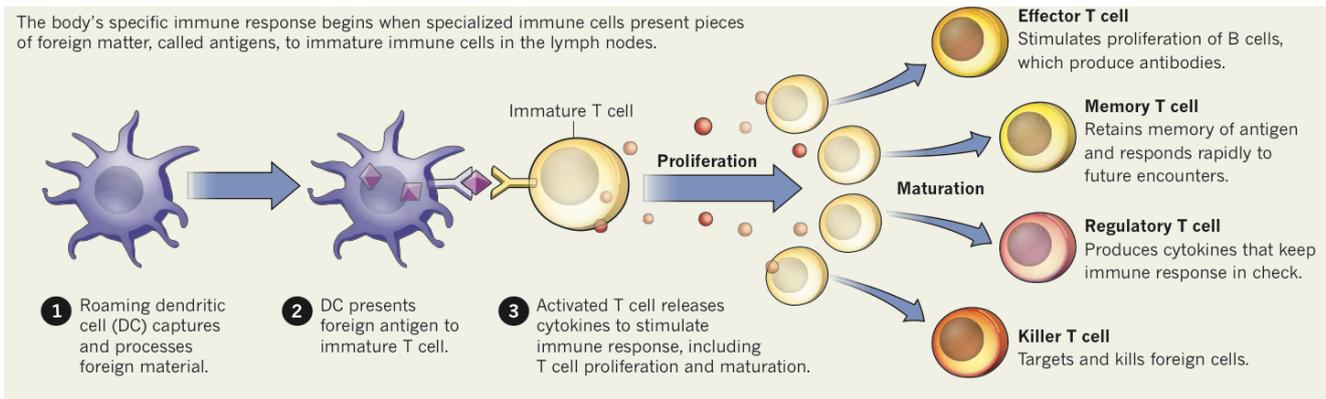


Figure 7 : Présentation de l'antigène par les CD et prolifération et maturation des cellules T (Elert, 2013).

La **réponse à médiation humorale** est initiée par la reconnaissance des antigènes de l'agent pathogène par les LB naïfs via leur BCR (B Cell Receptor) (figure 5). Cette reconnaissance permet l'activation et l'expansion clonale des LB spécifiques de l'antigène, ainsi que leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps ou en LB mémoires. Les fonctions effectrices sont assurées par les anticorps et dépendent de la classe d'immunoglobulines (Nardelli-Haefliger et al., 2005) qui sera produite par les LB, à savoir IgM, IgG, IgA ou IgE. Parmi ces classes d'anticorps, les IgG permettent, entre autres, la neutralisation et l'opsonisation des pathogènes en vue de leur phagocytose (Figure 8a), ainsi que la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (en anglais, Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity, ADCC) assurée par les cellules NK (Figure 8b). Les IgM participent à l'activation du complément, alors que les IgA contribuent à la défense des muqueuses en assurant la neutralisation des pathogènes ou de leurs toxines.

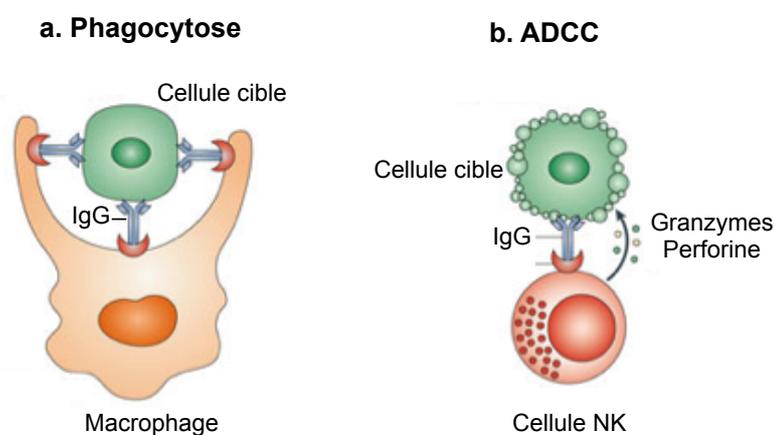


Figure 8 : Phagocytose (a) et cytotoxicité cellulaire (b) dépendante des anticorps (d'après Weiner et al., 2010).

L'activation des LB spécifiques des antigènes est thymo-dépendante ou thymo-indépendante, selon qu'elle nécessite ou non la collaboration des LTh (Lymphocyte T helper). En effet, les LB sont activés par une large variété d'antigènes, parmi lesquels des protéines, des LPS et des lipides. L'activation des LB par les antigènes protéiques nécessite la coopération des cellules TCD4⁺. Dans ce cas, la liaison de l'antigène sur le BCR se traduit par l'internalisation du complexe antigène-BCR, suivie de l'apprêtement de l'antigène et de la présentation des épitopes TCD4⁺ issus de cet apprêtement à la surface du LB. Les cellules TCD4⁺ reconnaissent ensuite, grâce à leur TCR, les épitopes TCD4⁺ associés aux molécules du CMH-II à la surface des LB. Cette reconnaissance se traduit par l'activation des cellules TCD4⁺ favorisée par l'interaction des molécules de costimulation CD80/86-CD28. Le LTh activé permet alors à son tour l'activation et la différenciation des LB, ainsi que le changement d'isotype des Ig grâce à l'interaction des molécules de costimulation CD40-CD40L et la sécrétion de cytokines (IL-4, IL-13, IFN- γ) (Chen and Jensen, 2008; Kindt et al., 2008). L'activation des LB par les antigènes non protéiques, tels les LPS, se fait sans intervention des TCD4⁺. Ces antigènes, qui contiennent souvent des alignements multivalents du même épitope, sont capables d'interconnecter plusieurs BCR sur un même LB, ce qui est alors suffisant pour stimuler la prolifération et la différenciation du LB (Gachlin et al., 2001).

1.1.3. Interrelations entre réponse innée et réponse adaptative

Pendant longtemps, les réponses immunitaires innée et adaptative ont été considérées comme des entités bien distinctes, et la réponse innée considérée comme mineure dans la défense de l'organisme. Cependant, au cours des dernières décennies, le regain d'intérêt des chercheurs pour la compréhension des mécanismes de l'immunité innée a permis de mettre en évidence un certain nombre d'interrelations entre réponse innée et réponse adaptative.

Parmi ces interrelations, citons tout d'abord le rôle désormais reconnu comme essentiel de l'immunité innée dans **l'induction et l'orientation de la réponse adaptative**. En effet, lors de l'initiation de la réponse adaptative, l'activation des LT naïfs par les CPA requiert trois signaux : un signal de spécificité délivré par le TCR qui a reconnu un complexe CMH-épitope à la surface des CPA, un signal de costimulation délivré par les CD80/CD86 et CD40 de la CPA qui reconnaissent, respectivement, les CD28 et CD40L exprimés par le LT, et un signal d'immunomodulation par les cytokines. Or, les deux derniers signaux cités sont sous le contrôle des récepteurs de l'immunité innée, que sont les PRR. En effet, la reconnaissance

des PAMP du pathogène par les PRR des CPA conduit à une régulation positive des molécules de costimulation de la CPA. Elle permet également la sécrétion par les CPA de cytokines permettant d'amplifier et d'orienter la réponse lymphocytaire, parmi lesquelles l'IL-12 ou l'IL-4 permettant la différenciation des cellules TCD4⁺ en cellules effectrices Th1 ou Th2, respectivement (figure 9) (Medzhitov, 2001; Medzhitov and Janeway, 1997).

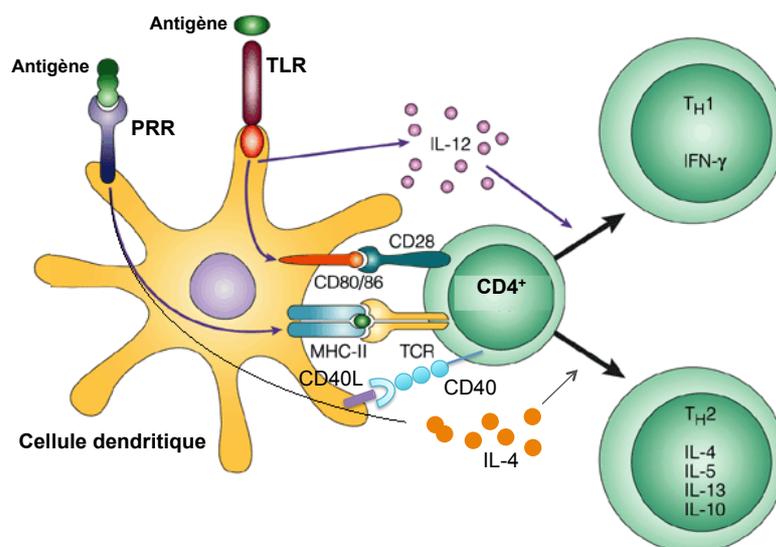


Figure 9 : Rôle des PRR dans l'orientation de la réponse adaptative (d'après Buer and Balling, 2003).

L'interrelation entre réponse innée et réponse adaptative résulte également de la **présence de PRR sur les cellules T et B**. Certaines sous-populations de cellules B expriment des TLR (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-6, TLR-7 et TLR-9) importants pour le développement de la réponse anticorps ou des réponses mémoires. De même, les cellules T expriment des TLR importants pour leur survie (TLR-9), leur prolifération et la production de cytokines (TLR-2/5) (Michallet et al., 2013).

A l'inverse, **le système immunitaire adaptatif peut stimuler les mécanismes de l'immunité innée**. Par exemple, l'IL-2 produite par les cellules TCD4⁺ active les cellules NK (en anglais, Natural killer) et permet la production par ces cellules d'IFN- γ , cytokine à activités antivirale, antiparasitaire et antiproliférative (Kerdiles et al., 2013). En outre, les anticorps produits par les LB opsonisent le pathogène et facilitent ainsi sa phagocytose par les cellules de l'immunité innée telles que les macrophages.

1.2. Immunité antitumorale

1.2.1. Rôle du système immunitaire dans le développement tumoral

Il est aujourd'hui clairement établi que notre système immunitaire joue **un rôle central** dans le développement tumoral au sein de notre organisme. Selon la théorie de l'**immunosurveillance** des tumeurs, énoncée par Burnet et Thomas, notre système immunitaire serait capable de détecter et de détruire les cellules cancéreuses, et donc de bloquer le développement des tumeurs. Selon la théorie plus globale de l'**immunoédition** des cancers (« cancer immunoeediting »), proposée par Schreiber et ses collaborateurs, le système immunitaire **protègerait l'hôte** de la mise en place d'un foyer tumoral, mais **faciliterait également la progression tumorale** en façonnant le phénotype des cellules cancéreuses. En effet, la théorie de l'immunoédition décompose la progression tumorale en trois étapes : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (Dunn et al., 2002) (figure 10). La première phase d'élimination correspondrait à une phase de détection et d'éradication des cellules tumorales par le système immunitaire inné et adaptatif, selon le concept d'immunosurveillance proposé par Burnet et Thomas. Survienrait ensuite une phase d'équilibre, au cours de laquelle les cellules tumorales non détruites pendant la phase d'élimination seraient contenues par le système immunitaire. Cette phase, pouvant durer plusieurs années, permettrait l'émergence de variants tumoraux moins immunogènes et capables de survivre au système immunitaire dans un environnement immunologique intact. Puis, survienrait la phase finale d'échappement, au cours de laquelle les variants sélectionnés ou « sculptés » esquiveraient complètement la surveillance et la pression du système immunitaire. Ces variants proliféreraient de manière incontrôlée, malgré un organisme immunocompétent, pour aboutir à une tumeur cliniquement observable. Cette théorie expliquerait pourquoi des millions de personnes saines et immunocompétentes meurent chaque année d'un cancer.

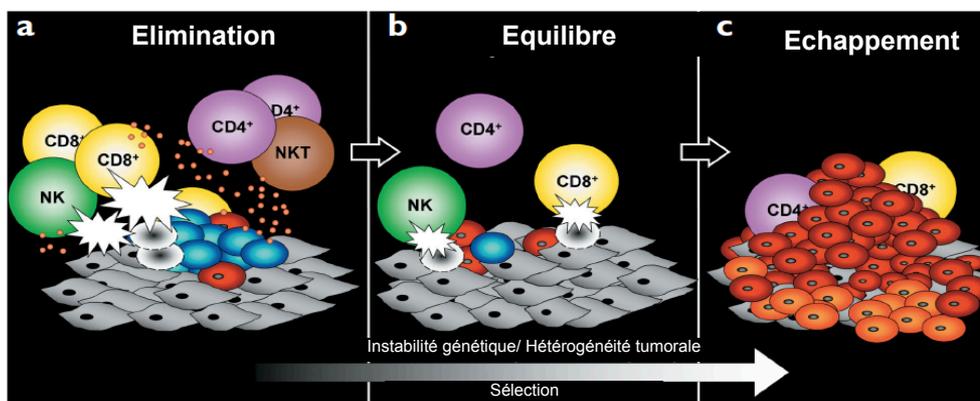


Figure 10 : Les trois étapes de la progression tumorale selon la théorie de l'immunoédition (Dunn et al., 2002).

Dans ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement au rôle protecteur du système immunitaire dans le développement tumoral, dont la découverte et la compréhension ont permis d'envisager la vaccination comme une approche thérapeutique ou prophylactique des cancers.

1.2.2. Arguments en faveur d'un rôle protecteur du système immunitaire dans le développement tumoral

Un certain nombre d'arguments sont en faveur d'un rôle protecteur du système immunitaire dans le développement tumoral, et de la possibilité d'utiliser cette propriété en thérapeutique.

Les premières évidences d'une possible élimination des tumeurs par le système immunitaire datent du XVIII^{ème} siècle, lorsqu'il est remarqué que les infections fébriles chez certains patients s'accompagnent d'une rémission du cancer. A la fin du XIX^{ème} siècle, William Coley apporte des arguments en faveur de cette hypothèse, en montrant qu'une stimulation du système immunitaire par l'injection d'un cocktail de bactéries inactivées (appelé toxines de Coley) chez plus de 1000 patients atteints de sarcomes (os et tissus mous) permet une rémission progressive, voire même une disparition de la tumeur (McCarthy, 2006). Par ailleurs, au tout début du XX^{ème} siècle, Paul Ehrlich, en s'inspirant des travaux de Louis Pasteur, vaccine pour la première fois avec succès des animaux à l'aide de cellules tumorales affaiblies (Dermime et al., 2002; Ostrand-Rosenberg, 2008).

A ces premières évidences historiques, s'ajoutent aujourd'hui **de nombreuses données cliniques et expérimentales** acquises au cours des 50 dernières années, qui viennent confirmer, mais surtout expliquer, le rôle protecteur du système immunitaire au cours du développement tumoral. Sur le plan clinique, une incidence accrue des cancers aux âges extrêmes de la vie (périodes durant lesquelles le système immunitaire est moins efficace), ainsi que chez des individus immunodéprimés ou des patients traités par immunodépresseurs, a été démontrée, soulignant le rôle protecteur du système immunitaire. Par ailleurs, une infiltration des tumeurs par des LT, des cellules NK ou des cellules NKT capables d'éliminer les cellules cancéreuses, a été démontrée. Dans certaines études épidémiologiques, l'intensité de l'infiltrat en TCD8⁺ a été corrélée positivement avec la survie globale des patients, suggérant que la défense contre les tumeurs implique le système immunitaire adaptatif. Sur le

plan expérimental, des études sur différents modèles de souris immunodéficientes (souris SCID, souris déficientes en RAG-1 et RAG-2) ont consolidé les observations faites chez l'homme d'une émergence des cancers liée à un déficit immunitaire. De même, des études de greffe allogénique de cellules tumorales chez un animal préalablement immunisé ou de transfert de lymphocytes provenant d'un animal ayant rejeté une tumeur ont confirmé l'existence d'une réponse immunitaire antitumorale et de l'implication de LT spécifiques des tumeurs dans cette réponse.

Parmi les autres données aujourd'hui disponibles, soulignons, enfin, la découverte des **cytokines antitumorales** IL-2 et IFN- α , et surtout, celle des **antigènes tumoraux** reconnus par les cellules T, par Thierry Boon et ses collaborateurs (Boon et al., 1994; Boon and Eynde, 1995). La découverte des antigènes tumoraux a apporté la preuve moléculaire de la reconnaissance spécifique des cellules tumorales par le système immunitaire adaptatif et a ouvert la voie à la vaccination antitumorale spécifique. A ce jour, de nombreux antigènes tumoraux ont été identifiés. Ces antigènes peuvent être classés en 5 groupes : les antigènes spécifiques des tumeurs, les antigènes testiculaires, les antigènes de différenciation, les antigènes surexprimés et les antigènes viraux (Lacave et al., 2005; Van den Eynde and van der Bruggen, 1997). Le groupe des antigènes spécifiques des tumeurs rassemble des antigènes qui ne sont exprimés que par les cellules tumorales. Ces antigènes sont des protéines uniques, issues de la mutation ou de la fusion de gènes. Ils sont caractéristiques de la tumeur et indispensables à son développement. Les antigènes testiculaires sont exprimés dans 75% des mélanomes et divers cancers humains, mais sont non détectables dans les tissus normaux, exceptés les testicules et le placenta. Les antigènes de différenciation sont exprimés dans les cellules tumorales, mais aussi dans les cellules normales à l'origine de la tumeur. Le groupe des antigènes surexprimés réunit des protéines du soi, ubiquitaires et exprimées aussi bien par des tissus sains que dans divers types de tumeurs. Cependant, leur taux d'expression est largement plus élevé dans les cellules tumorales conduisant à une réponse immunitaire (Buonaguro et al., 2011). La protéine **Her-2/neu ou ErbB2**, qui a été utilisée dans les travaux de cette thèse, fait partie de ce groupe. Les antigènes viraux sont des protéines virales qui sont exprimées par les cellules transformées suite à l'infection par un virus oncogène. En effet, on estime que 20% des cancers ont une origine virale (Wang et al., 2007). Le tableau 2 regroupe quelques exemples de ces antigènes identifiés chez l'Homme.

Tableau 2 : Liste non exhaustive des antigènes tumoraux identifiés chez l'Homme (Lacave et al., 2005) ; Cancer immunity, www.cancerimmunity.org)

Catégories	Antigènes tumoraux	Types de tumeurs
Spécifiques	β-caténine α-actinine-4 CASP-5 hsp 70-2 K-ras P53	Mélanome Carcinome pulmonaire Carcinome gastrique et colorectal Carcinome rénal Adénocarcinome pancréatique Cancer de l'œsophage et du foie
Testiculaires	MAGE LAGE BAGE NY-ESO-1 SSX-2	Mélanome Cancer des ovaires Cancer du sein Cancer de la vessie Carcinome pulmonaire
Antigènes de différenciation	CEA gp100/Pmel 17 Mélan-A/MART-1 Mammaglobine-A PSA	Carcinome gastrique Mélanome Cancer du sein Cancer de la prostate
Surexprimés	ErbB2 Muc1 hTERT VEGF	Cancer du sein, vessie et des ovaires Cancer des poumons Glioblastome Mélanome
Viraux	HPV (E6,E7) VHB/VHC HHV8 HTLV1 EBV	Cancer de col de l'utérus Hépatocarcinome Sarcome de Kaposi Leucémie Lymphome

La question aujourd'hui n'est donc plus de savoir si notre système immunitaire nous protège ou non du cancer et comment il détecte les cellules tumorales, mais plutôt de comprendre comment il détruit ces cellules. En effet, la connaissance des mécanismes impliqués dans l'immunité antitumorale des cancers est essentielle au développement de vaccins antitumoraux efficaces et sûrs.

1.2.3. Mécanismes de la réponse immunitaire antitumorale

La théorie de l'immunosurveillance proposait un rôle central de l'immunité spécifique dans la défense antitumorale, impliquant une reconnaissance et une destruction spécifique des cellules tumorales par les LTC. On sait aujourd'hui que des mécanismes innés contribuent également à la destruction des cellules cancéreuses. La figure 11 résume les mécanismes de contrôle des cellules tumorales par le système immunitaire (Catros-Quemener et al., 2003).

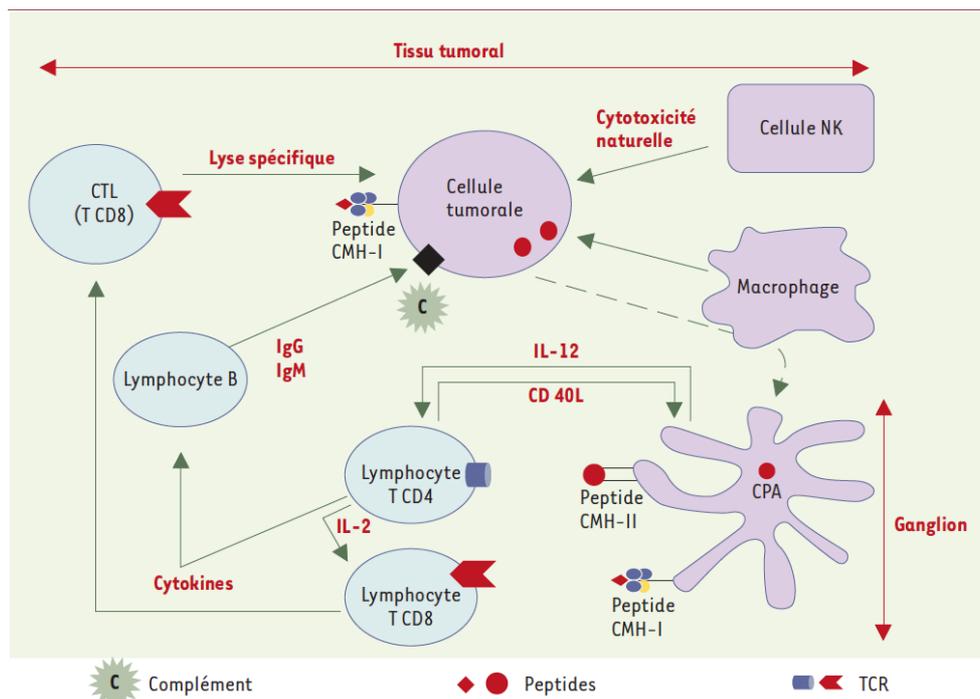


Figure 11 : Mécanismes de contrôle des cellules tumorales selon Catros-Quemener (Catros-Quemener et al., 2003).

Les CPA initie la **réponse antitumorale spécifique** en présentant aux LT naïfs les peptides immunogènes issus des antigènes tumoraux via les molécules du CMH-I et CMH-II. Parmi les CPA, les cellules dendritiques (CD) sont les plus efficaces pour engendrer des effecteurs cytotoxiques T spécifiques des cellules tumorales. Les CD sont recrutées sur le site de la tumeur par des signaux envoyés par la tumeur elle-même, mais aussi par les cellules immunitaires et non immunitaires présentes sur le site. Une fois sur les lieux, les CD internalisent des lysats, des corps apoptotiques ou des exosomes de cellules tumorales. Les antigènes tumoraux ainsi captés sont ensuite apprêtés pour la présentation aux LT naïfs dans les ganglions lymphatiques locaux. Pour que cette présentation soit efficace, les CD doivent être suffisamment matures afin d'exprimer les molécules de costimulation nécessaires à l'activation des TCD8⁺ et TCD4⁺. La présence de signaux de dangers tels des PAMP ou des DAMP favorise cette maturation. En effet, les CD expriment des PRR et l'activation de ces PRR permet l'expression des molécules de co-stimulation. Suite à la présentation de l'antigène, les lymphocytes TCD8⁺ activés se différencient en LTC. Les TCD4⁺ activés contribuent à l'expansion clonale et à la différenciation des LTC en produisant de l'IL-2. Les cellules tumorales exposent à leur surface des peptides antigéniques associés aux molécules du CMH-I. La reconnaissance de ces antigènes par les LTC activés conduit à la lyse

spécifique des cellules tumorales. La réponse adaptative peut également conduire à la lyse des cellules tumorales par l'intermédiaire des LB. En effet, les cellules B ayant reconnu l'antigène peuvent sécréter des anticorps (IgM ou IgG) spécifiques de la cellule tumorale, qui vont permettre d'induire sa lyse spécifique par ADCC ou par l'intermédiaire du complément.

La réponse antitumorale innée fait intervenir les cellules NK, les macrophages et les cellules NKT, qui assurent la destruction des cellules tumorales en l'absence d'immunisation préalable. **Les cellules NK** ont été découvertes pour leur capacité à tuer les cellules tumorales. Leur activité cytotoxique est régulée par une balance entre des signaux inhibiteurs reconnus par des récepteurs inhibiteurs (en anglais, Killer cell Immunoglobulin-like Receptors, KIR) et des signaux activateurs reconnus par des récepteurs activateurs (en anglais, Killer Activating Receptor KAR) (figure 12).

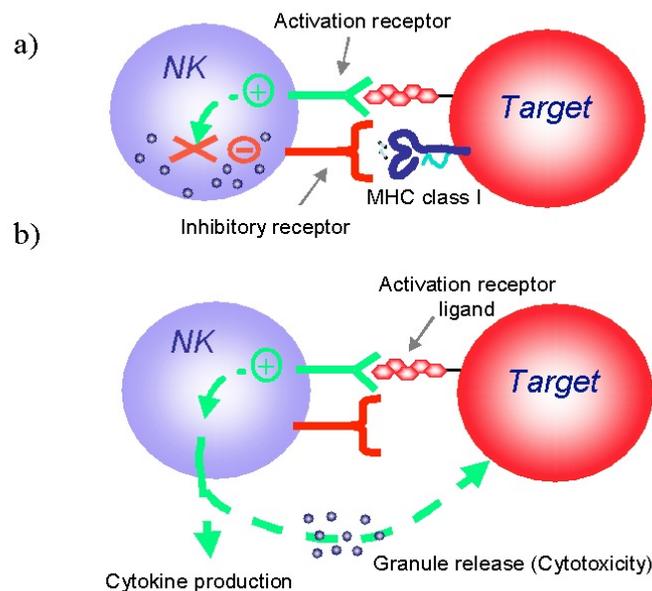


Figure 12: Modulation de l'activité des cellules NK par les récepteurs activateurs et inhibiteurs. a) Lors de la présence de molécule CMH-I sur la cellule cible, les récepteurs inhibiteurs neutralisent l'activité des récepteurs activateurs et ainsi bloquent l'activation des cellules NK. b) Par contre, lorsque le CMH-I n'est pas présent sur les cellules, les récepteurs activateurs vont pouvoir induire l'activation des cellules NK se traduisant par la libération de granules cytotoxiques et la production d'IFN- γ (French and Yokoyama, 2004).

Les récepteurs KIR interagissent spécifiquement avec les molécules du CMH-I. La baisse voire l'absence d'expression des molécules de CMH-I qui accompagne la transformation tumorale agit en faveur d'une activité cytotoxique des cellules NK vis-à-vis des cellules tumorales. Les récepteurs KAR, et en particulier le récepteur NKG2D (en anglais, Natural Killer Group 2D), reconnaissent des marqueurs de stress absents dans les tissus sains, mais présents à la surface des cellules transformées, ce qui induit l'activité

cytotoxique des cellules NK. Un exemple de ces marqueurs est la glycoprotéine MICA. Les cellules NK sont également activées par l'IL-2 ou l'IL-12 souvent présentes dans l'environnement tumoral, ainsi que par la production de monoxyde d'azote. Les cellules NK tuent les cellules tumorales par différents mécanismes : la libération de médiateurs cytotoxiques (granzymes/perforine), l'induction de l'apoptose, et la production de facteurs solubles (cytokines et monoxyde d'azote), dont l'IFN- γ , cytokine antiproliférative (figure 13) (Cheng et al., 2013).

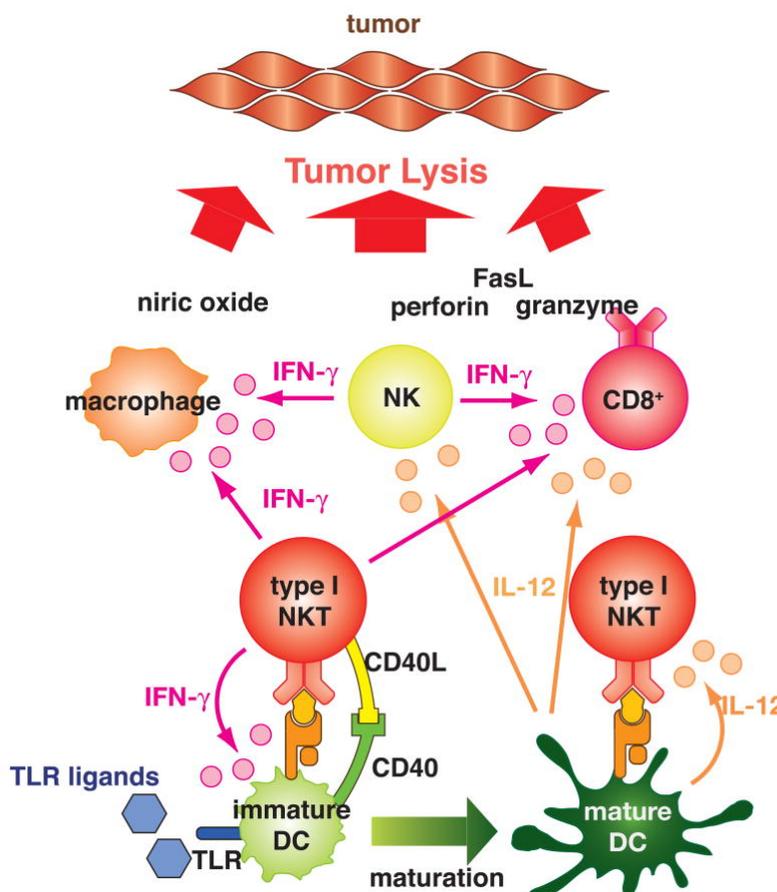


Figure 13 : Rôle des cellules NK et NKT dans la réponse antitumorale (Terabe and Berzofsky, 2008).

Les macrophages sont des cellules spécialisées dans la phagocytose, qui possèdent également une activité cytotoxique naturelle. Largement recrutés sur les sites tumoraux, ils peuvent contribuer à détruire les cellules tumorales, après activation par le GM-CSF ou l'IFN- γ , en produisant notamment des protéases, du monoxyde d'azote ou des cytokines (TNF- α , IL-1). Les macrophages sont également capables de présenter l'antigène. En outre, ils produisent de l'IL-12 qui stimule les cellules NK pour la production d'IFN- γ (Biswas and Mantovani, 2010).

L'activité antitumorale des **cellules NKT** est assurée par les NKT de type-I (NKT-I). Ces cellules n'agissent pas directement sur les cellules tumorales. Elles opèrent par le biais de leur effet sur d'autres cellules effectrices telles les NK et TCD8⁺ à travers la production d'IFN- γ et d'IL-12 (figure 13) (Terabe and Berzofsky, 2008).

A l'image des interrelations existant entre système immunitaire inné et adaptatif, **des coopérations existent entre mécanismes antitumoraux innés et adaptatifs** afin de permettre une réponse antitumorale efficace. Ainsi, en plus de présenter l'antigène aux LT, les CD sont capables d'amplifier la réponse d'autres cellules immunitaires impliquées dans l'immunité antitumorale, ce qui leur confère une place centrale dans l'immunosurveillance des cancers. Par exemple, ces cellules sécrètent des cytokines telles que l'IFN- α , l'IFN- β et l'IL-2 qui amplifient l'activité cytotoxique des cellules NK impliquées dans l'immunité antitumorale innée (figure 14). En retour, les cellules NK favorisent la réponse antitumorale à médiation cellulaire initiée par les CD par la production d'IFN- γ ou en induisant la libération des antigènes tumoraux suite à la lyse des cellules tumorales (figure 14) (Degli-Esposti and Smyth, 2005).

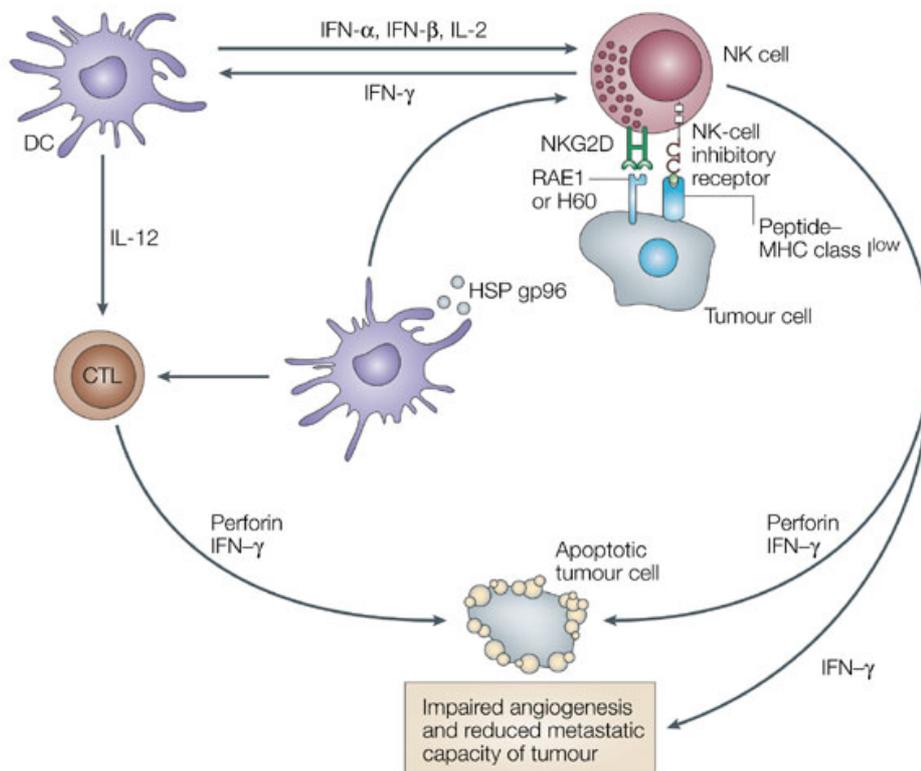


Figure 14 : Interaction des CD avec les NK pour l'amplification de la réponse antitumorale (Degli-Esposti and Smyth, 2005).

De même, en produisant des cytokines telles que l'IFN- γ , les cellules NK contribuent à l'activation des cellules TCD8⁺ et leur différenciation en LTC. Elles peuvent également favoriser la différenciation des cellules TCD4⁺ en Th1, et donc optimiser la réponse LTC. Les cytokines produites par les cellules NK régulent aussi la production d'anticorps antitumoraux par les cellules B (figure 14) (Cheng et al., 2013).

Ainsi, la cellule cancéreuse peut être détruite de façon non spécifique par les cellules de l'immunité innée, et notamment les cellules NK. Plusieurs mécanismes peuvent intervenir dans cette lyse (figure 13). La cellule cancéreuse peut être également lysée de façon spécifique par les TCD8⁺ ayant été activés par la présentation des antigènes de tumeur par les CD dans un contexte CMH de classe I en présence des molécules de costimulation. Les TCD4⁺, après présentation de l'antigène par les CD dans un contexte de CMH de classe II en présence des molécules de costimulation, activent les TCD8⁺ grâce à la sécrétion d'IL-2. Ils peuvent également acquérir des propriétés cytotoxiques spécifiques vis-à-vis de la cellule tumorale (figure 15) (Bouet and Catros, 2003).

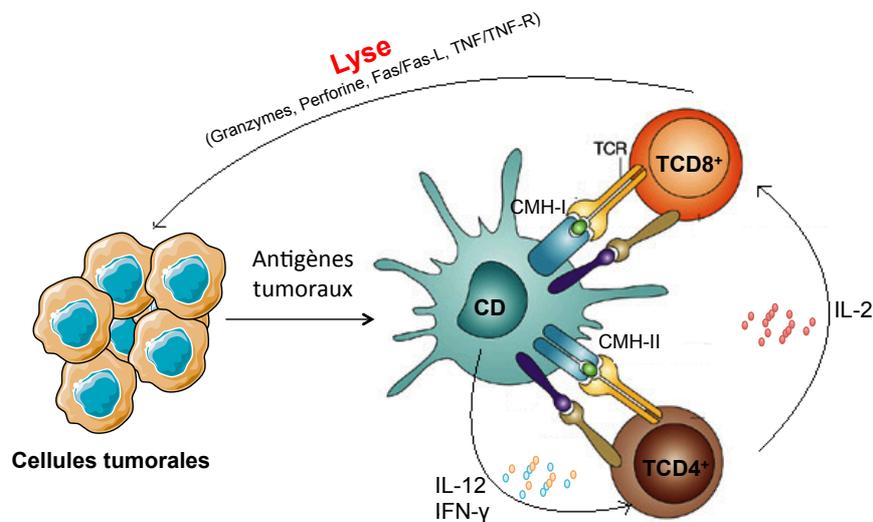


Figure 15 : Mécanismes spécifiques de destruction des cellules tumorales.

Selon le modèle proposé par Schreiber et collaborateurs, **les mécanismes antitumoraux innés et adaptatifs seraient également coordonnés dans le temps**, agissant de façon séquentielle (Dunn et al., 2002). Les acteurs cellulaires de la réponse innée, dont les cellules NK, initieraient la réponse antitumorale. Attirées sur le site de la tumeur à partir d'un certain niveau de développement tumoral, ces cellules reconnaîtraient les cellules tumorales et produiraient des cytokines, dont de l'IFN- γ (figure 16a). Cette production d'IFN- γ aurait

un effet antiprolifératif et pro-apoptotique sur les cellules tumorales, stimulerait l'activité cytotoxique des cellules NK et des macrophages, et induirait la production par les cellules présentes sur le site, de chimiokines capables d'inhiber l'angiogenèse et de recruter des cellules immunitaires (figure 16b). Ces événements conduiraient à la mort d'une partie des cellules tumorales et permettraient le déclenchement de la réponse cytotoxique spécifique (figure 16b). En effet, les CD présentes sur le site tumoral pourraient alors phagocytter les cellules mortes ou leurs débris, afin de présenter l'antigène aux cellules T après migration dans les organes lymphoïdes locaux (figures 16b et 16c). Les cellules TCD4⁺ et CD8⁺ spécifiques de la tumeur, produites dans les ganglions, rejoindraient ensuite le site tumoral pour détruire efficacement les cellules tumorales (figure 16d).

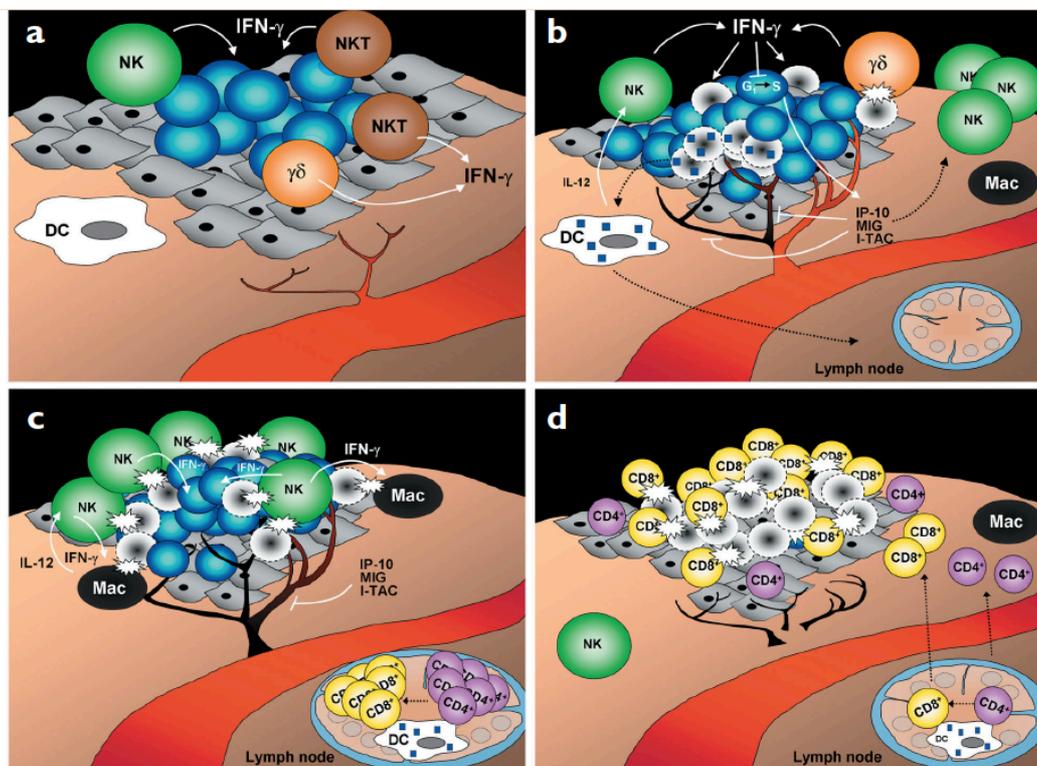


Figure 16 : Mécanismes de la réponse immunitaire antitumorale selon la théorie de l'immunoédition et le modèle proposé par Schreiber et collaborateurs (Dunn et al., 2002).

1.2.4. Mécanismes de l'échappement tumoral

Malgré un système immunitaire parfaitement organisé pour lutter contre le développement tumoral, les cellules cancéreuses peuvent échapper à l'immunosurveillance grâce à des mécanismes très élaborés (El Hage et al., 2008). Ces mécanismes peuvent être classés en trois catégories, selon qu'ils sont inhérents aux cellules cancéreuses, au micro-environnement tumoral ou aux effecteurs du système immunitaire (figure 17).

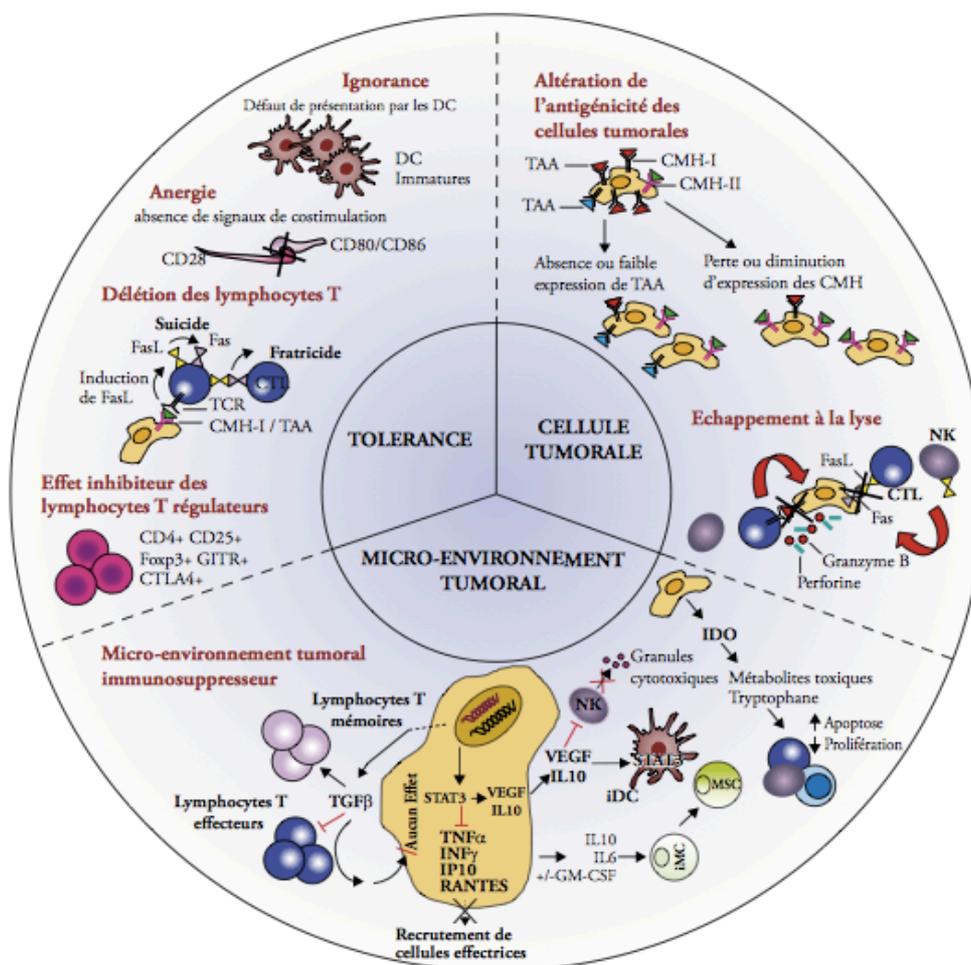


Figure 17 : Mécanismes d'échappement des cellules tumorales à la lyse spécifique (El Hage et al., 2008).

Les **cellules tumorales** peuvent faire l'objet d'une altération ou d'une absence d'antigénicité. Beaucoup de molécules exprimées par les cellules tumorales sont faiblement immunogènes et sont identifiées par le système immunitaire comme protéines du soi. Dans certains cas, on observe une diminution d'expression voire une perte totale d'expression des antigènes tumoraux, conduisant à l'émergence de variants totalement résistants à la réponse immunitaire spécifique. Un troisième mécanisme est la diminution ou la perte d'expression des molécules du CMH-I, permettant aux cellules tumorales d'échapper à la lyse induite par les LTC. C'est le cas notamment dans certaines tumeurs comme les mélanomes, les carcinomes et les cancers du sein. On sait également, que les cellules tumorales peuvent développer des stratégies de résistance à la lyse induite par les cellules NK et les LTC. Ces mécanismes impliquent notamment la voie des perforines/granzymes ou les voies de l'apoptose, dont celle impliquant le récepteur Fas.

Dans le **micro-environnement tumoral**, l'activation du facteur de transcription NF κ B au niveau des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs induit la production de diverses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1, IL-6 ou encore IL-8), dont certaines favorisent la prolifération des tumeurs. L'activité des cellules cytotoxiques peut être inhibée par la sécrétion de cytokines immunosuppressives, tel le TGF- β inhibant l'activation et la prolifération des cellules T et des cellules NK, ou l'IL-10 inhibant la différenciation des précurseurs des CD. De même, la production de VEGF (en anglais Vascular Endothelial Growth Factor) bloque la différenciation et la maturation des CD, tandis que la production d'indoléamine 2,3-dioxygénase favorise l'apoptose des cellules T. Certains auteurs ont également décrit un échappement des tumeurs par l'inhibition de l'émission de signaux de danger indispensables à la réponse antitumorale.

Le système immunitaire quant à lui peut parfois s'avérer tolérant aux antigènes tumoraux alors qu'on observe une production de LTC spécifique. Il semblerait que 4 mécanismes essentiels soient à l'origine de cette situation : l'ignorance ou le défaut de présentation par les CD, l'anergie ou l'absence de signaux de costimulation, la délétion des lymphocytes T ou encore le développement de lymphocytes T régulateurs.

1.2.5. Immunothérapie des cancers

Comme nous venons de le voir, le système immunitaire doit faire face à divers mécanismes d'échappement permettant le développement tumoral. La découverte de l'immunosurveillance des cancers et de ces mécanismes d'échappement tumoral a conduit au développement de l'immunothérapie (IT) dans la prise en charge des cancers. L'IT consiste à manipuler le système immunitaire d'un individu, par des approches passives ou actives et spécifiques ou non spécifiques, afin de lutter ou prévenir l'apparition d'une maladie (figure 18). Ainsi, elle peut faire appel à des anticorps, des cytokines (tels les IFN), des vaccins ou l'antigène lui-même dans le cas de la désensibilisation.

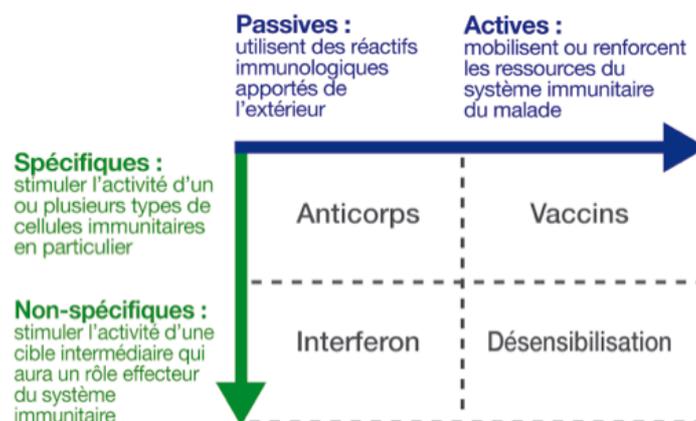


Figure 18 : Différents types d'immunothérapies. La désensibilisation n'est pas utile dans la lutte contre les cancers (Leem, 2012, www.leem.org).

En cancérologie, l'IT a donc pour objectif de stimuler et/ou de renforcer la réponse immunitaire du patient contre les cellules tumorales. Pour cela, diverses stratégies peuvent être envisagées. La première consiste à **stimuler de façon non spécifique le système immunitaire**. L'apport de cytokines immunostimulatrices ou de ligands des TLR, ou l'inhibition de cytokines ou de cellules immunosuppressives entrent dans ce cadre. La seconde stratégie fait appel à l'IT spécifique qui peut être passive ou active. **L'IT spécifique passive** peut consister en l'administration d'effecteurs comme des anticorps monoclonaux (rituximab/herceptine) ou de lymphocytes cytotoxiques éventuellement amplifiés préalablement *in vitro*. L'effet thérapeutique sera bref et nécessitera donc des traitements répétés. **L'IT spécifique active** a pour objectif de stimuler directement le système immunitaire du patient pour induire la production d'anticorps ou de LTC spécifiques des tumeurs *in vivo*. On parle alors de **vaccination antitumorale** qui correspond à l'administration d'un antigène en vue d'initier une réponse immunitaire adaptative. La réponse induite est supposée être de longue durée. Des cellules tumorales, des antigènes tumoraux ou des cellules dendritiques chargées en antigènes peuvent être administrés pour réaliser une vaccination antitumorale. Les méthodes d'IT spécifique et non spécifique, aux mécanismes complémentaires, peuvent être mises en œuvre en parallèle, afin d'optimiser l'élimination des cellules tumorales. Ainsi, l'administration de cytokines, d'interférons et d'agonistes des TLR est utilisée pour activer la réponse immune non spécifique, mais également pour renforcer l'activation de la réponse immune spécifique (Sheng and Huang, 2011). Les trois principales formes d'IT actuellement utilisées pour traiter le cancer sont présentées sur la figure 19.

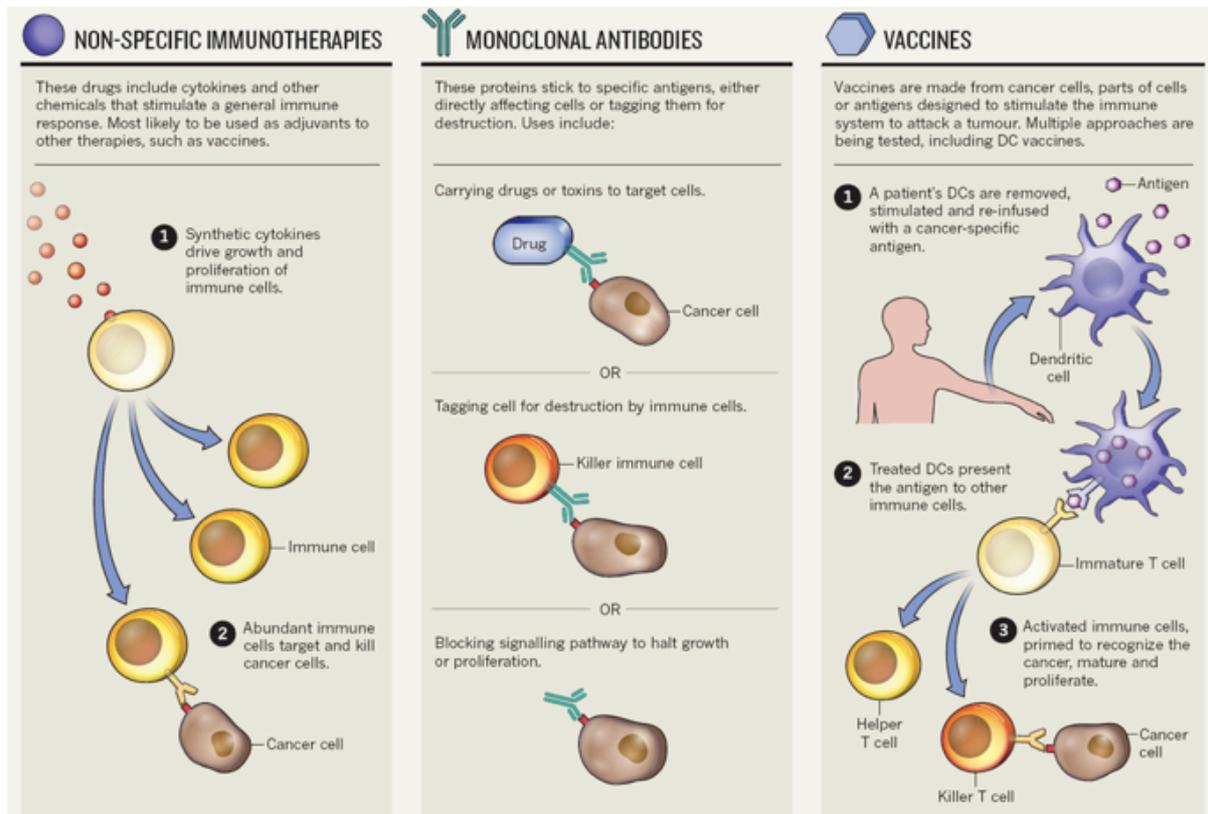


Figure 19 : Les trois principales formes d'IT actuellement utilisées dans le traitement du cancer (Elert, 2013).

Le nombre d'IT antitumorales en essais cliniques de phase 3 (anticorps monoclonaux, IT non spécifiques et vaccins) a augmenté en flèche depuis le début des années 1990 (figure 20). Ainsi, on estime qu'à l'horizon 2025, l'oncologie sera l'une des 4 aires thérapeutiques sur laquelle l'IT aura un impact très important (Leem, fiche 56, 2012, www.leem.org).

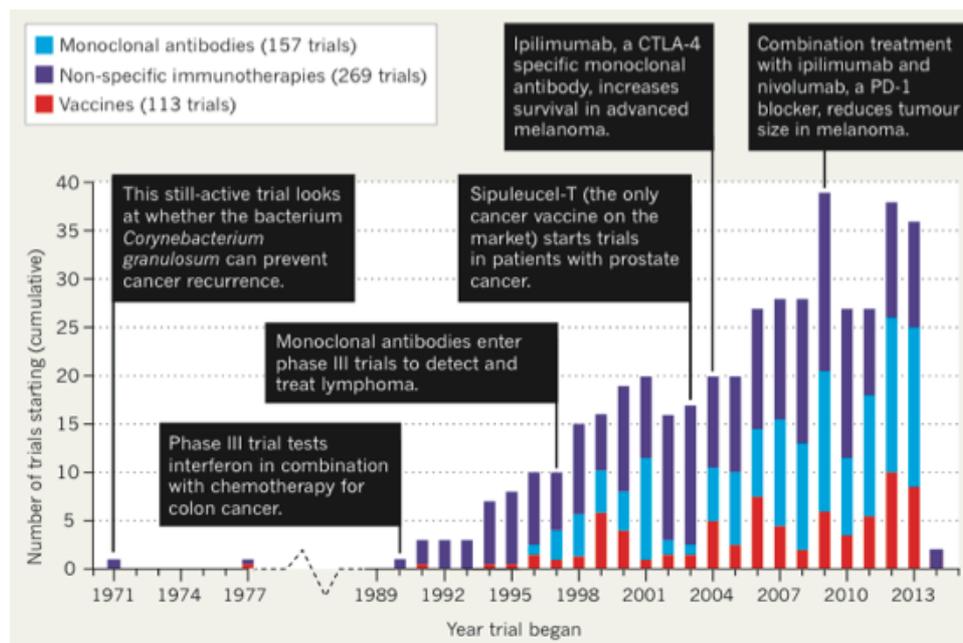


Figure 20 : Nombre de nouveaux essais cliniques par an portant sur des immunothérapies antitumorales entre 1971 et 2013 (Elert, 2013).

En ce qui concerne l'IT antitumorale active, le sipuleucel-T (Provenge[®]) est le premier vaccin commercialisé à ce jour. Il est constitué de cellules dendritiques autologues activées *ex vivo* par une protéine de fusion recombinante associant la phosphatase acide prostatique retrouvée dans plus de 90% des tumeurs prostatiques, et du GM-CSF permettant de renforcer la réponse immunitaire adaptative. Ce vaccin active la réponse immunitaire humorale et cellulaire dirigée contre les cellules tumorales prostatiques. Il augmente la survie des patients de quelques mois (4 en moyenne), mais sa complexité et son coût limitent son utilisation (100 000 euros/cure). Il faut noter ici que les vaccins pour la prévention du cancer du col de l'utérus (Gardasil[®], Merck & Co. 2006 ou Cervarix[®], GSK 2008) sont en réalité des vaccins antiviraux, dirigés contre le papillomavirus à l'origine de ces tumeurs. Ils sont préparés à partir de pseudoparticules virales hautement purifiées des protéines L1 des papillomavirus 16 et 18 pour le Cervarix[®] et des papillomavirus 6, 11, 16 et 18 pour le Gardasil[®]. Différents adjuvants (ASO4 contenant du 3-O-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A et/ou hydroxyde d'aluminium) viennent compléter l'ensemble.

Malgré des résultats cliniques encourageants, Provenge[®] est donc le seul vaccin antitumoral actuellement sur le marché.

2. Vecteurs nanoparticulaires en vaccination

Depuis sa découverte, **la vaccination** a eu un impact majeur dans le contrôle des maladies infectieuses et non infectieuses. Cependant, on ne dispose toujours pas de candidats vaccins capables de susciter une réponse immunitaire appropriée dans un certain nombre de maladies comme le sida, la tuberculose, le paludisme ou encore les cancers. Et ces dernières années, on a assisté au retrait de plusieurs vaccins (Pentacoq[®], Monovax[®], Hexavac[®]) en raison d'effets indésirables graves. Par ailleurs, on constate l'abandon progressif des stratégies basées sur l'administration de pathogènes entiers vivants ou inactivés pour s'orienter vers l'administration d'épitopes antigéniques spécifiques du « pathogène » (Mamo and Poland, 2012). On parle alors de vaccins sous-unitaires beaucoup plus sûrs et faciles à produire que les vaccins basés sur les pathogènes entiers. Cependant, chez l'homme, la simple administration de ces épitopes ne permet pas d'obtenir de réponse immunitaire suffisante en raison essentiellement de leur dégradation après administration, l'absence de signal de danger et de ciblage spécifique. Pour contourner ces problèmes, la recherche se concentre sur le développement de « vaccins intelligents ». Dans ce cadre, les vecteurs synthétiques à l'échelle nanométrique ou **vecteurs colloïdaux** sont d'un grand intérêt (Ertl, 2011; Gregory et al., 2013; Krishnamachari et al., 2011; Peek et al., 2008; Skwarczynski and Toth, 2011).

Le terme de **colloïde** s'applique aux systèmes contenant au moins deux composants, dont l'un est dispersé dans l'autre. Le composant dispersé est généralement constitué de particules de taille comprise entre 1 nm et 1 µm. Lorsque ces colloïdes transportent une molécule active, on peut parler de « vecteurs » colloïdaux ou nanoparticulaires, termes que nous emploierons indifféremment dans ce travail. Ces vecteurs sont classés en fonction de leur composition et de leur structure. Ils peuvent être de type matriciel, lorsque leur cœur est constitué d'un enchevêtrement de chaînes de polymère ou de lipides solides par exemple. On parle alors de nanosphères. Lorsque le cœur aqueux ou huileux correspond à un réservoir entouré d'une paroi, on parle de nanocapsules (figure 21 avec les deux types de particules : capsules et sphères). Le terme « nanoparticules » recouvre à la fois les nanosphères et les nanocapsules. Cependant, dans la littérature, il est souvent utilisé pour désigner des nanosphères uniquement. Les liposomes, qui font l'objet de ce travail, sont des nanocapsules phospholipidiques à cœur aqueux.

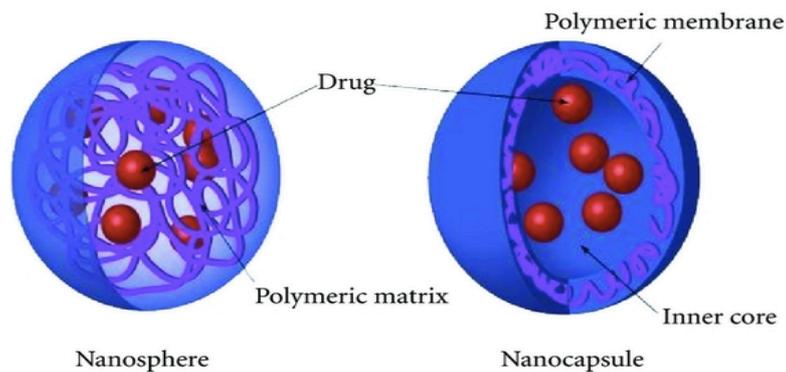


figure 21 : Structure des nanosphères et des nanocapsules (Christoforidis et al., 2012).

Selon la définition usuelle, une nanoparticule présente au moins une de ses dimensions comprise entre 1 et 100 nm. Cette définition exclut donc les objets dont la plus petite dimension est comprise entre 100 et 1000 nm, ce qui sera le cas de certains des vecteurs que nous formulerons dans cette étude. Ces derniers devraient donc être désignés comme particules submicrométriques. Cependant, comme dans la littérature de notre domaine, nous ferons une entorse à cette définition en leur attribuant la qualité de "nanovecteurs", en raison de leur diamètre inférieure au micromètre.

2.1. Intérêt des vecteurs colloïdaux en vaccination

Malgré leur grande diversité, les vecteurs nanoparticulaires présentent des avantages communs pour la vaccination, dont les principaux sont résumés dans les lignes qui suivent ainsi que par la figure 22 (Smith et al., 2013).

Tout d'abord, la vaccination est basée sur l'apport d'antigènes en quantité suffisante pour induire une réponse immunitaire dirigée contre la cible. C'est pourquoi, en 2010, la FDA a approuvé la technique de vaccination antitumorale qui consiste à charger des CD *ex-vivo* par des antigènes pour les délivrer en grandes quantités aux patients (Hovden and Appel, 2010). Cependant, il s'agit d'une technique particulièrement lourde à mettre en œuvre, coûteuse et qui implique souvent d'utiliser les propres CD du patient ce qui limite son application. De nombreux travaux ont montré la capacité des nanoparticules à **vectoriser des antigènes** (figure 22a) quelle que soit leur nature : protéine, peptide, acide nucléique, saccharide, glycoprotéine ou encore lipoprotéine (Gregory et al., 2013). Grâce à cette polyvalence, des vaccins nanoparticulaires à activité antibactérienne, antivirale, antiparasitaire ou antitumorale peuvent être envisagés. Ces antigènes sont encapsulés,

conjugués ou adsorbés à la surface des particules selon leur structure et leurs propriétés physicochimiques (Zhao et al., 2014b). Non seulement la structure nanoparticulaire permettra d'associer à une même particule une multitude d'un même antigène, mais **différents antigènes** pourront lui être associés, ce qui permettra d'activer différentes voies en parallèle, pour amplifier la réponse immunitaire attendue (figure 22c) (Fujita and Taguchi, 2011; Smith et al., 2013). La construction nanoparticulaire permet également de délivrer à la fois les antigènes et l'adjuvant à une même CD ce qui conduit à une réponse plus intense grâce à ces constructions multifonctionnelles (Elamanchili et al., 2007; Jalali et al., 2012; Roth et al., 2005; Thomann et al., 2011; Xu et al., 2013).

Au-delà du simple transport, ces vecteurs permettent également la **protection des antigènes** d'intérêt. En effet, les antigènes vaccinaux sont souvent sensibles aux peptidases, protéases et nucléases. Leur dégradation se traduit alors par une faible immunogénicité. Il a été démontré que leur association aux nanoparticules les protège contre les dégradations et prolonge ainsi leur temps de demi-vie *in vivo*. Selon la composition des nanoparticules, la **libération des antigènes peut également être contrôlée** (Akagi et al., 2011), ce qui permet de diminuer les quantités d'antigène et d'adjuvant à administrer et de ce fait, d'éviter les effets indésirables liés aux injections multiples.

Un atout essentiel des nanoparticules dans la vaccination réside dans leur capacité à être **capturées par les cellules et en particulier les CD** dont le rôle central dans ce cadre a déjà été décrit. Les nanoparticules peuvent être internalisées dans les CD par différents mécanismes en fonction de leur taille, structure, charge, propriétés de surface... (Altin and Parish, 2006; Foged et al., 2005; Joshi et al., 2012; Watson et al., 2012). Parmi ces mécanismes, on retrouve la phagocytose pour les particules de taille comprise entre 0,25 et 10 μm , l'endocytose ou la pinocytose pour les particules de taille inférieure à 500 nm (Joshi et al., 2012).

Les antigènes vectorisés par les nanoparticules peuvent atteindre directement leur site d'apprêtement pour leur présentation aux lymphocytes. Dans le cadre d'une réponse antitumorale, la présentation de l'épitope par les molécules du CMH-I est indispensable. Cependant, seules les protéines endogènes sont supposées être présentées en association avec les molécules du CMH-I. Il est désormais acquis que les CD peuvent réaliser la « **présentation croisée** » jusqu'à l'activation des cellules T naïves. Différentes études montrent que l'utilisation de nanovecteurs délivrant des épitopes ne remet pas en cause et

même augmente ce mécanisme de présentation croisée (figure 22d) (Harding and Song, 1994), ce qui en fait de précieux outils pour l'obtention d'une réponse antitumorale (Chen et al., 2011; Shen et al., 2006; Tran and Shen, 2009).

Pour encore augmenter la délivrance des antigènes aux CPA, il est possible de **modifier la surface des vecteurs afin de cibler** ces cellules par des molécules dites de ciblage. Pour cela, on peut exploiter des récepteurs présents à la surface de CPA. Dans ce cas, les vecteurs seront recouverts par des ligands de ces récepteurs (ex : mannose, lectine) (Carrillo-Conde et al., 2011). Des anticorps peuvent être également fixés à la surface des particules pour cibler les récepteurs de surface des CPA (e.g. les récepteurs de type lectine C) (Cruz et al., 2012; Moon et al., 2012). La plupart du temps sans modifier l'efficacité maximale des constructions, ces molécules de ciblage permettent de diminuer les quantités d'adjuvant nécessaires pour obtenir une réponse immunitaire ou l'accélérer dans le temps, comme les travaux antérieurs du laboratoire ont pu le montrer (Heurtault et al., 2009; Thomann et al., 2011).

Jusqu'à présent, nous nous sommes attachés à décrire les avantages des nanoparticules utilisées comme vecteurs d'antigènes. Cependant, les nanoparticules sont également très intéressantes en vaccination, en raison de leur propriété **adjuvante** liée à **l'effet dépôt** (figure 22b). Cet effet adjuvant est attribué à la persistance, la stabilité, l'intégrité conformationnelle, et la libération progressive des antigènes à partir des nanoparticules (Smith et al., 2013). Cependant, les antigènes ne doivent pas forcément être associés aux nanoparticules. Un simple mélange physique suffit. A noter toutefois que dans le cadre des vaccins peptidiques, le rôle adjuvant des nanoparticules ne suffit pas à l'induction d'une réponse immunitaire. C'est pourquoi, dans nos travaux, nous compléterons systématiquement nos constructions vaccinales par une molécule adjuvante.

Il faut aussi souligner que la **composition** des nanoparticules utilisées en thérapeutique est souvent basée sur des matériaux « physiologiques » ou biodégradables, comme c'est le cas pour les liposomes ou certaines nanoparticules polymères (Akagi et al., 2011; Gregory et al., 2013). A cela s'ajoute le fait que les nanoparticules utilisées dans le cadre de la vaccination ne sont pas ou sont très faiblement immunogènes par elles-mêmes. C'est particulièrement vrai pour les liposomes, qui sont des vésicules dont la composition est proche de celle des membranes cellulaires. Ces caractéristiques sont indispensables pour le développement de vaccins à usage humaine ou vétérinaire.

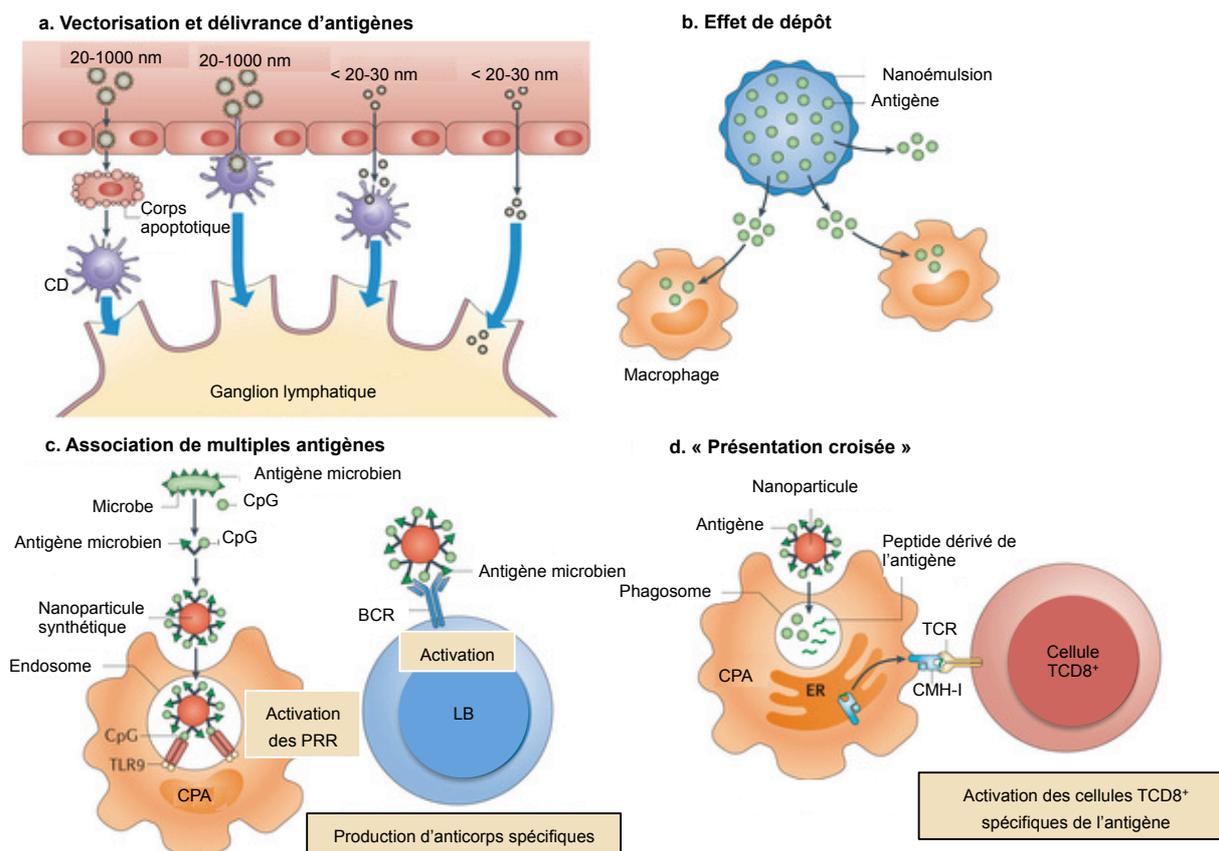


Figure 22 : Mécanismes par lesquels les nanoparticules modifient l'induction de la réponse immunitaire. a) Vectorisation et délivrance d'antigènes par les nanoparticules. b) Effet de dépôt favorisant la stabilité et la libération progressive des antigènes. c) Association de multiples antigènes à la surface des nanoparticules permettant d'activer plusieurs voies. d) Mécanisme de « Présentation croisée » médié par les nanoparticules (selon Smith et al., 2013).

Enfin, la très **grande versatilité** de ces vecteurs est un atout incontestable. Leur taille, leur composition, leur charge, leur structure, leurs propriétés de surface... sont autant d'éléments qui peuvent varier et influencer la réponse. Pour un même type de particules, les multiples techniques de formulation permettront de modifier de façon contrôlée certaines de ces caractéristiques. Ainsi, grâce aux nanoparticules, il est possible de décortiquer le rôle de chacun de ces paramètres ou de chacun des constituants sur la réponse immunitaire. La compréhension des mécanismes impliqués et la mise en évidence des éléments les plus favorables à une vaccination concourent au développement de vaccins efficaces. A cette fin, les nanoparticules sont particulièrement adaptées.

Ainsi, pour résumer, les vecteurs colloïdaux transportent et protègent les antigènes, améliorent leur capture par les cellules immunitaires et stimulent la réponse immunitaire. Toutes ces caractéristiques en font des outils de choix pour l'immunothérapie antitumorale.

2.2. Différents vecteurs colloïdaux utilisés en vaccination

La figure 23 représente les principaux vecteurs colloïdaux synthétiques utilisés en vaccination. Elle traduit la diversité de composition et de structure de ces systèmes.

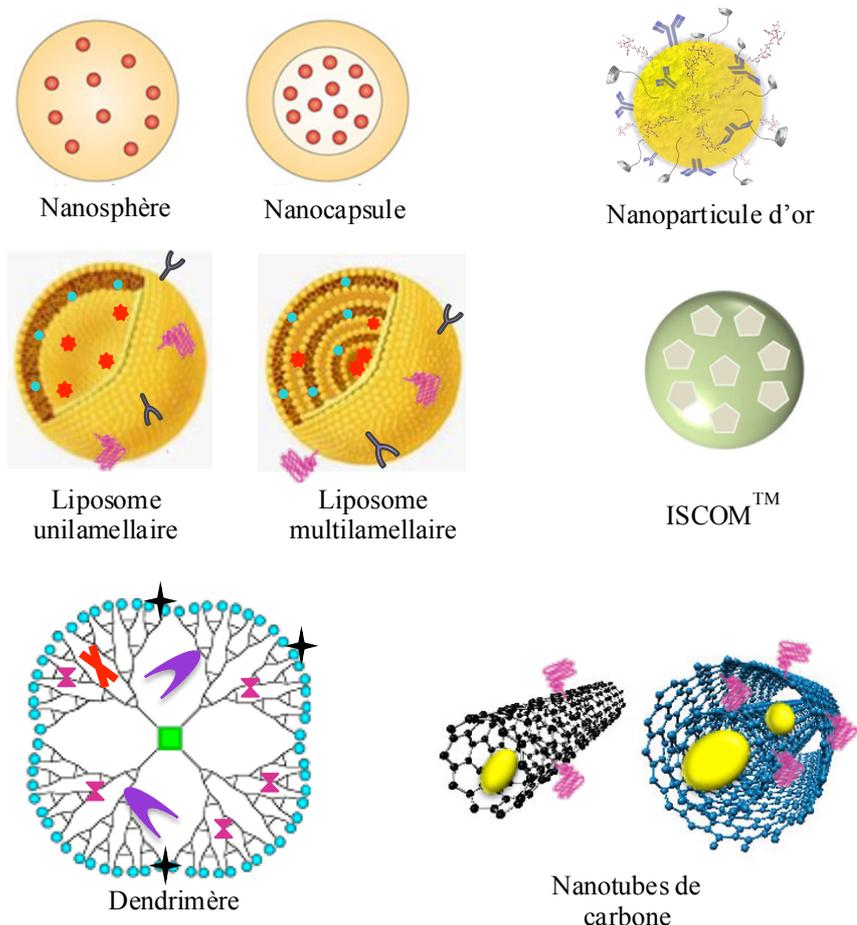


Figure 23 : Principaux vecteurs colloïdaux à visée vaccinale.

On retrouve ainsi 3 grandes classes de nanoparticules en fonction de leur composition :

- des **nanoparticules à base de polymères synthétiques ou naturels**.

Les polymères synthétiques majoritairement utilisés sont biodégradables comme l'acide polylactique (en anglais, Polylactic acid, PLA), l'acide polyglycolique (en anglais, Polyglycolic acid, PGA) et le copolymère d'acide lactique et d'acide glycolique (en anglais, Poly(lactic-co-glycolic) acid, PLGA). Les différentes méthodes de formulation conduisent à des nanosphères ou des nanocapsules. Ces polymères, approuvés par la FDA, sont progressivement dégradés *in vivo*. Dans le cadre de la vaccination, cette propriété peut permettre une libération lente des antigènes vaccinaux, et donc d'éviter l'administration de

plusieurs doses de vaccins (Gregory et al., 2013; Krishnamachari et al., 2011). Les dendrimères sont également des nanoparticules à base de polymères synthétiques hyper-ramifiés. Ils sont constitués de trois domaines bien différenciés : i) le noyau est habituellement un petit motif avec un nombre variable de groupes fonctionnels qui définissent le nombre de dendrites de la structure finale, ii) la couche interne est composée d'unités répétitives de monomères (amidoamine, propylène imine, éther imine, lysine, etc.) qui définissent les générations, iii) la couche externe contient un grand nombre de groupes fonctionnels (sulfonate, phosphate, etc.) qui peuvent être manipulés pour moduler les propriétés des dendrimères (Jain et al., 2011; Toraskar et al., 2011). Des études sur le développement de vaccins anti-infectieux (Baigude et al., 2004; Wang et al., 2014) et antitumoraux (Daftarian et al., 2011; Liu et al., 2013) à base de dendrimères, ont montré l'intérêt de ces structures pour la délivrance d'antigènes vaccinaux. D'autre part, des polymères naturels à base de polysaccharides (tels que l'alginate, le dextran, le chitosan) (Cui et al., 2011; Sarei et al., 2013; Sawaengsak et al., 2014; Zhao et al., 2014a) sont également utilisés dans la formulation de nanoparticules vaccinales en raison, en particulier, de leur biocompatibilité et leur non toxicité.

- des **nanoparticules inorganiques** (nanoparticules d'or, nanotubes de carbone).

Bien que ces nanoparticules ne soient pas biodégradables, elles ont l'avantage d'avoir une structure rigide et stable. Parmi elles, on peut citer les nanoparticules d'or qui peuvent être fabriquées sous différentes formes (sphère, cube, aiguille, etc) avec une taille allant de 2 à 150 nm (Zhao et al., 2014b). En plus d'être vecteurs d'antigènes (Huang et al., 2010; Tao et al., 2014), les nanoparticules d'or peuvent, selon leur taille et leur morphologie, se comporter comme des adjuvants et modifier la réponse immunitaire (Niikura et al., 2013). Les nanotubes de carbone sont une autre catégorie de nanoparticules inorganiques qui suscitent un intérêt grandissant pour la délivrance de médicaments. Grâce à leur structure allongée mono ou multicouche, ils permettent de vectoriser plusieurs copies d'antigènes et ainsi, d'optimiser la réponse obtenue. Des travaux chez la souris ont montré qu'une immunisation avec des nanotubes conjuguant un antigène issu du virus de la fièvre aphteuse induit une réponse anticorps plus importante que l'antigène seul (Pantarotto et al., 2003). Parallèlement, des résultats précliniques prometteurs en vaccination antitumorale ont montré la capacité de ces vecteurs à induire une réponse antitumorale efficace (Mocan and Iancu, 2011; Villa et al., 2011). Bien que ces études démontrent l'intérêt des nanotubes de carbone en vaccination, l'utilisation de ces nanoparticules en clinique reste controversée.

- des **nanoparticules lipidiques**.

Dans cette classe, on retrouve en particulier les liposomes, les nanoparticules lipidiques solides (SLN), les nanocapsules lipidiques et les ISCOMTM (en anglais, ImmunoStimulating Complex).

Les liposomes font partie des nanovecteurs les plus étudiés en vaccination. Ils réunissent tous les avantages précités et sont les vecteurs pour lesquels on possède le plus de recul. Ils seront décrits plus spécifiquement dans le chapitre suivant. Solides et relativement stables à températures ambiante et physiologique, les SLN sont composées de triglycérides, de cires et d'agents tensioactifs. Bien tolérées par l'organisme, elles sont considérées comme une alternative aux adjuvants lipidiques classiques comme l'adjuvant de Freund (Muller et al., 2000). Par ailleurs, elles permettent également la vectorisation d'antigènes hydrophobes. Des expériences précliniques ont montré leur intérêt dans la vaccination contre l'hépatite B (Mishra et al., 2010) et la leishmaniose (Doroud et al., 2011). Les nanocapsules lipidiques, quant à elles, sont constituées d'un cœur gras liquide ou semi-liquide à base de triglycéride ou d'ester d'acide gras entouré d'un film souple composé de tensioactifs lipophiles et hydrophiles (Heurtault et al., 2002). A ce jour, les nanocapsules lipidiques n'ont pas fait l'objet d'études cliniques. Néanmoins, Wadhwa et collaborateurs ont montré le potentiel de ces nanovecteurs à induire une réponse anticorps spécifique chez des souris après vaccination (Wadhwa et al., 2012). Les ISCOMTM sont des particules stables, en forme de cage sphérique et avec une taille d'environ 40 nm. Ils sont composés d'un mélange de saponines (Quil-A[®]), de cholestérol et de phospholipides. Ils peuvent être utilisés en tant qu'adjuvant dans les préparations vaccinales. Grâce à leur structure en forme de cage, ils peuvent également vectoriser des antigènes vaccinaux en les piégeant par des interactions hydrophobes (Zhao et al., 2014b). Des études cliniques et précliniques ont montré la capacité de ces nanoparticules à induire une réponse immunitaire de type Th1 et Th2. De même, des résultats en vaccination antivirale ont montré qu'il est possible d'obtenir une réponse systémique et muco-sale après administration nasale de ces nanovecteurs (Sanders et al., 2005). Les nanoémulsions peuvent également être classées dans ce groupe, puisque ce sont des dispersions colloïdales résultant du mélange de deux liquides non miscibles, tels que l'huile et l'eau, stabilisés par un film interfacial d'agents tensioactifs. Elles permettent de vectoriser des antigènes. La phase dispersée comprend généralement des gouttelettes de taille de 20-200 nm encapsulant les molécules à vectoriser. Ge et ses collègues (2009) ont développé un vaccin stable à base de nanoémulsions encapsulant l'antigène tumoral MAGE-1, la protéine de choc thermique HSP70, comme signal de danger, et l'entérotoxine staphylococcique A pour amplifier le

signal. Dans une étude sur des souris, ce groupe a démontré que l'administration de ce vaccin à base de nanoémulsion favorise la réponse antitumorale avec production d'anticorps dirigés contre MAGE-1 (Ge et al., 2009).

L'étude de la bibliographie permet de constater que les applications des nanovecteurs en vaccination sont nombreuses, mais qu'elles concernent essentiellement la vaccination antibactérienne et antivirale. Pourtant, comme nous l'avons décrit dans les chapitres précédents, la vaccination antitumorale à l'aide de nanovecteurs est envisageable. Parmi ceux-ci, les liposomes sont particulièrement prometteurs.

2.3. Liposomes et vaccination antitumorale

2.3.1. Généralités sur les liposomes

Les liposomes ont été découverts en 1965 par Alec Bangham et ses collègues alors qu'ils effectuaient des recherches sur les propriétés de la bicouche lipidique de la membrane plasmique (Bangham et al., 1965). Les liposomes sont des vésicules sphériques composées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques encapsulant un cœur aqueux. Préparés à partir de phospholipides et de cholestérol, ils ont une composition semblable aux membranes biologiques et ne présentent pas de toxicité ni d'immunogénicité intrinsèque (Kumar et al., 2011). Selon leur composition en lipides, les liposomes ont des propriétés physicochimiques variables : flexibilité, rigidité, taille, charge, morphologie, etc (figure 24) (Samad et al., 2007).

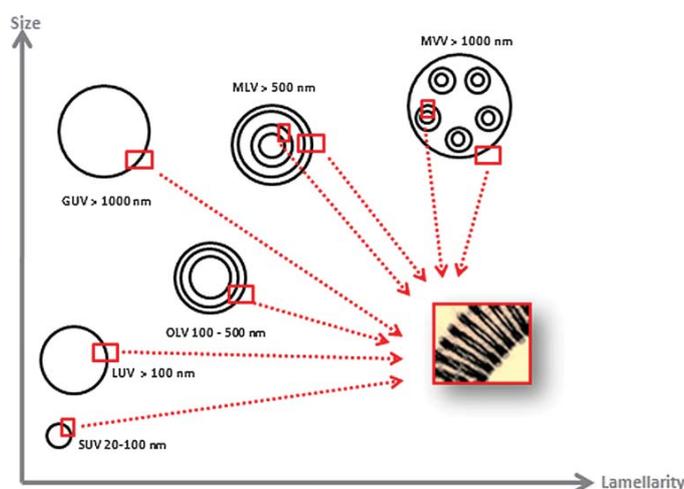


Figure 24 : Classification des liposomes selon leur taille et morphologie (Laouini et al., 2012), GUV (en anglais, Giant Unilamellar Vesicle), LUV (en anglais, Large Unilamellar Vesicle), MLV (en anglais, MultiLamellar Vesicle), MVV (en anglais, Multivesicular Vesicle), OLV (en anglais, Oligolamellar Vesicle), SUV (en anglais, Small Unilamellar Vesicle).

L'utilisation ou non de phospholipides chargés conduit à la formulation de liposomes neutres, cationiques ou anioniques. Les phospholipides à longues chaînes saturées tels que la dipalmitoylphosphatidylcholine augmentent la rigidité de la bicouche, tandis que la lécithine de soja confère une structure plus flexible et moins stable permettant l'obtention de liposomes ultra-déformables ou ultra-flexibles appelés **transfersomes** ou encore invasomes (Trauer et al., 2014). Ces derniers ont les mêmes caractéristiques que les liposomes classiques mais présentent en plus une grande capacité à se déformer et passer entre les cellules. De façon générale, les liposomes peuvent être préparés par diverses techniques dont l'évaporation de solvant résiduel, l'injection d'éthanol, mais aussi par évaporation en phase inverse. Il existe également des techniques telles que la sonication, l'extrusion et la microfluidisation pour diminuer la taille des vésicules (Prathyusha et al., 2013; Samad et al., 2007). Les liposomes présentent l'intérêt de pouvoir incorporer des substances lipophiles dans leur bicouche lipidique, encapsuler des substances hydrophiles dans leur cavité aqueuse et/ou fixer des molécules à leur surface. Aussi, ces structures peuvent subir des modifications de surface visant à moduler leur biodisponibilité (pegylation) ou augmenter leur temps de contact avec les tissus (revêtement mucoadhésif), ce qui leur confère une versatilité particulièrement intéressante, notamment dans le cadre de la vaccination (Torchilin, 2005).

2.3.2. Stratégies d'utilisation des liposomes en vaccination antitumorale

Les stratégies d'utilisation des liposomes en vaccination antitumorale sont multiples.

2.3.2.1. Liposomes comme adjuvants

Les liposomes sont exploités pour leur fonction adjuvante lorsqu'ils sont administrés en même temps que des antigènes bactériens, viraux ou tumoraux. On attribue ce phénomène à leur structure particulière qui conduit au ciblage passif des CPA (Altin and Parish, 2006). De plus, au même titre que les émulsions, ils permettent de réaliser une forme dépôt de l'antigène qui est délivré progressivement depuis le site d'injection (Hafnera et al., 2013).

Sur ce principe ont été développés les CAF (en anglais, Cationic Adjuvant Formulation) à base de liposomes. CAF01 est composé de dibéhénate de tréhalose (glycolipide ligand des récepteurs aux lectines de type C) incorporé dans des liposomes cationiques à base de diméthyl dioctadécylammonium bromide. Cet adjuvant administré après mélange avec l'antigène, est particulièrement utile dans l'induction des réponses humérales

antibactériennes. Des études cliniques sont en cours. Cependant, CAF01 n'est pas suffisamment puissant pour induire une réponse cytotoxique satisfaisante en particulier contre les tumeurs (Hansen et al., 2012). Afin d'augmenter son efficacité dans ce cadre, l'équipe d'Hansen a ajouté un ligand de TLR3 (poly(I:C)) dans la composition initiale du CAF01 conduisant au CAF05. La combinaison a permis l'obtention de LTC capables de lyser de façon efficace et spécifique les cellules tumorales dans différents modèles murins de tumeur (mélanome B16/OVA ; tumeurs sous-cutanées (s.c.) TC-1 exprimant la protéine E7) (Hansen et al., 2012). Plus récemment, la composition de cet adjuvant a encore évolué par ajout de monomycoloyl glycérol synthétique dans la structure des liposomes. Cette molécule stabilise les liposomes par augmentation de l'hydratation de la bicouche lipidique grâce à la formation de liaisons hydrogène entre la partie glycérol et le milieu aqueux environnant (Nordly et al., 2011). Le CAF09 obtenu en association avec l'antigène HPV-16 E7 a permis d'obtenir un vaccin antitumoral murin beaucoup plus efficace que les adjuvants classiquement utilisés (CAF05 ; aluminium/MPLA ; Montanide/CpG/IL-2), avec une diminution de la croissance des tumeurs établies dans 38% des souris et 100% de protection dans le cadre d'un traitement prophylactique (Korsholm et al., 2014).

Les liposomes peuvent permettre de **vectoriser des adjuvants** pour en optimiser l'efficacité. C'est ce qui a été exploité par l'équipe d'Harashima (2013) en vectorisant de l'alpha-galactosylcéramide (α GC). L' α GC est un antigène lipidique qui permet l'activation de la réponse immunitaire spécifique et non spécifique à travers la production d'IFN- γ par l'activation des cellules NKT. C'est donc un adjuvant. Toutefois, alors qu'elle provoque une augmentation d'IL-12 et d'IFN- γ sériques, l'administration d' α GC soluble n'induit pas de bénéfice clinique mesurable. Par ailleurs, recouvrir des liposomes de l'octaarginine (R8), un peptide de pénétration cellulaire (modifié par une chaîne grasse pour s'insérer dans la bicouche des liposomes), permet à ces vecteurs d'être capturés très efficacement par les CD et d'induire la présentation croisée de l'antigène OVA via le CMH-I associée à un effet antitumoral (Nakamura et al., 2008). Alors que, l'association de R8 à l'OVA non vectorisé ne permet pas d'obtenir des résultats satisfaisants (Nakamura et al., 2013a). C'est pourquoi les auteurs de ce travail ont formulé des liposomes présentant des diamètres de l'ordre de 270 nm, recouverts d'octaarginine et vectorisant l' α GC. Dans ces conditions, l'administration intraveineuse (i.v.) des constructions a permis leur accumulation dans la rate, l'augmentation de la présentation de l'antigène α GC, l'expansion des cellules NKT et un effet thérapeutique positif contre des cellules malignes de mélanome (B16) (Nakamura et al., 2013b).

Mais la fonction des liposomes ne s'arrête pas à leur rôle adjuvant des antigènes lipidiques et protéiques, et de nombreuses autres stratégies d'utilisation sont étudiées.

2.3.2.2. Liposomes comme vecteurs d'ADN ou d'ARNm

Dans ce domaine, les liposomes sont utilisés comme vecteurs cationiques capables de transférer les cellules. L'idée est notamment d'utiliser les liposomes pour transférer des CD avec des plasmides à ADN ou de l'ARNm codant pour des antigènes tumoraux, afin qu'après expression *in situ*, ceux-ci soient apprêtés et présentés aux lymphocytes TCD8⁺. *In vivo*, des CD ainsi chargées en antigènes tumoraux sont capables à terme d'induire une diminution significative du nombre de métastases dans un modèle murin de mélanome par exemple (Markov et al., 2012). Les récents travaux de l'équipe de Midoux (2013) traduisent également le potentiel de ces constructions (Pichon and Midoux, 2013). Ces auteurs ont mis au point une formulation de liposomes vectorisant un mRNA codant pour un antigène tumoral de mélanome. Ils ont utilisé des liposomes histidylés conférant une sensibilité au pH à ces vecteurs, ce qui favorise la déstabilisation de la membrane de l'endosome par protonation des groupements histidine et permet ainsi la libération du contenu des liposomes dans le cytosol. Afin d'améliorer le ciblage des CD *in vivo*, ils ont également incorporé un lipide mannosylé dans la construction. Ces formulations liposomiques ont permis de vacciner de façon efficace des souris porteuses d'un mélanome B16F10 (Pichon and Midoux, 2013).

L'équipe de Lan (2013) a publié récemment des travaux sur le développement d'un vaccin à ADN dont le mécanisme implique un signal de costimulation. Lors de l'activation des cellules T, la liaison du CD80/86 de la CPA au CD28 des cellules T est requise pour un effet optimal (visible sur la figure 9). Cependant, la molécule CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4) entre en compétition avec le CD28 pour la liaison à CD80/86 avec une plus forte affinité, et joue le rôle de régulateur négatif de l'activation. Ceci permet physiologiquement de limiter la réponse immunitaire, et la réponse non spécifique aux antigènes du soi est évitée. Si ce mécanisme protège contre les maladies auto-immunes, il altère l'immunité antitumorale. Des anticorps contre CTLA-4 peuvent être utilisés avec succès pour bloquer ce signal négatif, mais le coût d'un tel traitement est inenvisageable à grande échelle. C'est pourquoi l'équipe de Lan a construit des liposomes cationiques associés à un plasmide codant pour CTLA-4 afin d'immuniser des souris contre cette protéine. Cette immunisation a conduit à une production d'anticorps anti-CTLA-4 en quantité suffisante pour

inhiber la croissance de cellules tumorales B16F10 dans des souris C57BL/6 (Lan et al., 2013).

Les liposomes cationiques peuvent également permettre la transfection de cellules afin de leur permettre de sécréter des cytokines induisant l'activation des LTC. Cette stratégie évite les effets indésirables induits par l'administration systémique de ces cytokines. Dans les travaux de Zhang et collaborateurs (Zhang et al., 2013), des cellules de carcinome pulmonaire de Lewis (lignée LL/2) ont été transfectées par des liposomes cationiques (DOTAP:cholestérol) afin de leur permettre d'exprimer le gène de l'IL-27 murine. Les cellules résultantes ont été irradiées et utilisées comme vaccin cellulaire. Dans ce cas, le vaccin conçu contient non seulement des antigènes tumoraux, mais sécrète parallèlement de l'IL-27. L'administration de ce vaccin cellulaire autologue à des souris a permis l'obtention d'un effet inhibiteur sur le développement de tumeurs, associé à une forte production d'IFN- γ . Cependant, cette technique est difficile à mettre en œuvre pour des patients en raison des difficultés techniques qu'elle engendre et de la nécessité d'obtenir suffisamment de cellules transfectées efficacement. Dans ces exemples, les liposomes ne sont ni vaccins ni vecteurs de cytokines ou d'antigènes tumoraux, mais sont utilisés de façon indirecte pour la conception d'un vaccin antitumoral.

2.3.2.3. Liposomes comme vecteurs de cytokines

L'administration de cytokines est un des mécanismes permettant de manipuler le système immunitaire afin d'obtenir une réponse antitumorale. Cependant, l'administration systémique de cytokines conduit souvent à une perte d'efficacité par dégradation et/ou à une activité non spécifique conduisant à des effets indésirables graves qui limitent leur utilisation (Christian and Hunter, 2012). C'est pourquoi l'encapsulation des cytokines dans des vecteurs nanoparticulaires, et en particulier dans des liposomes a été envisagée. La gamme de cytokines concernées est très large (IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-15, IL-21, IFN- γ , TNF- α ...). Par exemple, l'injection intratumorale de liposomes chargés en cytokines peut activer les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral jusqu'à diminuer le développement d'une tumeur ou éradiquer des métastases. Une excellente revue sur le sujet a été publiée par l'équipe de Christian (2012) (Christian and Hunter, 2012). Cependant, cette stratégie fait partie de l'immunothérapie passive. En revanche en vaccination, les propriétés adjuvantes des cytokines peuvent également être mises à profit pour augmenter l'efficacité d'un vaccin. Des

vaccins antitumoraux, composés d'antigènes tumoraux, supplémentés en liposomes chargés en cytokines ont induit des réponses T spécifiques antitumorales particulièrement fortes dans des modèles murins. Des essais cliniques sont en cours, en particulier avec l'IL-2.

2.3.2.4. Liposomes pour optimiser le chargement des CD en antigènes

Une méthode très originale exploitant les liposomes pour charger les CD en antigènes tumoraux a été décrite en 2012 par l'équipe d'Oda. Ces auteurs ont montré que des liposomes chargés en gaz (perfluoropropane), appelés « bubble liposomes », lorsqu'ils sont exposés à des ultrasons en présence de CD *in vitro*, favorisent le transfert de matériel extracellulaire à l'intérieur des cellules, par la création de pores dans la membrane par la destruction des « bulles liposomiques ». Ce mécanisme n'implique pas l'endocytose et permettrait d'augmenter la présentation des antigènes par le CMH-I directement. Ces constructions ont conduit à la prévention de métastases pulmonaires de mélanome dans un modèle murin après administration de CD pulsées par des antigènes tumoraux dans ces conditions (Oda et al., 2012).

2.3.2.5. Liposomes comme vecteurs de peptides

Les liposomes peuvent être utilisés pour vectoriser des peptides, et donc concevoir des vaccins peptidiques. Leur spécificité représente un atout majeur.

Les vaccins peptidiques peuvent permettre d'induire une réponse humorale et/ou cytotoxique. La réponse induite dépend des épitopes choisis pour le composer :

- s'il s'agit **d'épitopes de type B**, la réponse induite est une réponse humorale se traduisant par la production d'anticorps contre la protéine cible. La production d'anticorps est recherchée principalement en vaccination antibactérienne. Mais, comme nous l'avons décrit précédemment, une réponse humorale peut participer à l'élimination de cellules tumorales (par le mécanisme d'ADCC). Cette stratégie a été adoptée dans l'étude de Kwon qui a démontré qu'un vaccin constitué de liposomes cationiques (DOPE:CHEMS) associés à un ADN riche en séquences CpG (ligand des TLR9 utilisé comme adjuvant) et encapsulant le peptide TM4SF5 (peptide issu de la protéine du même nom impliquée dans les carcinomes hépatocellulaires et les cancers du colon) entraîne la production d'IgG2a spécifiques du peptide après administration intrapéritonéale (i.p.) chez la souris. Cette construction s'est avérée efficace dans des modèles murins de tumeurs, en prophylaxie contre

le cancer du colon, et en prophylaxie et thérapeutique contre le carcinome hépatocellulaire (Kwon et al., 2012; Kwon et al., 2013). D'autres études concernent les virosomes qui sont des vésicules lipidiques unilamellaires proches des liposomes. Ils présentent des diamètres moyens d'environ 150 nm et sont dérivés des phospholipides ainsi que des glycoprotéines de surface de virus. Ils conservent les propriétés fusogènes et antigéniques virales, mais ne possèdent pas de génome viral nécessaire à la multiplication (Krishnamachari et al., 2011). Actuellement, il existe déjà deux vaccins à base de virosomes sur le marché : l'Epaxal[®] et l'Inflexal[®], qui protègent respectivement contre l'hépatite A et la grippe. En vaccination antitumorale, une étude clinique de phase I a montré des résultats encourageants concernant l'utilisation de ces vecteurs pour la délivrance d'antigènes tumoraux. En effet, la conjugaison d'épitopes B de la protéine ErbB2 à des virosomes obtenus à partir des phospholipides synthétiques et glycoprotéines du virus de l'influenza, a permis d'obtenir une réponse antitumorale anti-ErbB2. Cette réponse antitumorale a été appréciée par la production d'anticorps spécifiques contre la protéine ErbB2 chez 8 patients sur 10 atteints de cancer du sein métastatique (Wiedermann et al., 2010).

- s'il s'agit **d'épitopes de type TCD8⁺** la réponse induite est de type cytotoxique. La présentation croisée de cet épitope par les CD, via le CMH-I, permet l'activation des lymphocytes TCD8⁺ qui se différencient en LTC responsables de l'élimination des cellules tumorales exprimant ce même épitope. Nos recherches sur le développement de vaccins à activité antitumorale utilisent cette stratégie. Ainsi, nous avons montré que des liposomes associant **un épitope TCD8⁺ ErbB2** issu de la protéine ErbB2 surexprimée dans un grand nombre de cancers notamment du sein, **un épitope TCD4⁺**, issu de l'hémagglutinine du virus de la grippe, et **un agoniste des TLR2/6 utilisé comme adjuvant** permettent d'inhiber totalement le développement de tumeurs s.c. solides chez des souris porteuses de cellules tumorales surexprimant la protéine ErbB2. La réponse immunitaire antitumorale optimale est obtenue avec la présence concomitante des épitopes TCD4⁺ et TCD8⁺. La présentation de l'épitope TCD4⁺ aux lymphocytes TCD4⁺ par les CD permet l'activation de ces lymphocytes qui produisent alors de cytokines favorables à la réponse cytotoxique induite par l'épitope TCD8⁺ (Roth et al., 2005). L'efficacité antitumorale a été obtenue après vaccination s.c. dans un protocole prophylactique, mais également dans un protocole thérapeutique (Roth et al., 2005; Thomann et al., 2011).

Dans la littérature, la technique de formulation des liposomes peptidiques basée sur la formation initiale d'un film lipidique est fréquemment utilisée (Engler et al., 2004; Kwon et al., 2012; Kwon et al., 2013; Plum et al., 2000). Les peptides peuvent être encapsulés par hydratation du film à l'aide d'une solution aqueuse contenant le peptide. Les étapes de sonication, extrusion voire de congélation/décongélation sont alors appliquées pour augmenter les taux d'encapsulation tout en diminuant et homogénéisant les diamètres des liposomes (Kwon et al., 2012; Kwon et al., 2013; Shariat et al., 2014). Les peptides peuvent également être associés à des liposomes préformés en présence d'éthanol à 25°C ou fixés à la surface des liposomes par liaison chimique (Shariat et al., 2014). Cette dernière méthode est celle que nous avons retenue en raison de la plus grande maîtrise de l'association. Elle implique l'utilisation d'une molécule amphiphile s'insérant dans la bicouche des liposomes et fonctionnalisée pour permettre la création d'une liaison covalente avec le ou les peptide(s) d'intérêt par réaction chimique (addition de Mickael, substitution nucléophile...). La stratégie d'association du peptide aux liposomes est essentielle, car elle peut conduire à des pourcentages d'encapsulation variables, comme a pu le montrer l'équipe de Shariat (2014) lors de la formulation d'un vaccin liposomique à base d'un peptide d'ErbB2. En effet, des efficacités d'encapsulation allant de 9 à 44 % ont été obtenues en faisant varier l'une ou l'autre des étapes de formulation (Shariat et al., 2014).

Les premiers résultats cliniques obtenus avec ce type de vaccin peptidique antitumoral ouvrent de nouvelles perspectives. Dans ce cadre, le Stimuvax[®] (L-BLP25 ou Tecemotide) est le vaccin le plus prometteur. Ce vaccin à base de liposomes vectorise le BLP25, peptide issu de MUC-1, en association avec l'adjuvant MPLA (en anglais, monophosphoryl lipid A) (Figure 25).

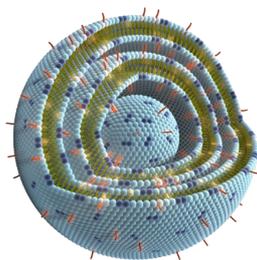


Figure 25 : Représentation schématique du Stimuvax[®] (Butts et al., 2014).

Les premiers résultats n'ont pas permis de mettre en évidence d'augmentation de la survie des patients lorsque la construction liposomique est utilisée chez des patients porteurs d'un cancer du poumon non à petites cellules au stade III par rapport au placebo. En

revanche, cette stratégie a un effet positif chez des patients recevant une chimiothérapie concomitante au vaccin liposomique, puisque la survie de ces patients est passée de 21 mois dans le groupe placebo à 31 mois dans le groupe traité par le vaccin. Des études complémentaires sont en cours (Butts et al., 2014).

2.3.3. Propriétés physicochimiques des liposomes et vaccination

Le comportement des nanovecteurs, et en particulier des liposomes, dans l'organisme et à l'échelle cellulaire et moléculaire dépend étroitement de leurs propriétés physicochimiques, dont leur diamètre, leur charge, leur forme, leur composition ou leur état de surface. Certaines de ces propriétés influencent notamment l'interaction des nanoparticules avec le système immunitaire, comme cela est décrit ci-dessous.

2.3.3.1. Diamètre et charge

Les propriétés adjuvantes des liposomes dépendent de leur charge, leur diamètre et leur fluidité (température de transition de phase). Ainsi, des liposomes qui contiennent de la phosphatidylsérine (chargée négativement) sont plus efficaces que des liposomes neutres pour induire la production d'IFN- γ par des cellules de rates murines (Altin and Parish, 2006). On sait aussi que l'effet dépôt est encore plus marqué lorsqu'il s'agit de liposomes cationiques qui interagissent avec les membranes cellulaires par interaction ionique ou de liposomes de grand diamètre (Sahdev et al., 2014).

De façon générale, et en se basant sur la littérature qui concerne essentiellement des nanoparticules de polymères, on considère que pour une capture optimale par les CD, le diamètre d'une particule doit être inférieur ou égal à 500 nm. Pour des particules plus larges, une charge de surface cationique peut compenser (Foged et al., 2005). Selon le même auteur, des particules de grand diamètre pourraient induire une réponse inflammatoire persistante en raison d'une phagocytose « frustrée ». En vaccination antitumorale, l'équipe de Nakamura, qui a travaillé sur des liposomes recouverts de peptide de pénétration des cellules (octaarginine) associant de l' α -galactosylcéramide, avait initialement utilisé des liposomes administrés par voie i.v. Ces constructions n'avaient pas permis d'observer une augmentation des réponses immunes. En effet, ces liposomes présentaient des diamètres moyens inférieurs à 100 nm qui se sont révélés insuffisants par cette voie d'administration. En augmentant la taille des liposomes (270 nm) et en y incorporant des chaînes de polymère hydrophile

(polyéthylène glycol, pour augmenter le temps de demi-vie des constructions) ils ont modifié la distribution des vecteurs, favorisant leur capture par la rate (par rapport au foie) par rapport aux vecteurs de taille inférieure à 100 nm et non pegylés. De façon très intéressante, ils ont observé l'influence du diamètre sur la production d'IFN- γ . Dans leur étude, le diamètre optimal se situait à 273 nm tandis qu'une diminution de moitié de la production d'IFN- γ était observée avec des particules de 158 nm et une diminution du 1/3 pour des particules de 311 nm. Ainsi, de faibles modifications de diamètre peuvent engendrer des différences importantes en termes de réponse immune (Nakamura et al., 2013b).

Le diamètre des nanoparticules aurait un impact sur l'activité des CD. Ainsi, Shima et ses collaborateurs (2013) ont démontré que des nanoparticules polymères (PGA) de 40 nm permettent une meilleure activation et migration des CD par rapport aux nanoparticules de 100 et 200 nm (Shima et al., 2013). La charge de surface serait un facteur tout aussi important. En général, les particules sphériques cationiques induisent une forte activité de phagocytose par les CD, du fait de la nature anionique de la membrane cellulaire (Altin and Parish, 2006; Foged et al., 2005). Le diamètre des particules influence aussi le type de CPA impliquées dans leur capture. En effet, le diamètre influence la migration des particules vers les ganglions lymphatiques. Les particules les plus grosses sont captées par les CPA périphériques au niveau du site d'injection, tandis que les nanoparticules (20-200 nm) sont internalisées par les CD résidant dans les ganglions (Manolova et al., 2008). Ainsi, seules les particules de petit diamètre sont capables d'atteindre librement (sans intervention d'autres cellules) les CPA des ganglions. Ceci peut avoir un impact sur la réponse immunitaire et sa cinétique.

Même s'ils ne s'appliquent pas toujours aux liposomes, l'ensemble de ces travaux démontre l'importance de la charge, de la taille, mais également de la composition des particules (les trois étant souvent liés) en fonction de la voie d'administration utilisée.

2.3.3.2. Couplage des antigènes ou d'ADN

En raison de leur structure, les liposomes offrent une grande variété d'options pour la conception de candidats vaccins. Les protéines, peptides ou les acides nucléiques peuvent être encapsulés dans le cœur aqueux, insérés dans la bicouche lipidique ou associés à la surface par adsorption, ancrage hydrophobe ou liaison covalente. Différentes techniques de couplage des peptides à la surface de liposomes sont utilisées. On retrouve notamment

l'utilisation de fonctions réactives au thiol ou aux amines qui conduisent à des liaisons covalentes.

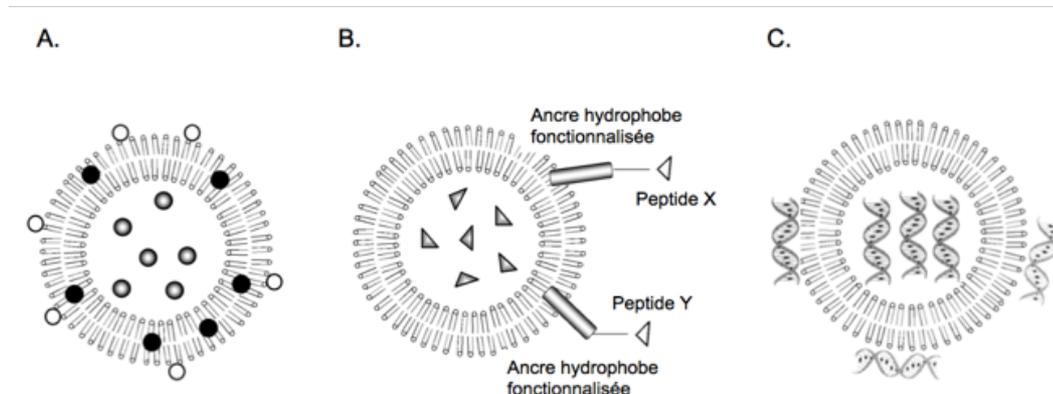


Figure 26 : Différents modes d'association des protéines, peptides ou ADN codant pour des antigènes à des liposomes. A. Encapsulation dans le cœur (ronds gris), insertion dans la bicouche (ronds noirs) ou adsorption à la surface (ronds vides) d'antigènes protéiques. B. Encapsulation (triangles gris) ou couplage à la surface via des ancres hydrophobes fonctionnelles (triangles vides) d'antigènes peptidiques. C. Encapsulation ou adsorption d'ADN codant pour un antigène (Heurtault et al., 2010).

L'encapsulation peut parfois être préférée, afin de protéger la molécule vectorisée tandis que l'adsorption peut exposer les antigènes à un environnement enzymatique défavorable. Cependant, Rosada et ses collaborateurs ont comparé la protection d'un ADN plasmidique codant pour une protéine de *Mycobacterium leprae* (ADN-hsp65) encapsulé ou adsorbé à la surface de liposomes cationiques. De façon surprenante, seul l'ADN adsorbé a conduit à une protection efficace contre la tuberculose après administration nasale. Il semblerait que la présence de l'ADN à la surface des liposomes ait favorisé les interactions des motifs CpG présents dans le plasmide, avec les récepteurs TLR, ce qui a conduit à un effet immunostimulant plus important (Rosada et al., 2008).

2.3.3.3. Modification de surface des vaccins peptidiques pour favoriser le ciblage des cellules dendritiques

Quel que soit le type de vaccin peptidique, la CD reste la principale cible. C'est pourquoi, afin d'améliorer leur efficacité et grâce à la versatilité des liposomes, des molécules de ciblage des CD sont souvent associées aux constructions. La revue de Tacke et collaborateurs recense les différents récepteurs exploitables à la surface des CD (Tacke et al., 2006). Dans des travaux antérieurs, notre équipe a montré qu'une molécule amphiphile portant idéalement deux fonctions mannose était capable, après son incorporation dans la bicouche phospholipidique de liposomes, d'augmenter la capture de ces derniers par des CD humaines *in vitro* (Espuelas et al., 2008). Ce mécanisme implique les récepteurs mannose qui

font partie des récepteurs aux lectines de type C exprimés sur les CD et les macrophages. *In vivo*, dans un modèle murin de tumeur, les candidats vaccins mannosylés ont permis de diminuer les doses d'adjuvant et de peptide à administrer tout en maintenant l'efficacité du vaccin (Thomann et al., 2011). Les CD présentent également à leur surface des récepteurs Fc qui s'associent au domaine constant des anticorps. Des liposomes chargés de l'antigène modèle OVA et recouverts d'IgG afin de cibler les CD ont été formulés par l'équipe de Uchiyama (Kawamura et al., 2006). Ils ont permis d'obtenir une activité antitumorale meilleure qu'en l'absence de ciblage. On retrouve le même principe avec le couplage aux liposomes de fragments d'anticorps simple brin reconnaissant le CD11c ou DEC 205 (Joshi et al., 2012).

3. Voie respiratoire, une voie prometteuse pour l'administration de vaccins

La voie respiratoire, qui inclut les voies nasale et pulmonaire, est utilisée pour la délivrance de principes actifs thérapeutiques à action locale ou systémique, tels les bronchodilatateurs, les corticoïdes, les vasoconstricteurs ou les antihistaminiques. Encore peu utilisée pour l'administration de vaccins, elle suscite toutefois un intérêt croissant comme alternative aux voies parentérale et intramusculaire, en premier lieu, en raison de l'accessibilité de ses muqueuses. Il s'agit par ailleurs d'une voie indolore qui ne nécessite pas de personnel spécialisé pour l'administration du vaccin. Enfin, des formes pharmaceutiques diverses comme des liquides (gouttes, aérosols), solides (poudres) et semi-solides (gels) peuvent être administrées (Davis, 2001; Tonnis et al., 2012).

3.1. Anatomie et physiologie du tractus respiratoire

L'**appareil respiratoire**, qui permet la respiration, est composé de deux régions : les voies aériennes supérieures (extra-thoraciques) et les voies aériennes inférieures (intra-thoraciques) (figure 27). Les voies aériennes supérieures sont composées des cavités ou fosses nasales, du pharynx, du larynx et de la trachée. Elles assurent la conduction, le réchauffement, la saturation en eau et la filtration de l'air avant qu'il n'atteigne le poumon, ainsi que l'olfaction. Les voies aériennes inférieures incluent les bronches, les bronchioles et les alvéoles pulmonaires. Elles sont responsables de la conduction de l'air et de l'échange des gaz.

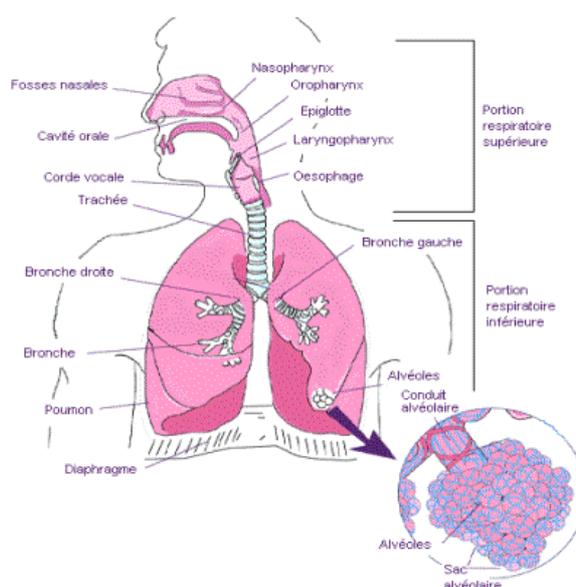


Figure 27 : Anatomie du tractus respiratoire (<http://tecfaetu.unige.ch>).

La cavité nasale occupe un volume de 15 à 20 mL et une surface totale d'environ 150 cm². Un septum la divise en 2 fosses, chacune d'elle étant subdivisée en 4 sections : le vestibule nasal, l'atrium, la région respiratoire et la région olfactive (figure 28). Le vestibule, partie la plus antérieure de la cavité nasale, d'une surface d'environ 0,6 cm², est impliqué dans la filtration de l'air. L'atrium est situé entre le vestibule nasal et la région respiratoire. La région respiratoire, qui constitue la partie la plus étendue de la cavité nasale (130 cm²), renferme dans ses parois latérales les cornets supérieur, moyen et inférieur. La région olfactive est localisée, quant-à-elle, sur le plafond de la cavité nasale (Pires et al., 2009; Ugwoke et al., 2005).

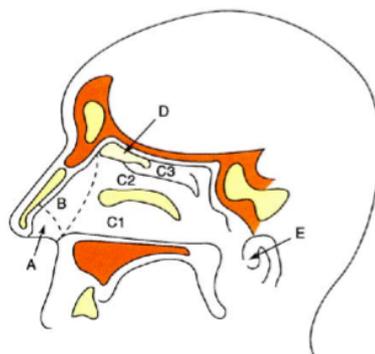


Figure 28 : Représentation schématique d'une section de la cavité nasale, montrant le vestibule (A), l'atrium (B), la région respiratoire avec les cornets inférieur (C1), moyen (C2) et supérieur (C3), la région olfactive (D) et le nasopharynx (E) (Ugwoke et al., 2005).

Le poumon est composé des voies de conduction amenant l'air vers la zone d'échange des gaz et du parenchyme pulmonaire. A partir de la trachée, les voies de conduction se divisent successivement en bronches principales et segmentaires, puis en bronchioles, bronchioles terminales et bronchioles respiratoires, avant d'aboutir aux sacs alvéolaires. Cette segmentation fait que le diamètre des voies de conduction diminue au fur et à mesure que l'on progresse dans l'arbre respiratoire. Le parenchyme pulmonaire contient environ 480 millions d'alvéoles offrant une surface d'échange d'environ 120 m², soit 60 fois la surface du corps humain.

Une des caractéristiques anatomiques majeures des voies de conduction est que leur diamètre diminue au fur et à mesure que l'on progresse dans l'arbre respiratoire. Ceci joue sur la progression des particules inhalées dans le tractus respiratoire (figure 29). Ainsi, les particules qui ont un diamètre de plus de 1 µm ou de moins de 0,05 µm peuvent se déposer dans les voies respiratoires, alors que les particules qui font entre 0,1 et 0,6 µm ont une faible probabilité de s'y déposer. Les particules de diamètre supérieur à 1 µm se déposent principalement dans la région extra-thoracique (nez, bouche, larynx). C'est aussi le cas des

particules d'environ 1 μm . En revanche, les nanoparticules de 10 à 100 nm pénètrent jusqu'aux alvéoles.

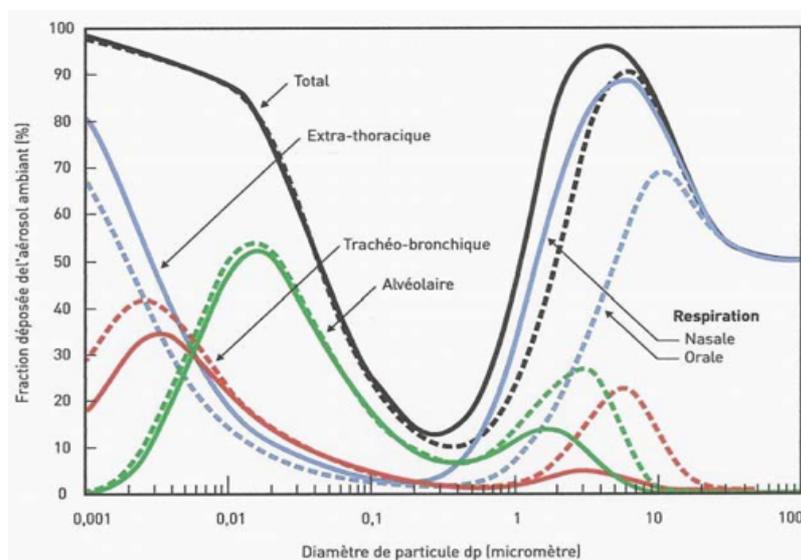


Figure 29 : Dépôt des particules dans les voies respiratoires en fonction de leur diamètre (selon l'ihest : <http://www.ihest.fr/focus-mediatheque>)

3.2. Caractéristiques anatomiques, fonctionnelles et immunologiques de la muqueuse respiratoire

L'utilisation d'une muqueuse pour la délivrance de principes actifs, et notamment de vaccins, nécessite de prendre en compte les caractéristiques anatomiques, physiologiques et immunologiques de cette muqueuse. Dans ce domaine, la particularité majeure de la muqueuse respiratoire est que son anatomie et son histologie varient au fur et à mesure que l'on progresse dans l'arbre respiratoire, afin d'assurer des fonctions ou des défenses spécifiques à chaque région.

3.2.1. Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles

Dans la cavité nasale, le vestibule est recouvert d'un épithélium squameux et kératinisé de type cutané contenant des glandes sébacées et portant des poils, les vibrisses. Cet épithélium est peu propice à l'absorption des substances, mais ses poils permettent de retenir les grosses particules éventuellement présentes dans l'air (particules de diamètre supérieur à 10 μm). L'atrium, recouvert d'un épithélium stratifié squameux ou pseudostratifié, est également une région peu propice à l'absorption des substances. La muqueuse de la région respiratoire, considérée comme la plus importante pour la délivrance systémique de substances actives, est constituée de cellules épithéliales cylindriques ciliées

ou non ciliées, ainsi que de cellules caliciformes et de glandes muqueuses et séreuses productrices de mucus (figure 30). Cette muqueuse est riche en éléments vasculaires fenêtrés et en microvillosités favorables à l'absorption des substances. Elle est également recouverte d'une couche de mucus d'environ 5 μm d'épaisseur. Ce mucus est indispensable à l'humidification et au réchauffement de l'air inhalé, mais offre aussi une protection enzymatique et physique vis-à-vis des substances ou des organismes étrangers à l'organisme (cf la suite de ce paragraphe). L'épithélium de la région olfactive est un épithélium pseudostratifié contenant des neurones récepteurs du système olfactif. Ce neuroépithélium permet un accès direct au système nerveux central. Dans cette région, on trouve également des glandes séreuses produisant une sécrétion agissant comme un solvant des substances odorantes (Pires et al., 2009).

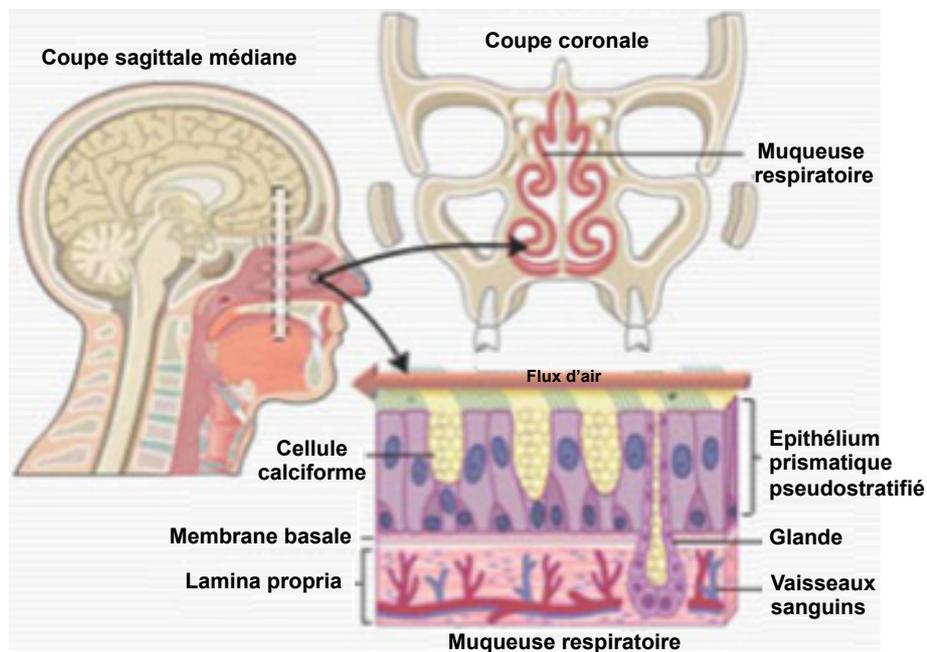


Figure 30 : Localisation et histologie de la muqueuse nasale respiratoire (<http://www.emptynosesyndrome.org>).

Dans les voies aériennes inférieures, l'épithélium bronchique est constitué de cellules basales, de cellules ciliées, et de cellules caliciformes qui sécrètent du mucus. Sa sous-muqueuse renferme également des glandes mucipares (figure 31). Au niveau des bronchioles, l'épithélium évolue progressivement vers un épithélium simple cuboïde. Les cellules basales, ciliées et caliciformes disparaissent progressivement au profit des cellules de Clara capables de produire des protéines à activité anti-oxydante et antibactérienne, ainsi que des protéines associées au surfactant. L'épithélium alvéolaire est composé de deux types cellulaires : les pneumocytes de type I, qui assurent les échanges gazeux avec le sang, et les pneumocytes de

type II, qui sécrètent le surfactant pulmonaire. Des macrophages sont présents dans la lumière alvéolaire.

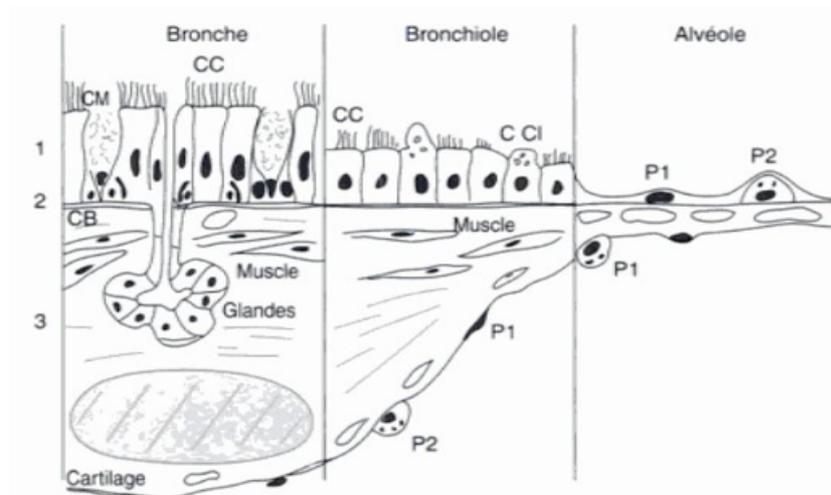


Figure 31 : Représentation schématique de l'épithélium tapissant les voies respiratoires inférieures : 1 : épithélium ; 2 : membrane basale ; 3 : sous-muqueuse ; CC : cellule ciliée ; CM : cellule à mucus ; CB : cellule basale ; C Cl : cellule de Clara ; P1 : Pneumocyte I ; P2 : Pneumocyte II (Huchon, 2001).

La paroi des alvéoles, qui constitue la frontière entre l'air et le sang, est d'une extrême finesse (environ 0,5 μm), afin de favoriser l'échange des gaz (figure 32). Elle est donc le siège d'échanges facilités entre le milieu extérieur et l'organisme. De plus, les poumons sont fortement irrigués. La circulation pulmonaire reçoit en effet 100% du débit cardiaque, ce qui est en faveur d'une absorption rapide des xénobiotiques. De par ces caractéristiques anatomophysiologiques, le poumon est une surface d'échange qui peut être mise à profit dans la délivrance systémique de médicaments.

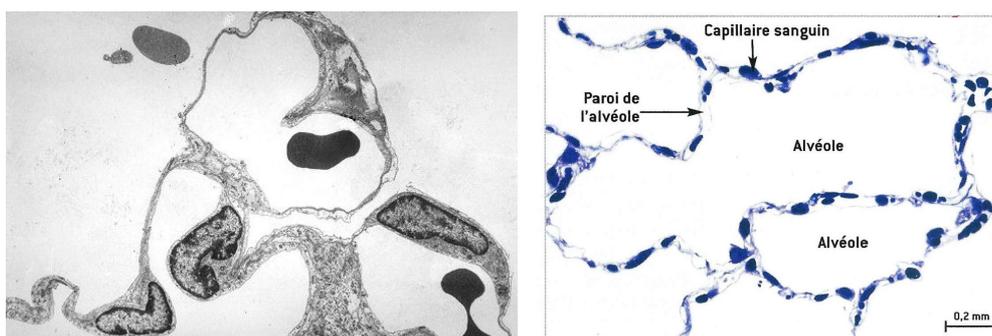


Figure 32 : Image en microscopie électronique ou microscopie optique des alvéoles pulmonaires (<http://www.isto.ucl.ac.be> ; <http://jeanvilarsciences.free.fr>).

Comme toute autre muqueuse, la muqueuse respiratoire participe activement à la **défense de l'organisme** (Vareille et al., 2011). Cette fonction fait intervenir plusieurs mécanismes. Tout d'abord, ses cellules épithéliales forment **une barrière physique imperméable** entre le milieu externe et interne. En effet, ces cellules sont intimement reliées

les unes aux autres par des complexes jonctionnels, dont des jonctions serrées, des jonctions *zonula adherens* et des *desmosomes*, qui contrôlent le passage paracellulaire des ions et des solutés, mais également des pathogènes et des particules (figure 33) (Berube et al., 2010).

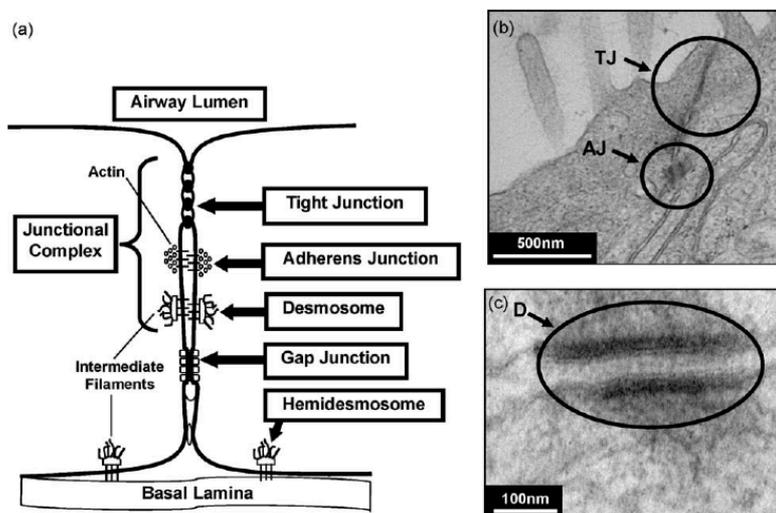


Figure 33 : Représentation schématique des jonctions intercellulaires assurant l'imperméabilité de l'épithélium respiratoire (Berube et al., 2010).

La clairance muco-ciliaire est un autre mécanisme de défense du tractus respiratoire, que ce soit dans la cavité nasale ou au niveau bronchique. Elle est assurée par l'action coordonnée du mucus produit par les cellules caliciformes, les glandes séromuqueuses ou les cellules de Clara, et le battement rétrograde des cils des cellules épithéliales propulsant le mucus vers l'oropharynx où il sera dégluti. **Le mucus** est un gel possédant à la fois les propriétés élastiques d'un solide et les propriétés visqueuses d'un liquide. En conditions physiologiques, il est composé d'environ 95% d'eau, 2% de glycoprotéines, 1% de protéines, 1% de lipides et 1% de sels inorganiques, et forme une barrière de 5 à 10 μm d'épaisseur (Samet and Cheng, 1994; Smith et al., 2008). Dans sa portion en contact avec l'air, il est visqueux, ce qui permet de piéger les particules inhalées, et dans sa portion en contact avec l'épithélium, il est fluide afin de suivre les mouvements des cils (Kim, 1997; Rackley and Stripp, 2012; Randell et al., 2006). Le mucus doit ses propriétés rhéologiques aux mucines. **Les mucines** sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire (>100 kDa) composées d'un squelette peptidique riche en serine et thréonine portant des groupements sucres (Voynow and Rubin, 2009). L'efficacité de l'épuration mucociliaire dépend de l'intégrité de l'épithélium respiratoire, de la quantité et des propriétés rhéologiques du mucus, et de l'efficacité du battement ciliaire. La fréquence de battement d'un cil normal est de 12-15 battements par

seconde permettant le déplacement du mucus à raison de 1 mm/minute (Fahy and Dickey, 2010).

La muqueuse respiratoire agit également comme une **barrière biochimique**. Les cellules épithéliales sécrètent en effet une grande variété de **substances antimicrobiennes, antivirales ou antifongiques** telles que des enzymes, des inhibiteurs de protéases, des oxydants, et des peptides antimicrobiens, qui s'accumulent dans le mucus (figure 34) (Ganesan et al., 2013). En réponse à une agression, elles contribuent également aux **réponses immunitaires innées et adaptatives** en produisant tout un arsenal de **cytokines et de chimiokines** (figure 34) (Vareille et al., 2011). Elles expriment en effet des PRR leur permettant de détecter les pathogènes, dont des TLR, parmi lesquels TLR2, TLR3, TLR4 et TLR5.

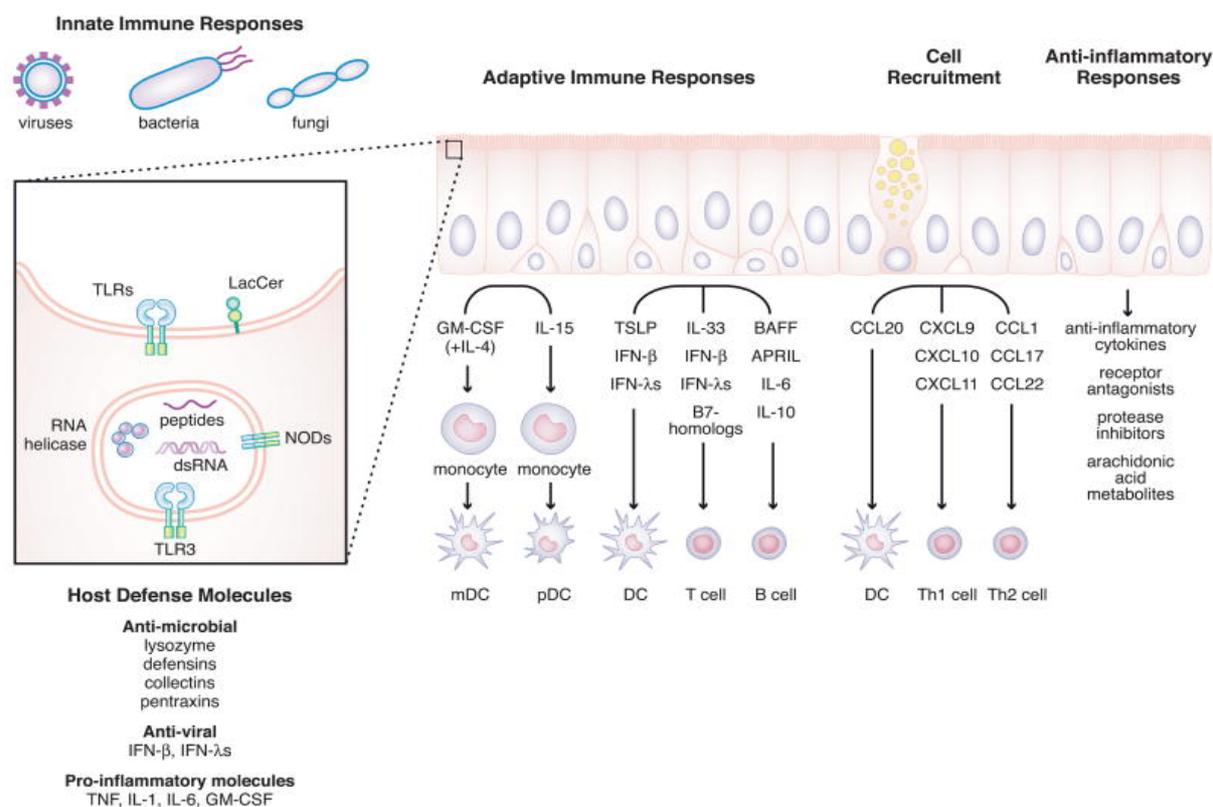


Figure 34 : Rôle des cellules épithéliales dans la réponse immunitaire innée et adaptative (Kato and Schleimer, 2007).

Enfin, au niveau alvéolaire, les pneumocytes de type II sont en charge de la synthèse du **surfactant pulmonaire (SP)**, qui outre son rôle dans la respiration, intervient dans la défense des poumons. Le surfactant pulmonaire est composé de lipides (90%), dont des phospholipides (80-85%) et du cholestérol (8-10%), et de protéines (10%) (Chroneos et al.,

2010). Les propriétés amphiphiles des phospholipides permettent au surfactant de parfaitement couvrir la surface des alvéoles, et ainsi de former une **barrière cytoprotectrice**. Les protéines du surfactant identifiées à ce jour sont au nombre de quatre : SP-A, SP-B, SP-C et SP-D (Nardelli-Haefliger et al., 2005). Alors que SP-B et SP-C facilitent l'étalement des phospholipides pour assurer la formation et la stabilité d'un film fin interfacial entre l'air et les poumons, SP-A et SP-D semblent jouer un rôle prépondérant dans l'immunité innée et adaptative des poumons (Agassandian and Mallampalli, 2013). Les protéines SP-A et SP-D renferment en effet dans leur structure un domaine N-terminal « collagen-like » et un domaine C-terminal de type lectine ou domaine CRD (en anglais, Carbohydrate recognition domain), et font donc partie de la famille des collectines (Pastva et al., 2007). Grâce à leur domaine CRD, les collectines fonctionnent comme des molécules de reconnaissance de motifs moléculaires. De la même manière que les PRR, SP-A et SP-D reconnaissent les carbohydrates présents à la surface des micro-organismes. Cette reconnaissance permet une opsonisation des micro-organismes par les protéines SP-A et SP-D aboutissant à leur phagocytose par les macrophages ou les neutrophiles (Glasser and Mallampalli, 2012). Ainsi, ces protéines contribuent à une réponse immunitaire innée inflammatoire contre les bactéries, virus et fongis. Ces protéines joueraient également un rôle dans l'immunité adaptative (Nayak et al., 2012).

3.2.2. Caractéristiques immunologiques

Les muqueuses sont des sites majeurs d'entrée des pathogènes dans l'organisme. Aussi, ces surfaces sont équipées de cellules ou de tissus immunitaires, qui les protègent des infections. Dans le tractus respiratoire, ces cellules ou tissus sont principalement les CD, les macrophages alvéolaires et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (en anglais, mucosal-associated lymphoid tissue ou MALT). Semblables aux ganglions lymphatiques, les MALT sont considérés comme les principaux sites inductifs d'une réponse immunitaire mucoale suite à une infection ou à un vaccin.

3.2.2.1. Cellules dendritiques

Des **CD** sont retrouvées tout le long du tractus respiratoire, du nez jusqu'aux alvéoles, en contact intime avec l'épithélium ou dans la sous-muqueuse. Toutefois, leur densité diminue lorsque l'on descend dans le tractus respiratoire, si bien qu'elles seraient plus abondantes dans la cavité nasale et la trachée que dans les autres régions (Hammad and

Lambrecht, 2011). Initialement, une seule population de CD pulmonaires était connue. Aujourd'hui, on pense qu'il existe, en conditions normales, au moins 5 sous-types de CD, se différenciant par leur localisation anatomique (intra-épithéliale ou dans la sous-muqueuse ; voies de conduction ou alvéoles) et leur fonction. En conditions inflammatoires, de nouveaux sous-types de CD seraient recrutés. De plus en plus de travaux suggèrent également que la fonction de ces CD serait fortement influencée par l'environnement tissulaire, et notamment les cytokines et chimiokines produites par les cellules épithéliales.

3.2.2.2. Macrophages

Des **macrophages résidents** sont présents au niveau alvéolaire. Ils constituent la principale des quatre sous-populations de macrophages respiratoires avec les macrophages pleuraux, interstitiels et intravasculaires. Ils se concentrent dans la mince couche de liquide alvéolaire, à l'interface tissu/air. Ils expriment de fortes densités de récepteur Fc (partie constante des Ig), récepteur du complément, récepteur du mannose et récepteur scavenger (éboueur), pour faciliter la phagocytose de particules opsonisées et non-opsonisées. Ils peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines (TNF- α , IL-6, IL-12, MCP-1, IL-8, IFN- γ , ...), mais également du TGF- β ou des prostaglandines capables d'inhiber l'activation des cellules T. Ainsi, ces cellules jouent un rôle pro- ou anti-inflammatoire en fonction de leur phénotype sécrétoire. Comme c'est le cas pour les CD, l'activité des macrophages alvéolaires est sous l'influence des médiateurs sécrétés par les cellules épithéliales (Gordon and Read, 2002; Hussell and Bell, 2014; Ye et al., 2006).

3.2.2.3. Tissus lymphoïdes

Des tissus lymphoïdes sont présents dans la cavité nasale et les voies aériennes au niveau bronchique. Ces tissus sont désignés par les acronymes NALT (en anglais, Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue) et BALT (en anglais, Bronchus-Associated Lymphoid Tissue), respectivement.

Chez l'Homme, les NALT sont **localisés** au niveau de l'anneau de Waldeyer, constitué par les amygdales palatines, pharyngées, tubaires et linguales (Brandtzaeg, 2003). Ces tissus ont été également décrits chez les rongeurs, et en particulier chez la souris. Chez ces dernières, les NALT forment des structures triangulaires symétriques à l'entrée du conduit pharyngal au dessus du palais (figure 35) (Asanuma et al., 1997; Spit et al., 1989), et sont

considérés comme analogue à l'anneau de Waldeyer chez l'Homme (Kiyono and Fukuyama, 2004).

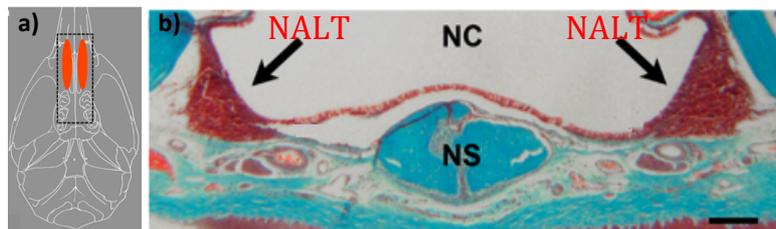


Figure 35 : Localisation des NALT chez la souris. a) Représentation schématique montrant les NALT par rapport à la bouche et les molaires. b) Coupe frontale de la cavité nasale montrant la forme triangulaire des NALT. Les NALT sont situés de part et d'autre des voies aériennes nasales, qui sont complètement séparées par la cloison nasale dans la partie postérieure du nez (barre 100 µm) (Nacer et al., 2014). NC : cavité nasale, NS : septum nasal.

Quant aux BALT, on les trouve dans les zones pérbronchiques, périvasculaires et interstitielles des poumons chez de nombreuses espèces de mammifères, y compris le lapin et le rat. Cependant, dans des conditions non pathologiques, ils sont absents chez l'Homme et la souris. Leur formation est seulement déclenchée en réponse à une infection ou une inflammation (figure 36) (Chiavolini et al., 2010; Tschernig and Pabst, 2000).

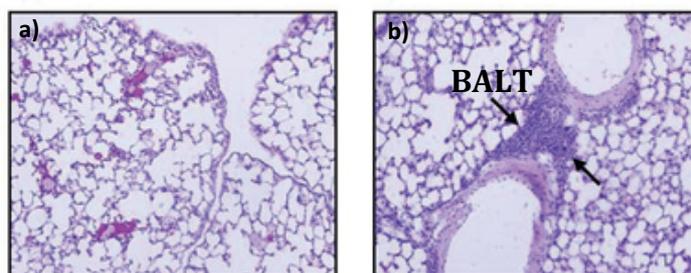


Figure 36 : Les BALT chez la souris. a) Coupe de poumon d'une souris saine. b) Coupe de poumon d'une souris exposée au LPS (Chiavolini et al., 2010; Tschernig and Pabst, 2000).

La structure et le mode de fonctionnement des NALT et BALT ressemblent à ceux des autres MALT, dont les plaques de Peyer au niveau digestif (figure 37) (Cesta, 2006). Les MALT sont fonctionnellement divisés en **sites inducteurs** et **sites effecteurs**. Chez la souris les NALT et les BALT sont des sites inducteurs. Ces sites inducteurs sont formés de follicules de cellules B et de cellules T, associés à un réseau de CPA, dont des macrophages, des cellules B et des CD. Cette structure est recouverte d'un épithélium contenant des cellules M (Microfold). Les cellules M sont pourvues de microvillosités courtes et irrégulières qui leur permettent de capturer l'antigène. L'antigène sera ensuite acheminé jusqu'aux CPA par transcytose (Kiyono and Fukuyama, 2004). Ainsi, **ces sites inducteurs** possèdent toutes les cellules nécessaires à l'induction d'une réponse immunitaire locale, humorale ou cellulaire. Pour cela, les CPA migrent vers les follicules de cellules T, pour y présenter l'antigène. Dans

les sites inducteurs, les LB subissent, sous le contrôle des lymphocytes activés, une expansion clonale et une commutation isotypique vers les IgA (Lycke, 2012). En effet, une des principales fonctions des MALT est de produire et de sécréter des IgA, une Ig essentielle dans la défense des muqueuses. Des réactions cytotoxiques médiées par les lymphocytes T peuvent également survenir. A noter que dans les régions où les structures lymphoïdes et les cellules M sont absentes, des CD intra- ou sous-épithéliales peuvent capturer les antigènes grâce à leurs pseudopodes qui traversent l'épithélium. Ces CD migreront dans ce cas vers les ganglions lymphatiques locaux pour présenter l'antigène aux lymphocytes.

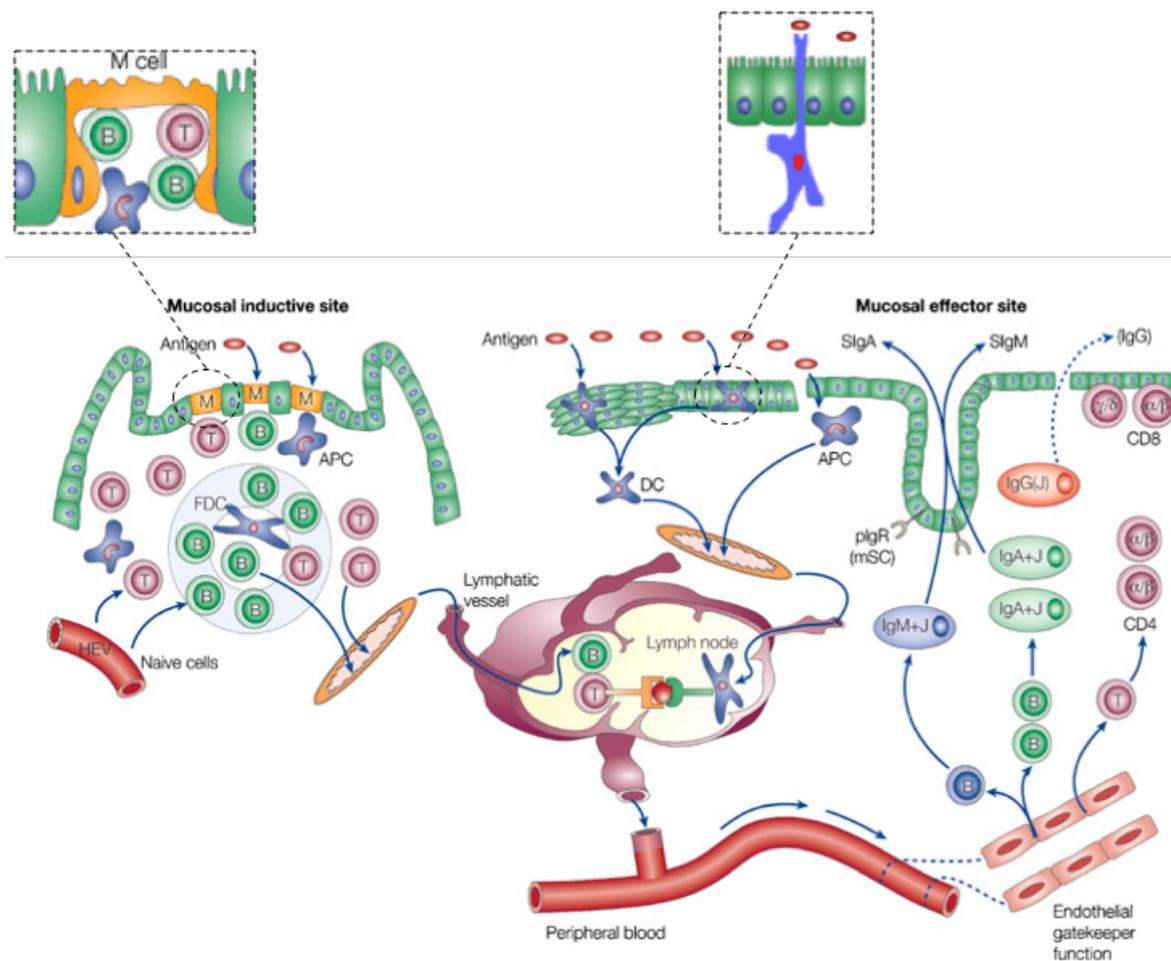


Figure 37 : Structure et mode de fonctionnement des MALT (modifiée à partir de Brandtzaeg et al., 2008). FDC (en anglais, Follicular dendritic cells), HEV (en anglais, High endothelial venules), mSC (en anglais, Membrane secretory component), pIgR (en anglais, Polymeric Ig receptor), SIg (Immunoglobulines sécrétées).

Après activation dans les sites inducteurs des MALT, les LB devenus plasmocytes et les LT rejoignent le(s) site(s) effecteur(s) (figure 37). Ces **sites effecteurs** sont présents dans toutes les muqueuses. Cette migration du site inducteur, où se fait la rencontre avec l'antigène, vers le(s) site(s) effecteur(s) où le pathogène va être neutralisé grâce aux IgA

produites par les plasmocytes, est appelée *homing*. Au niveau du site effecteur, les plasmocytes vont produire une grande quantité d'IgA grâce aux cytokines (telles que l'IL-5 et l'IL-6) produites par les lymphocytes TCD4⁺. Les IgA vont être transportées, sous la forme d'IgA sécrétoires, à travers l'épithélium vers la lumière de la muqueuse, où elles neutraliseront le pathogène avant qu'il ne pénètre dans la muqueuse (Brandtzaeg, 2009; Brandtzaeg et al., 2008; Kiyono and Fukuyama, 2004). Ainsi, bien que les différents MALT présents dans l'organisme soient anatomiquement séparés, ils sont fonctionnellement connectés, faisant que la présentation de l'antigène et l'activation des cellules B dans un site inducteur peuvent se traduire par la sécrétion d'IgA dans les sites effecteurs d'un organe situé à distance du site inducteur. Ce fonctionnement des MALT en réseau, appelé « système immunitaire mucosal commun » (en anglais, Common mucosal immune system) fait qu'il est possible de vacciner à distance de la muqueuse à protéger.

En raison de sa structure anatomophysiologique et surtout immunologique, la voie respiratoire se présente donc comme une voie d'administration intéressante pour la vaccination.

3.3. Vaccination par voie respiratoire

L'idée de vacciner des individus par voie respiratoire n'est pas nouvelle. La voie nasale a été utilisée dès le X^{ème} siècle, en Chine, pour l'immunisation contre la variole. Malgré cette utilisation ancienne, la vaccination par voie respiratoire s'est peu développée. En effet, seuls deux vaccins destinés à cette voie sont actuellement sur le marché : le FluMist[®], disponible aux Etats-Unis depuis 2003 et au Canada depuis 2010, et le Fluenz[®], commercialisé en Europe depuis 2011. Ces deux vaccins à base de virus vivants atténués sont administrés par pulvérisation nasale pour la protection contre la grippe saisonnière. Toutefois, d'autres préparations destinées à la voie respiratoire, telles que les vaccins contre la coqueluche (Projet CHILD-INNOVAC) ou le HPV, sont en cours de développement.

3.3.1. Induction des réponses immunitaires après vaccination par voie respiratoire

Des études précliniques et cliniques ont été réalisées, afin d'étudier le potentiel de la voie respiratoire pour la vaccination antivirale, antibactérienne ou antifongique. Ces études ont permis de montrer que la vaccination par cette voie permet d'obtenir une réponse humorale et cellulaire locale et à distance.

Réponse humorale. Des études chez le mouton ont mis en évidence qu'une immunisation pulmonaire contre le virus Influenza, par administration d'un souche virale inactivée en présence d'ISCOMATRIX™ (un adjuvant particulière composé de cholestérol, phospholipides et saponine) permettait l'induction d'une réponse humorale associée à de fortes productions d'IgA pulmonaires et d'IgG sériques. Cette réponse était de longue durée et garantissait une protection antivirale même un an après l'immunisation (Vujanic et al., 2012a). La vaccination par voie respiratoire permet également d'induire une réponse anticorps à distance (Lycke, 2012; Pavot et al., 2012). En effet, Bernardis (2002) et collaborateurs ont rapporté que l'administration nasale d'un vaccin à base de facteurs de virulence de *Candida albicans*, associés à de la toxine cholérique, permettait de protéger contre une infection vaginale par ce pathogène chez le rat, et ceci aussi efficacement qu'une vaccination par voie vaginale (De Bernardis et al., 2002). Des résultats semblables ont été obtenus dans le cas de la vaccination anti-VIH chez des macaques. Une étude a montré que l'administration nasale d'un vaccin à base de sous-unités antigéniques de la protéine d'enveloppe gp41 greffées à la surface de virosomes permettait d'induire la production d'IgG et d'IgA au niveau vaginal. *In vitro*, ces anticorps se fixaient sur le virus et l'empêchaient de contaminer des cellules, mais également conduisaient à sa mort par ADCC (Bomsel et al., 2011). Certains travaux en vaccination respiratoire ont concerné l'immunisation contre HPV, responsable du cancer du col de l'utérus. Citons dans ce cas une étude conduite chez des femmes volontaires, afin d'explorer l'intérêt de la voie respiratoire par rapport aux voies parentérales. Cette étude a montré que la nébulisation nasale ou l'aérosolisation bronchique d'un vaccin contre HPV permettait d'induire une réponse muco-systémique avec production d'IgG et IgA vaginales et sériques, l'aérosolisation s'avérant toutefois plus immunogène que la nébulisation nasale (Kawana et al., 2003; Nardelli-Haeffliger et al., 2005).

Réponse cellulaire. La réponse immune à médiation cellulaire implique l'activation des lymphocytes CD8⁺ et CD4⁺. Bivas-Benita et collaborateurs ont rapporté que l'administration pulmonaire d'une seule dose d'un **vaccin à ADN contre le VIH** ou le virus de la grippe (plasmide vectorisé par un polymère de polyéthylèneimine), conduisait à une activation locale des lymphocytes CD8⁺, chez la souris. Cette activation, qui persistait après la disparition de l'antigène, se traduisait par une charge virale plus faible dans les poumons et les ovaires des souris immunisées par rapport aux souris non immunisées (Bivas-Benita et al., 2013). Une autre étude a montré que l'administration respiratoire d'un **vaccin recombinant contre *Mycobacterium tuberculosis*** à base d'adénovirus se traduisait par une accumulation

de cellules TCD4⁺ et CD8⁺ dans la lumière des voies aériennes, chez la souris. Ces cellules étaient capables de produire de l'IFN- γ et d'exercer une activité cytotoxique. De manière intéressante, le transfert de ces cellules dans les voies respiratoires de souris SCID (immunodéficiences sévères combinées) naïves permettait de protéger ces souris contre une infection par *Mycobacterium tuberculosis* (Santosuosso et al., 2005). Ciabattini et collaborateurs ont montré, chez la souris, qu'une administration respiratoire d'un **vaccin recombinant contre *Streptococcus gordonii*** induisait l'activation des lymphocytes TCD4⁺ et TCD8⁺ dans les ganglions drainant le site d'administration, mais également dans ceux drainant les muqueuses intestinale et génitale, ainsi que dans la rate (Ciabattini et al., 2010). Enfin, Tartour et collaborateurs (2013) ont étudié l'intérêt d'une vaccination par voie respiratoire pour inhiber la croissance de tumeurs des muqueuses dans des modèles orthotopiques de cancers (tête et cou, et poumon) chez la souris. **Le vaccin antitumoral** consistait en un peptide dérivé de l'oncoprotéine E7 du virus HPV couplé à la sous-unité B de la toxine Shiga, comme agent de ciblage des CD. Un adjuvant était ajouté à ce conjugué lors de la première vaccination. Les souris étaient vaccinées par voie respiratoire ou par injection intramusculaire (i.m.). Ces travaux ont montré que la croissance des tumeurs était inhibée lorsque les souris étaient immunisées par voie respiratoire, mais pas lorsqu'elles étaient vaccinées par voie i.m.. Cette activité antitumorale était dépendante d'un recrutement de cellules TCD8⁺ spécifiques dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur, recrutement absent chez les souris immunisées par voie i.m.. Elle était observée aussi bien dans un protocole prophylactique que dans un protocole thérapeutique. Ces résultats suggèrent que la voie d'immunisation influence directement la capacité d'un vaccin antitumoral à induire une réponse immunitaire cellulaire muqueuse et à contrôler la croissance de tumeurs muqueuses (Sandoval et al., 2013).

Ainsi, la vaccination par voie respiratoire se présente comme une stratégie intéressante dans l'induction d'une réponse muqueuse et systémique humorale ou cellulaire de longue durée, et l'obtention d'une protection antivirale, antibactérienne ou antitumorale.

3.3.2. Place actuelle des systèmes nanoparticulaires dans la vaccination par voie respiratoire

Divers types de nanoparticules, dont des liposomes, font l'objet d'études pour la vaccination par voie respiratoire, dans des applications variées telles que la vaccination

antivirale, la vaccination antibactérienne ou la vaccination antitumorale (Csaba et al., 2009; Davis, 2001; Kunda et al., 2013; Sou et al., 2011). Nous illustrerons ici ces systèmes, leurs applications et leur intérêt par quelques exemples choisis. Puis, dans un second temps (§ 3.3.3), nous verrons comment ces systèmes particuliers peuvent être optimisés pour tenir compte des contraintes liées à l'anatomie, la physiologie et les propriétés du tractus respiratoire et de sa muqueuse.

3.3.2.1. Vaccination antivirale

La capacité d'un vaccin à induire une réponse mémoire T cytotoxique dans le poumon est une propriété indispensable pour traiter les infections respiratoires par les pathogènes, et notamment les virus. Afin d'obtenir cette réponse, Nembrini et collaborateurs (2011) ont conjugué un antigène modèle, l'OVA, sur des **nanoparticules de polypropylène** et administré ces particules en présence d'un oligonucléotide riche en séquences CpG (en guise d'adjuvant) dans les voies respiratoires de souris, en comparaison à l'antigène libre. Une réponse LTC effectrice locale et systémique (rate) a été obtenue après vaccination des animaux. Dans le poumon, cette réponse était 10 fois plus importante avec le vaccin nanoparticulaire comparé au vaccin non-vectorisé, permettant l'obtention d'une réponse mémoire et la protection contre une infection par un virus de la grippe recombinant exprimant un épitope TCD8⁺ de l'OVA. Ces travaux ont également montré que l'utilisation des nanoparticules favorisait la capture de l'antigène par les CD et la migration de ces CPA vers les ganglions lymphatiques locaux (Nembrini et al., 2011).

Une étude clinique de phase II chez des adultes sains a évalué la réponse mucoale (production d'IgA neutralisants) induite par l'administration nasale d'un vaccin contre le virus de la grippe à base de **virosomes**, contenant ou non un adjuvant (toxine d'*Escherichia Coli*), et comparé cette réponse à celle induite par l'administration i.m. du même vaccin. Cette étude a montré que la vaccination nasale permet d'induire une réponse mucoale plus importante que la vaccination i.m. (Durrer et al., 2003). Ces données suggèrent que la voie d'immunisation influence directement la capacité d'un vaccin à induire une protection au niveau des muqueuses. Une autre étude clinique a montré que l'administration nasale de **virosomes** vectorisant un peptide lipidé dérivé de la protéine de surface gp-41 du VIH permettait d'obtenir une production d'IgG et d'IgA spécifiques au niveau des muqueuses vaginales et rectales. De plus, les Ig induites au niveau vaginal étaient capables de bloquer la

transcytose du VIH dans des essais *in vitro*, suggérant que la vaccination nasale pourrait permettre de protéger d'une infection transmise sexuellement (Leroux-Roels et al., 2013).

3.3.2.2. Vaccination antibactérienne

Une réponse T cytotoxique locale est également recherchée dans le cas d'une vaccination antibactérienne visant à protéger d'une infection respiratoire. Sur le principe de l'étude de Nembrini et collaborateurs (2011) décrite ci-dessus, Ballester et collaborateurs (2011) ont conjugué l'antigène Ag85B dérivé de *Mycobacterium tuberculosis* sur des **nanoparticules de polypropylène**, et étudié la capacité de ce vaccin à induire une réponse immunitaire locale et systémique chez des souris, en comparaison à l'antigène libre. L'administration respiratoire du vaccin nanoparticulaire en présence d'un ADN riche en séquences CpG a permis l'obtention d'une réponse immunitaire cellulaire de type Th1, dans la rate, le poumon et les ganglions drainants. Cette réponse était plus importante que celle induite par l'antigène seul, mais également que celle provoquée par l'administration intradermique du vaccin. L'administration respiratoire du vaccin nanoparticulaire a également permis d'obtenir la meilleure protection contre une infection bactérienne (Ballester et al., 2011).

3.3.2.3. Vaccination antitumorale

A ce jour, peu d'études se sont intéressées à la vaccination antitumorale par voie respiratoire à l'aide de nanoparticules. Matsuo et collaborateurs (2011) ont évalué la capacité de **nanoparticules amphiphiles d'acide γ -polyglutamique** administrées par voie respiratoire, à induire une réponse antitumorale dans des modèles murins de tumeurs (tumeurs solides et métastases pulmonaires) surexprimant un antigène modèle. L'antigène, i.e. l'OVA, était encapsulé dans les nanoparticules. Des animaux ont été immunisés avec de l'OVA seule pour évaluer l'apport des nanoparticules. Bien que les taux sériques d'IgG spécifiques étaient équivalents chez les animaux immunisés avec le vaccin nanoparticulaire et ceux immunisés avec l'antigène soluble, la vaccination respiratoire avec le vaccin nanoparticulaire a permis d'obtenir des LTC et des cellules sécrétrices d'IFN- γ spécifiques de l'OVA dans la rate et les ganglions lymphatiques, et une immunité spécifique à long-terme. Dans un protocole prophylactique, l'administration respiratoire du vaccin à base de nanoparticules a induit une régression ou un rejet total des tumeurs solides surexprimant l'OVA et une augmentation du temps de survie des souris. Dans un protocole thérapeutique,

le vaccin nanoparticulaire a contribué à une diminution significative (de 5 fois environ) des métastases pulmonaires par rapport au vaccin composé de l'antigène seul (figure 38). Par ailleurs, après administration respiratoire, les nanoparticules étaient rapidement prises en charge par les NALT pour être acheminées vers les ganglions cervicaux (Matsuo et al., 2011).

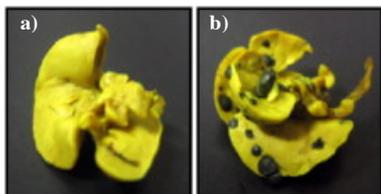


Figure 38 : Réponse antitumorale curative de nanoparticules d'acide γ -polyglutamique contenant de l'OVA après administration respiratoire. a) vaccin nanoparticulaire. b) OVA en solution (Matsuo et al., 2011).

Une autre étude a montré qu'il était possible d'obtenir une immunité antitumorale après vaccination respiratoire prophylactique ou thérapeutique à l'aide d'un **vaccin nanoparticulaire véhiculant un ARNm** chez la souris. L'ARNm codait pour un antigène modèle, l'OVA. Il était formulé à l'état de nanoparticule à l'aide d'un agent de transfection. Le modèle de tumeur était un modèle de tumeurs solides surexprimant l'OVA. Le vaccin nanoparticulaire a induit une réponse antitumorale exprimée par une diminution de la progression tumorale et une augmentation de la survie des animaux par rapport aux souris ayant reçu l'ARN non vectorisé. La réponse antitumorale a été observée aussi bien en vaccination prophylactique qu'en thérapeutique, et elle a été associée à une augmentation des cellules TCD8⁺ spléniques (Phua et al., 2014).

L'exploitation des liposomes pour l'obtention d'une réponse immunitaire antitumorale après vaccination respiratoire reste très limitée. En effet, seule l'équipe de Zhou et collaborateurs (2009) a utilisé des liposomes pour la prévention de métastases pulmonaires chez la souris (lignées tumorales : colon26/Luc et B16F10 implantées à des souris C57BL/6). Il s'agissait de liposomes cationiques complexant un oligonucléotide CpG, et donc d'immunothérapie non spécifique plutôt que de vaccination. Après administration par instillation nasale, les lipoplexes se sont distribués dans le nez et les poumons des animaux, et ont induit une production d'IFN- γ dans les poumons (Zhou et al., 2010). Le développement des tumeurs était inhibé et la survie des souris était augmentée.

Ainsi, ces quelques études montrent un apport certain des nanoparticules en vaccination par voie respiratoire pour le traitement et la prévention de maladies infectieuses et cancéreuses. Le tableau 3 regroupe d'autres exemples d'applications des nanoparticules en vaccination par voie respiratoire.

Tableau 3 : Exemples d'applications des nanoparticules en vaccination par voie respiratoire chez des animaux.

	Cible (antigène)	Voie d'administration	Réponses observées	Référence
Nanosphères de PLA/PLGA	Hépatite B (protéine de surface de l'hépatite B)	Respiratoire	Induction d'une réponse mucosale humorale avec production d'IgA au niveau local (poumon) et à distance (salive, vagin) Induction d'une réponse systémique au niveau de la rate avec production d'IFN- γ et d'IL-2	(Thomas et al., 2011)
Nanocapsules lipidiques	Tumeur exprimant OVA (peptide OVA) ou Virus de l'immunodéficience simienne (peptide AL11)	Intratrachéale	Activation des CD dans les poumons et les ganglions médiastinaux Induction d'une réponse de type LTC mucosale locale et distale plus forte pour l'antigène vectorisé et administré par voie pulmonaire (par rapport au s.c.) Efficacité antitumorale totale en thérapeutique Induction d'une réponse antivirale en prophylactique	(Li et al., 2013)
ISCOM™	Virus Influenza (hémagglutinine)	Pulmonaire	Induction d'une forte réponse systémique (IgG) et locale (IgA) à 3 et 6 mois post-vaccination Instauration d'une réponse mémoire présente un an après la vaccination	(Vujanic et al., 2012a)
	<i>Haemophilus influenzae</i> non typable (ADN plasmique codant pour la protéine 6)	Respiratoire	Augmentation des CD dans les NALT Augmentation de l'expression du CMH-I et des molécules de costimulation par les CD Forte production d'IgA locales et d'IgG systémiques Forte production des cytokines de type Th1, Th2 et Th17 par les cellules TCD4 ⁺ des NALT (<i>in vitro</i>) Induction d'une réponse mémoire	(Kodama et al., 2011)
Nanoémulsion	Hépatite B (protéine de surface de l'hépatite B)	Nasale	Réponse systémique (majoritairement IgG2) et mucosale (IgA) Réponse pro-Th1, comparée à une réponse pro-Th2 observée après vaccination par injection i.m. avec l'antigène non vectorisé	(Makidon et al., 2008)
Virosomes	Virus respiratoire syncytial (protéine de l'enveloppe)	Respiratoire	Production d'IgG sériques spécifiques Forte production d'IgG et IgA au niveau local, comparable à la vaccination par le virus vivant	(Shafique et al., 2013)
Liposomes	HIV (glycoprotéine de l'enveloppe 160)	Respiratoire	Induction d'une réponse cytotoxique et humorale spécifique de l'antigène avec production de cytokines de type Th1 et Th2 dans les muqueuses et la rate Production d'IgA dans les sécrétions nasales, salivaires, fécales et vaginales Production d'IgG sériques	(Sakaue et al., 2003)
	Tétanos (toxine tétanique)	Nasale	Réponse immunitaire mucosale plus importante comparée à l'antigène en solution Forte production d'IgA contre la toxine tétanique au niveau nasal	(Tafaghodi et al., 2006)
	Virus de l'influenza (hémagglutinine)	Respiratoire	Forte production d'IgA au niveau de la muqueuse respiratoire et vaginale Production d'IgG sériques avec vaccination respiratoire par les liposomes comparable à la vaccination par voie i.m. avec l'antigène seul	(De Haan et al., 1995)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Peptide dérivé de la de la piline)	Respiratoire	Forte production d'IgA au niveau local comparée à la vaccination i.p. Production IgG sériques plus faible par rapport à l'immunisation i.p.	(Heurtault et al., 2009)

3.3.3. Stratégies d'optimisation des systèmes nanoparticulaires en vaccination respiratoire

L'activité et l'efficacité d'un vaccin sont étroitement dépendantes de son interaction et de sa reconnaissance par les CPA. Au niveau des voies respiratoires, la clairance mucociliaire permet d'éliminer les particules inhalées, y compris les particules vaccinales. Chez l'Homme, une préparation liquide ou une poudre déposée dans la cavité nasale est rapidement éliminée avec un temps de demi-vie d'environ 15-20 min (Soane et al., 1999). Dans le cadre de la vaccination à l'aide de systèmes nanoparticulaires, ce temps de résidence relativement court peut limiter la capture des particules vaccinales par les cellules M ou les CPA, et donc l'activité d'un vaccin. Ainsi, un des grands enjeux de la vaccination par voie respiratoire est de passer outre la clairance mucociliaire pour atteindre les cellules du système immunitaire local. Afin de passer outre ce problème, différentes stratégies d'optimisation des vaccins sont actuellement explorées. Les deux stratégies les plus répandues sont d'une part, l'augmentation du temps de résidence par l'ajout à la particule d'agents permettant la mucoadhésion (en l'occurrence des polymères), et d'autre part, l'utilisation d'agents de ciblage des cellules épithéliales (notamment les cellules M) et des CPA, permettant de favoriser la reconnaissance et l'apprêtement des antigènes vaccinaux.

3.3.3.1. Mucoadhésion

La mucoadhésion a pour objectif de permettre l'adhésion du vaccin au mucus. Le mécanisme de mucoadhésion est généralement défini comme l'adhérence entre deux matériaux dont l'un est le mucus. Diverses théories ont été proposées pour expliquer ce mécanisme (Serra et al., 2009), dont les plus importantes sont les suivantes :

- la *théorie du mouillage* implique un contact intime entre le mucus et l'agent d'adhésion. Cette théorie se base sur la tension de surface pour calculer la dissémination de l'agent mucoadhésif dans le mucus.

- la *théorie électrostatique* implique que l'agent mucoadhésif et le mucus ont des charges différentes résultant en la formation d'une double couche électrique. Un transfert d'électrons et des forces d'attraction sont responsables du maintien de l'adhésion entre les deux couches.

- la *théorie de la diffusion* décrit que le gradient de concentration à l'interface induit l'interpénétration des chaînes de l'agent d'adhésion dans les chaînes glycoprotéiques des mucines, permettant la formation d'une liaison semi-permanente.

- la *théorie d'adsorption*, selon laquelle l'interaction se fait par des forces de Van der Waals, des liaisons hydrogènes ou des liaisons hydrophobes.

Différents polymères synthétiques ou naturels tels des dérivés de cellulose, du chitosan, de l'acide hyaluronique et de l'acide acrylique sont utilisés comme agents mucoadhésifs dans la formulation de vecteurs de principes actifs, et notamment de vaccins nanoparticulaires (Alpar et al., 2005). Durant les deux dernières décennies, le chitosan [α (1–4) 2-amino 2-deoxy β -D glucan], un copolymère naturel de glucosamine et de N-acétylglucosamine, dérivé de la chitine, a suscité un grand intérêt pour la formulation de vecteurs thérapeutiques et de vaccins destinés à la voie mucoale. Ce polymère biocompatible contribue à la mucoadhésion par le fait qu'à pH physiologique, il peut être chargé positivement et donc interagit par des forces électrostatiques avec les mucines chargées négativement. Des interactions de type hydrophobe et hydrogène contribuent également à la propriété de mucoadhésion du chitosan (Illum et al., 2001; Sogias et al., 2008). Le chitosan a été utilisé pour formuler un vaccin nanoparticulaire à base d'ADN destiné à protéger contre une infection respiratoire par *Mycobacterium tuberculosis*. Ce vaccin s'est avéré capable d'activer des CD *in vitro*. Administré par aérosol à des souris, il a induit une réponse immunitaire au niveau de la rate, caractérisée par une sécrétion d'IFN- γ . Cette réponse était plus importante que suite à une vaccination par voie i.m. (Bivas-Benita et al., 2004). D'autres études *in vivo* ont montré que la présence de chitosan ou de ses dérivés dans un vaccin contribue à une augmentation significative du temps de résidence de l'antigène dans la cavité nasale, et une meilleure prise en charge des particules par les NALT. De même, un recouvrement par du chitosan (ou ses dérivés) permet d'augmenter la production de cytokines et d'anticorps induite au niveau systémique et mucoal, par l'administration nasale de nanoparticules vaccinales de PLGA, comparé à des particules non recouvertes (Pawar et al., 2013; Slutter et al., 2010; Vila et al., 2004). Ces études montrent aussi que des vaccins constitués exclusivement de particules de chitosan sont plus efficaces que des nanoparticules de PLGA recouvertes de chitosan (Slutter et al., 2010; Vila et al., 2004). Parallèlement, Amin et collaborateurs (2009) ont rapporté que le recouvrement par du chitosan cationique diminue l'efficacité vaccinale de liposomes anioniques après vaccination nasale chez le lapin. Les auteurs en ont déduit que le chitosan pourrait affecter l'interaction des liposomes avec les

cellules M (Amin et al., 2009). Ainsi, on peut en conclure que le chitosan peut renforcer l'efficacité des vaccins nanoparticulaires par augmentation du temps de résidence et de la prise en charge de l'antigène par les CPA dans les voies respiratoires. Cependant, l'apport de ce polymère semble dépendre de la composition du vaccin.

Du fait de leur propriété de gélifiant, **des dérivés celluloseux** peuvent aussi être utilisés afin d'augmenter le temps de résidence d'un vaccin au niveau du tractus respiratoire (Garmise et al., 2007). Une meilleure réponse immunitaire locale et/ou systémique a été observée par l'utilisation de l'acide acrylique (Coucke et al., 2009), de l'acide hyaluronique (Singh et al., 2001) et de la gomme xanthane (Chiou et al., 2009) dans le cadre de la vaccination contre le virus de la grippe. Cependant, à l'heure actuelle, l'intérêt de ces gélifiants dans la formulation de vaccins nanoparticulaires destinés à la voie respiratoire reste peu étudié.

3.3.3.2. Ciblage des cellules M ou des CPA

Un autre moyen d'optimiser la réponse du vaccin est de cibler les cellules M et/ou les CPA, qui sont impliquées dans la capture des particules et/ou la reconnaissance et l'apprêtement des antigènes vaccinaux.

Un des moyens utilisés pour **cibler les cellules M** est le ciblage de la **protéine claudine-4**. En effet, cette protéine normalement présente au niveau des jonctions serrées, est aussi exprimée par les cellules M et a été proposée agir, dans ces cellules, comme un récepteur d'endocytose qui pourrait favoriser la capture des antigènes particuliers (Lo et al., 2012).

La claudine-4 fonctionne comme un récepteur pour l'entérotoxine de *Clostridium perfringens* (CPE) responsable d'intoxications alimentaires chez l'homme (Kimura et al., 2010). Des études visant à élucider les mécanismes moléculaires de cette interaction ont montré que la CPE se lie sur la seconde boucle extracellulaire de la claudine-4, et que la claudine-4 interagit avec la partie C-terminaux de la CPE (figure 39). Ainsi, dans la littérature, des peptides issus du fragment C-terminale de la CPE (C-CPE) sont étudiés pour cibler la claudine-4.

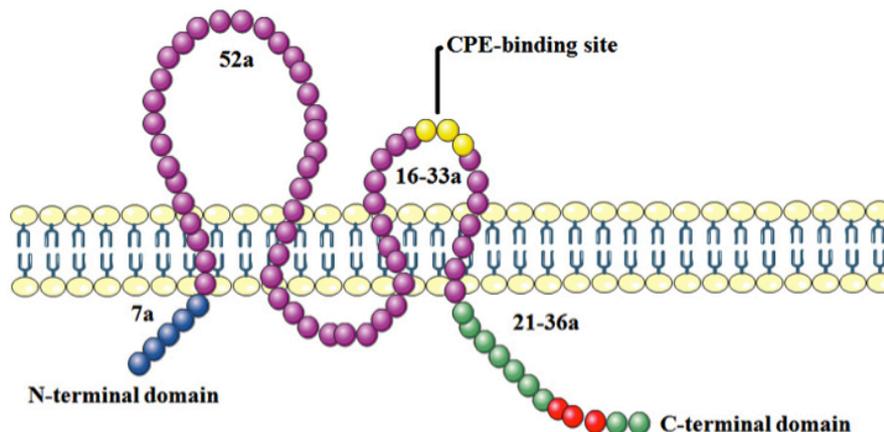


Figure 39 : Structure schématique de la claudine-4 avec son domaine de liaison à la CPE (d'après <http://www.bioscience.org>).

Le peptide CPE30, correspondant aux 30 aa C-terminaux de la CPE a récemment été utilisé avec succès pour cibler les cellules M lors d'une vaccination par voie nasale à l'aide de nanoparticules de PLGA. Dans ce travail, l'hémagglutinine recombinante du virus de la grippe a été couplée, ou non, au peptide CPE30 et incorporée dans des nanoparticules de PLGA. Ces particules ont été ensuite administrées à des souris afin d'étudier leur endocytose par les cellules M des NALT. Les résultats ont montré qu'en présence du CPE30, l'endocytose des particules vaccinales par les cellules M est grandement améliorée (de 30 fois environ) (Rajapaksa et al., 2010). Par ailleurs, des travaux ont montré que, quand ce peptide était couplé à l'OVA, il permettait d'induire la production d'IgA spécifiques au niveau nasal, vaginal et fécal chez la souris après vaccination respiratoire, contrairement au mélange physique OVA + peptide. Une réponse antitumorale était également obtenue chez des souris injectées avec des cellules tumorales surexprimant l'OVA, suite à une vaccination nasale avec la protéine de fusion OVA-CPE30 (Kakutani et al., 2010). D'autres travaux ont utilisé, avec succès, différents peptides issus de la partie C-terminale de la CPE, dont des peptides portant des mutations ponctuelles et présentant une affinité augmentée pour la claudine-4, dans la conception de vaccins destinés à la voie muqueuse (Suzuki et al., 2012; Takahashi et al., 2011; Uchida et al., 2010). D'après les travaux de Ling (2008), la structure minimale, permettant une reconnaissance et une interaction avec la claudine-4 serait une séquence de 12 aa de la partie C-terminale du CPE, appelée peptide MT2 (Ling et al., 2008). Ainsi, durant ce projet qui vise à formuler un vaccin minimaliste, nous avons utilisé cette séquence minimale pour cibler les cellules M.

Il est également possible de **cibler les CPA**, et en particulier les CD et les macrophages. Pour cela, il est envisageable d'utiliser des ligands des PRR comme les carbohydrates ou les lipopeptides. Jiang et collaborateurs (2008) ont montré que la conjugaison du mannose (pour le ciblage des récepteurs au mannose à la surface des macrophages) à des nanoparticules de chitosan permet une meilleure reconnaissance des particules par les CD et une meilleure activation de ces cellules *in vitro*. Ces résultats se sont confirmés *in vivo* par une plus forte production d'IgA nasales et salivaires, ainsi qu'une meilleure protection antibactérienne des souris ayant reçu les nanoparticules vaccinales mannosylées par voie respiratoire (Jiang et al., 2008). De même, l'utilisation de liposomes galactosylés (Hsiao-Wen Wang et al., 2013) ou de nanoparticules de chitosan mannosylées (Yao et al., 2013) pour le ciblage des macrophages en vaccination antitumorale a induit une meilleure protection systémique et mucosale. Enfin, la vaccination par voie respiratoire à l'aide d'un lipopeptide ligand des TLR incorporant un épitope TCD8⁺ et un épitope TCD4⁺ a permis le recrutement dans le poumon de TCD8⁺ mémoires et l'obtention d'une protection à long-terme contre le virus de la grippe chez la souris (Deliyannis et al., 2006). Aussi, dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé un lipopeptide, ligand des TLR2/6 pour optimiser nos vaccins.

Bien évidemment, plusieurs stratégies d'optimisation complémentaires peuvent être utilisées simultanément afin d'obtenir un effet additif. A titre d'exemple, le chitosan peut être utilisé en même temps que le mannose. De même, que des lectines peuvent être utilisées pour cibler à la fois les CPA et les cellules M.

Objectifs spécifiques des travaux de la thèse

L'état de l'art présenté dans ce chapitre d'introduction montre que les liposomes présentent toutes les caractéristiques d'un outil de choix pour la conception de vaccins sous-unitaires peptidiques, et notamment de vaccins antitumoraux. Dans certains cas, ils peuvent jouer le rôle d'adjuvant ou transporter et protéger des antigènes, des peptides, des acides nucléiques ou encore des adjuvants. Leur composition, leur taille, leur structure, leur charge, ou encore leur état de surface peuvent être modulés. La très grande versatilité de ces vecteurs offre ainsi un large choix de stratégies d'optimisation de leur activité en vaccination (figure 40).

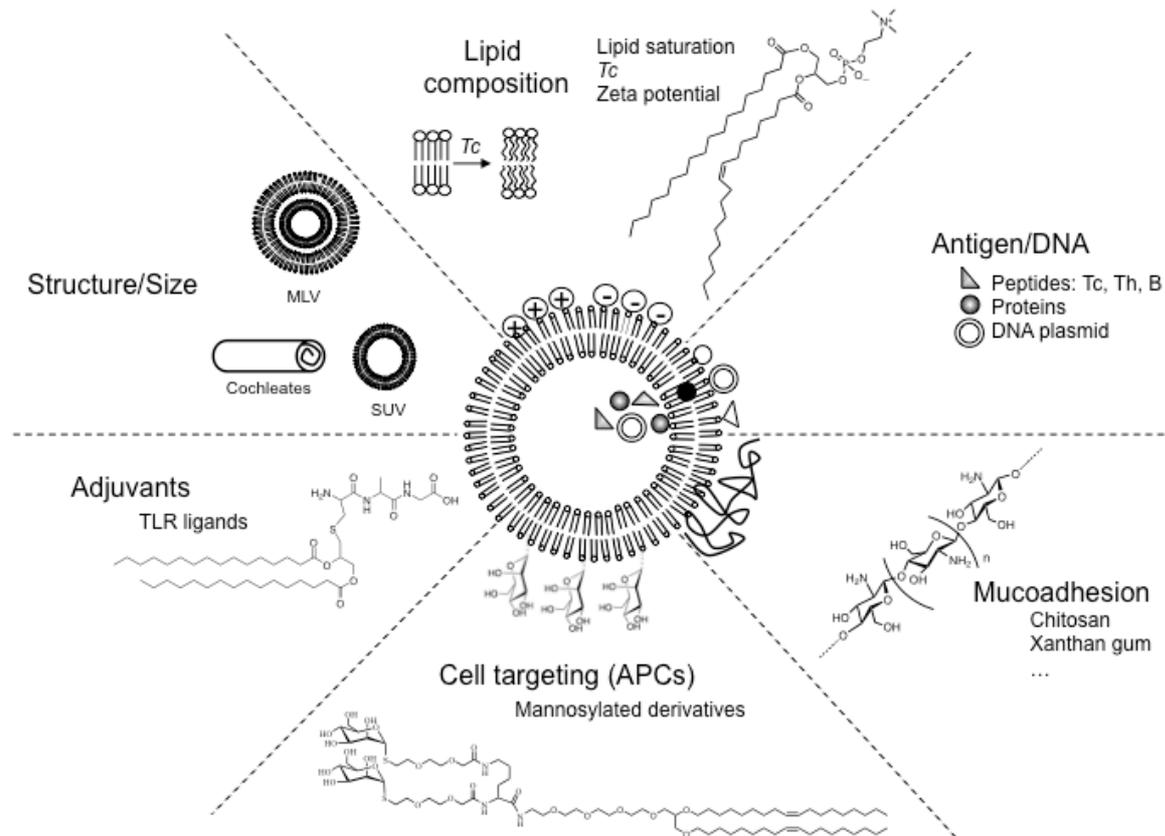
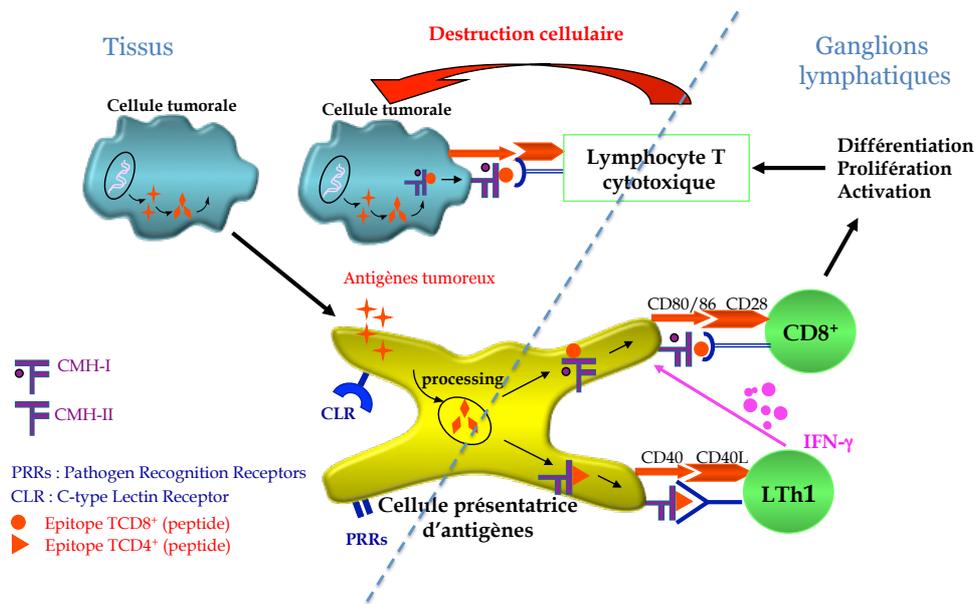


Figure 40 : Liposomes en tant que construction vaccinale versatile (Heurtault et al., 2010).

Au cours des dernières années, notre laboratoire a développé des constructions liposomiques composées des éléments essentiels au déclenchement d'une réponse immunitaire antitumorale à médiation cellulaire (ou spécifique) (figure 41). Ces constructions vaccinales sous-unitaires entièrement synthétiques, à base de liposomes de type SUV, contenaient en effet : un épitope peptidique TCD8⁺ ErbB2 (issu de la protéine ErbB2 surexprimée dans un grand nombre de tumeurs notamment du sein), un épitope TCD4⁺ Ha (issu de l'hémagglutinine du virus de la grippe), et une molécule adjuvante, le Pam₂CAG (ligand des récepteurs Toll-like).

A



B

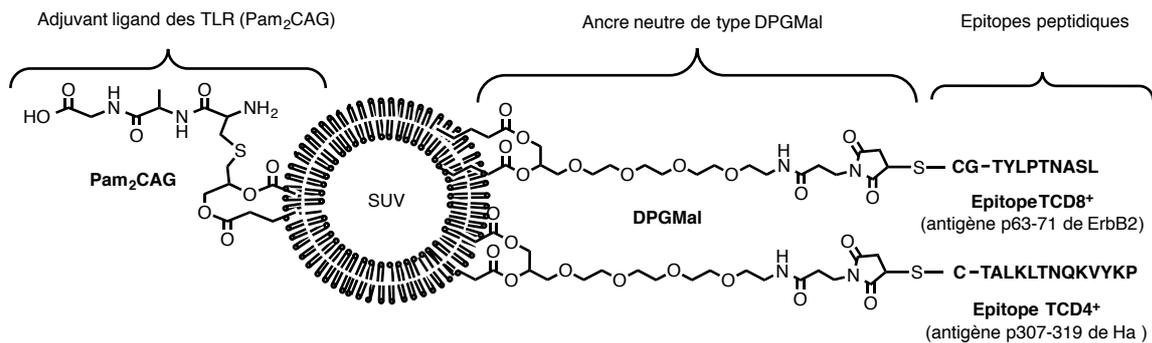


Figure 41: A) Représentation schématique des mécanismes de la réponse immunitaire antitumorale à médiation cellulaire devant être déclenchée par le vaccin, montrant les éléments essentiels à ce déclenchement, à savoir les épitopes TCD8⁺ et TCD4⁺ et les ligands des PRR. B) Construction liposomique ayant montré une efficacité antitumorale chez la souris après vaccination par voie sous-cutanée (construction appelée construction d'origine dans la suite de notre travail). Dans cette construction, le liposome mime la cellule tumorale.

Utilisées en vaccination s.c. prophylactique ou thérapeutique, ces constructions ont permis d'inhiber totalement le développement de tumeurs s.c. ou pulmonaires induites par l'injection de cellules tumorales surexprimant la protéine ErbB2 chez la souris, montrant tout l'intérêt des liposomes en vaccination antitumorale.

Le chapitre d'introduction a également permis de souligner que le tractus respiratoire est une voie d'administration intéressante pour la vaccination. Dans notre laboratoire, le

concept de vaccin décrit ci-dessus a été étudié dans le cadre d'une protection contre la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Des constructions liposomiques dans lesquelles l'épitope TCD8⁺ était remplacé par un épitope B issu de *Pseudomonas aeruginosa* ont été formulées et évaluées *in vivo* chez la souris après administration respiratoire. Une réponse immunitaire antibactérienne caractérisée par la production locale et systémique d'IgA spécifiques a été alors obtenue, illustrant l'intérêt de la voie respiratoire dans la vaccination, et notamment dans la vaccination à base de liposomes.

Dans ce contexte, l'objectif du travail de thèse a été de concevoir de nouvelles constructions liposomiques destinées à la vaccination antitumorale par voie respiratoire et d'étudier leur activité et leur efficacité *in vivo* chez la souris.

Pour répondre à ces objectifs, nos travaux ont consisté à :

1) **Construire et optimiser le vecteur liposomique** pour une vaccination antitumorale par voie respiratoire, à partir de la construction précédemment validée au laboratoire (construction d'origine), ceci en faisant varier un certain nombre de paramètres physicochimiques susceptibles d'influencer l'efficacité de ce vecteur (taille, composition, structure ...)

Ainsi, différentes formulations ont été obtenues à partir de la construction d'origine, en faisant varier notamment :

- **la taille et la structure des constructions**, par formulation de gros liposomes unilamellaires (REV pour reverse-phase evaporation vesicles) ou multilamellaires (MLV pour multilamellar vesicles), susceptibles de modifier le temps de résidence du vaccin au niveau mucosal, mais également son interaction avec les cellules de la muqueuse respiratoire, dont les cellules immunitaires et leur environnement ;

- **la composition du vaccin** par : 1- diminution de la proportion des adjuvants lipopeptidiques, afin de limiter d'éventuels effets indésirables ; 2- couplage d'un peptide, le peptide CMT2, permettant le ciblage des cellules M spécialisées dans le transport des antigènes au niveau de certaines muqueuses ; 3- incorporation d'un lipide présentant des propriétés adhésives particulières pour les lipides et les protéines, afin de tenter de favoriser le contact du vaccin avec la muqueuse respiratoire. Des transfersomes, qui sont des liposomes incorporant un agent tensioactif, ont également été évalués, en raison de la flexibilité importante de leur bicouche ;

- **la viscosité des préparations vaccinales** par incorporation d'agents viscosifiants, susceptibles de modifier le temps de résidence du vaccin au niveau mucosal.

2. **Evaluer *in vivo* chez la souris l'activité immunostimulatrice et l'efficacité antitumorale des différents vaccins**, à savoir la construction d'origine et les formulations optimisées, après administration respiratoire. L'administration des vaccins a été faite par instillation intranasale, selon deux procédures : une procédure assurant une distribution du vaccin dans l'ensemble des voies respiratoires (nez + voies respiratoires inférieures), appelé « administration/vaccination respiratoire », et une procédure visant à n'atteindre que la cavité nasale, appelé « administration/vaccination nasale ». L'activité immunostimulatrice des constructions a été mesurée au niveau local et au niveau systémique. L'efficacité antitumorale des vaccins a été étudiée dans un modèle de tumeurs locales (i.e. pulmonaires) et/ou un modèle de tumeurs solides à distance (i.e. s.c.) suite à une vaccination prophylactique et/ou thérapeutique.

Ces évaluations se sont passées en deux temps :

- **dans un premier temps**, nous avons travaillé sur la construction d'origine, afin de faire la preuve de concept de l'efficacité de nos vaccins liposomiques dans le tractus respiratoire. Cette formulation a été alors évaluée par administration respiratoire, permettant une distribution du vaccin dans la cavité et les voies respiratoires inférieures.

- **dans un second temps**, nous avons comparé la formulation d'origine aux formulations optimisées, par administration nasale, afin de n'atteindre que la muqueuse nasale plus facile d'accès que les voies aériennes inférieures et équipée de tissus lymphoïdes contenant toutes les cellules nécessaires à l'obtention d'une réponse immunitaire.

Le plan de la partie « Résultats » du manuscrit suivra ce plan de mise en œuvre des évaluations *in vivo*, avec en début de chaque paragraphe, la description des constructions vaccinales réalisées et de leurs caractéristiques physicochimiques.

Matériels et méthodes

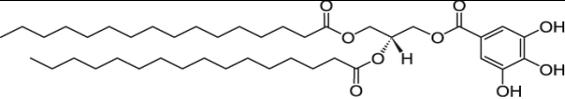
1. Formulation et caractérisation des vaccins peptidiques synthétiques

1.1. Réactifs

1.1.1. Lipides

Les liposomes sont constitués majoritairement de **phospholipides** : L- α -phosphatidylcholine (PC, type XVI-E, approx. 99%, (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA)), et de L- α -phosphatidyl-DL-glycérol (PG) transestérifié à partir de PC de jaune d'œuf (Avanti[®] Polar Lipids, Alabama, USA). Les transfersomes sont constitués de PC de soja (SPC, (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA)). Le 1,2-dipalmitoylgalloylglycérol (DPGG) a été utilisé dans la composition de certains liposomes dans le but de favoriser leur contact avec la muqueuse respiratoire (Tableau 4). Ces différents composés sont stockés à l'abri de la lumière, sous argon et à -20°C.

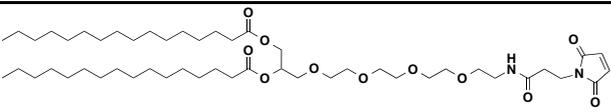
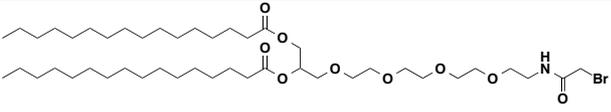
Tableau 4 : DPGG utilisé pour la préparation des vaccins synthétiques à base de liposomes.

Lipide	Structure chimique	Fournisseur
1,2-dipalmitoylgalloyl glycérol (DPGG)		Avanti [®] Polar Lipids (Alabama, USA)

Le **cholestérol** (Chol) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) assure la stabilité physique de la bicouche lipidique des liposomes (Kirby and Gregoriadis, 1980). Il a été recristallisé dans du méthanol.

Le greffage des peptides sur les liposomes se fait via deux **ancres lipidiques** sans activité immunomodulatrice : l'ancre dipalmitoyl-glycérol-maléimide (DPGMal) et l'ancre dipalmitoyl-glycérol-bromoacétamide (DPGBr), toutes les deux synthétisées au laboratoire (Heurtault et al., 2009; Roth et al., 2005; Thomann et al., 2011). Elles s'insèrent facilement au sein de la bicouche lipidique grâce à leurs deux chaînes carbonées hydrophobes de type palmitoyle. Ces lipides possèdent une fonction maléimide ou bromoacétamide réactive aux résidus thiol, dont celui de la cystéine présente dans la séquence de chaque peptide. Le tableau 5 représente les structures chimiques de ces deux ancres.

Tableau 5 : Structure générale des ancres lipidiques.

Ancre	Structure chimique	Masse molaire (g/mol)
Dipalmitoyl-glycérol-maléimide		895,65
Dipalmitoyl-glycérol-bromoacétamide		865,07

Le **lipopeptide** Pam₂CAG (Dipalmitoyl-Cystéyl-Alanyl-Glycine) a été utilisé pour augmenter l'immunogénicité des vaccins. Il s'agit d'un ligand des TLR 2/6. Il dérive du lipopeptide MALP-2 isolé à partir d'une lipoprotéine de mycoplasme. Cet adjuvant, synthétisé au laboratoire (Heurtault et al., 2009; Roth et al., 2005), est constitué de deux chaînes carbonées hydrophobes de type palmitoyle, reliées par des liaisons esters, lui permettant de s'insérer dans la bicouche lipidique des liposomes et des transfersomes (figure 42). Sa masse molaire est de 914 g/mol.

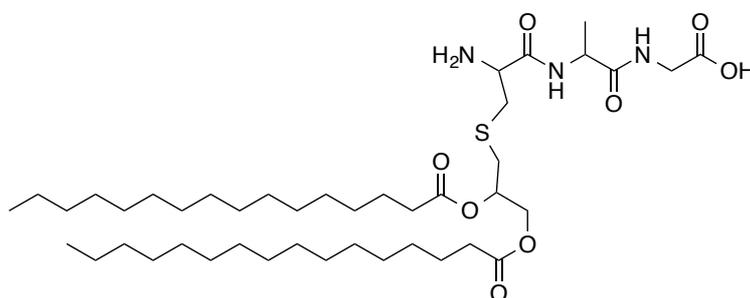


Figure 42 : Structure chimique de l'adjuvant Pam₂CAG utilisé dans les vaccins synthétiques à base de liposomes et de transfersomes.

Tous les composants lipidiques entrant dans la composition des liposomes ou des transfersomes ont été dissous dans une solution de chloroforme/méthanol (9/1 (V/V)), et conservés sous argon à -20°C.

1.1.2. Peptides

Epitope TCD8⁺ : peptide ErbB2

Le peptide de séquence ⁶³TYLPTNASL⁷¹, issu de la protéine ErbB2 humaine, a été utilisé comme épitope TCD8⁺ dans nos constructions. Ce peptide est reconnu par le complexe CMH-I H-2K^d des souris BALB/c (Nagata et al., 1997). Afin de coupler ce peptide sur les

liposomes, un groupement thiol a été rajouté lors de sa synthèse (ProteoGenix SAS, Schiltigheim, France), en position N-terminale, à l'aide d'une séquence CG conduisant au peptide : **CG**-TYLPTNASL. Sa masse molaire est de 11389 g/mol.

Épitope TCD4⁺ : peptide Ha

Le peptide de séquence ³⁰⁷PKYVKQNTLKLAT³¹⁹, dérivé de l'hémagglutinine du virus influenza, a été utilisé comme épitope TCD4⁺. Afin de coupler ce peptide sur les liposomes, un groupement thiol a été rajouté lors de sa synthèse (GeneCust, Dudelange, Luxembourg) par l'ajout d'une cystéine en position C-terminale conduisant à la séquence suivante : PKYVKQNTLKLAT-**C** de masse molaire 1606 g/mol.

Peptide de ciblage des cellules M : peptide CMT2

Le peptide de séquence **C**³⁰⁴NSSYSGNYYSIL³¹⁵ et de masse molaire 1471 g/mol a été utilisé dans nos constructions comme agent de ciblage des cellules M. Ce peptide correspond au 12-mer (p304-315) en C-terminal de l'entérotoxine de *Clostridium perfringens* (CPE), désigné peptide MT2, auquel a été rajouté une cystéine en position N-terminale, ce qui conduit au CMT2 (GeneCust, Dudelange, Luxembourg). La CPE est un ligand naturel de la claudine-4, une protéine exprimée par les cellules M et supposée agir, dans ces cellules, comme un récepteur d'endocytose favorisant la capture des antigènes particuliers. L'interaction de la CPE avec la claudine-4 se fait via sa partie C-terminale. Le peptide MT2 serait le plus petit peptide en C-terminal de la CPE capable de se lier à la claudine-4 (Ling et al., 2008). Le peptide CMT2 est hydrophobe et donc difficilement soluble en milieu aqueux. Pour améliorer sa solubilité, la « solution » aqueuse à 2,5 mg/mL de peptide CMT2 a été soumise aux ultrasons en mode pulsé (interruption de 2 secondes toutes les 3 secondes) pendant 2 minutes à l'aide d'une sonde à ultrasons (Vibra cell 75041, 750W, 20 kHz, Fisher Bioblock Scientific, France).

1.1.3. Agents gélifiants

L'hydroxypropylméthyl cellulose (HPMC, ≈ 26 kDa, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) et la carboxyméthyl cellulose sodique (CMC, 90 kDa, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) ont été utilisées en tant qu'agents gélifiants afin d'augmenter le temps de résidence du vaccin dans les voies respiratoires. Des solutions à 2% (P/V) de chacun des gélifiants ont été

préparées dans du tampon HEPES 10 mM - Sorbitol 5% (P/V) (pH 7,4) selon les instructions du fournisseur (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Pour cela, l'HMPC a été progressivement ajoutée à 1/3 du volume de tampon préalablement chauffé à 90°C, sous agitation (Agitateur S50, Ingenieurbüro CAT M. Zipper GmbH, Allemagne) à raison de 200-400 secousses par minute. Après homogénéisation, le reste du tampon a été ajouté à température ambiante. La CMC a été progressivement ajoutée au tampon sous agitation (Agitateur S50, Ingenieurbüro CAT M. Zipper GmbH, Allemagne) à température ambiante. Les deux préparations ont été conservées à 4°C pendant au moins 24 h avant utilisation.

1.1.4. Autres réactifs

Le deoxycholate de sodium (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) a été utilisé en tant qu'agent tensioactif dans la préparation des transfersomes. Il s'agit d'un surfactant anionique qui déstabilise la bicouche lipidique des transfersomes et augmente sa capacité de déformabilité en abaissant la tension interfaciale (Honeywell-Nguyen and Bouwstra, 2005; Prasanthi and Lakshmi, 2012).

Avant leur couplage aux liposomes, les peptides ont été mis en contact avec une solution de tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP, Interchim, Montluçon, France). Le TCEP est un **agent réducteur** des ponts disulfures, qui empêche la formation de dimère et/ou polymère peptidique. En fin de couplage, les fonctions maléimides de l'ancre DPGMal n'ayant pas réagi avec les peptides ont été réduites avec du β -mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Ces agents réducteurs ont été préparés dans le milieu tampon correspondant à celui des liposomes (ou transfersomes), c'est-à-dire soit du tampon HEPES 10 mM-sorbitol 5% (P/V) à pH 6,5, soit du tampon CHES 10 mM-sorbitol 5% (P/V) à pH 9,0.

Du glucose anhydre (EUROMEDEX, Souffelweyersheim, France) a été utilisé comme agent de protection lors de la congélation des liposomes et des transfersomes.

Les solvants utilisés (chloroforme, méthanol, éthanol, dioxane, diéthyl éther, DMSO) étaient de grade analytique.

1.2. Formulation des vaccins

Dans l'ensemble de ce travail, les formulations liposomiques seront décrites par la nomenclature suivante adaptée à chaque construction :

« Type de liposomes/PC/PG ou DPGG/Chol/Ancre/Peptide 1/Peptide 2/Peptide 3/Adjuvant »

Type de liposomes = SUV, REV, MLV ; en l'absence d'indication, il s'agira de SUV
PC, PG, Chol ou DPGG n'apparaissent que s'ils sont nécessaires à la compréhension

Ancre = DPGMal ou DPGBr

Peptides = Ha, ErbB2 +/- CMT2

Adjuvant = Pam₂CAG

Ainsi, la formulation SUV/DPGBr/CMT2/Ha/ErbB2/Pam₂CAG est un vaccin à base de liposomes SUV, construit avec l'ancre DPGBr et contenant les deux épitopes peptidiques en plus du peptide de ciblage CMT2.

D'autre part, les proportions de chacun des constituants du liposome sont toujours exprimées en ratio molaire par rapport aux phospholipides dont la somme représente 100%. PC/PG/Chol, 80/20/50 signifie qu'il y a 50 moles de cholestérol pour 100 moles de phospholipides (80+20).

1.2.1. Formulation des différents types de vecteurs

1.2.1.1. Formulation des gros liposomes multilamellaires (MLV) et des petits liposomes unilamellaires (SUV)

Ces liposomes sont constitués de PC, PG et de cholestérol (PC/PG/Chol) à un ratio molaire de 80/20/50 pour 15 mM de phospholipides totaux. Afin de greffer les peptides sur les liposomes, l'ancre DPGMal (pour le couplage des épitopes et du CMT2) ou DPGBr (pour le couplage du CMT2) est ajoutée à un ratio molaire de 2,5 ; 5 ou 7,5. En présence d'ancre, on applique une diminution équivalente de la quantité de PC afin de maintenir constante la charge globale des liposomes. A cette composition, l'adjuvant Pam₂CAG est parfois ajouté à un ratio molaire de 0,004 à 0,2 selon les études (la plupart ayant été réalisées à 0,2). Dans certaines préparations de SUV, le DPGG a été inclus à un ratio molaire de 5, 10 ou 20, afin de préparer des liposomes « adhésifs ». La proportion de DPGG a été déduite de la quantité de PG.

La technique de formulation utilisée correspond à la technique d'hydratation d'un film lipidique suivie ou non d'une sonication. Le mélange chloroforme/méthanol (9/1 V/V) dans lequel sont solubilisés les différents constituants (PC, PG ou DPGG, Chol, ancre, adjuvant) est évaporé sous vide (Rotavap Büchi, Suisse), dans un tube en verre, pendant 1 h. Le film lipidique obtenu est remis en suspension dans du tampon HEPES 10 mM-Sorbitol 5% (P/V), pH 6,5 en présence d'ancre lipidique fonctionnalisée par un groupement maléimide, ou dans du tampon CHES 10 mM, sorbitol 5% (pH 9,0) pour l'ancre fonctionnalisée par un bromoacétamide. La suspension obtenue est agitée vigoureusement à l'aide d'un Vortex ce qui conduit à la formation des gros liposomes multilamellaires (MLV). Afin d'obtenir de petits liposomes homogènes (SUV), cette suspension est soumise à une sonication pendant 50 minutes sous argon dans un bain d'eau sous agitation. La sonication est réalisée en mode pulsé à l'aide d'une sonde en titane de 3 mm (Vibra cell 75041, 750 W, 20 kHz, Fisher Bioblock Scientific, France) à raison de 2 secondes d'interruption toutes les 3 secondes (figure 43). Une centrifugation (MicroCentaur, MSE Laboratory Centrifuges, UK) de 10 minutes à 13 000 rpm permet ensuite d'éliminer les éventuelles particules de titane présentes.

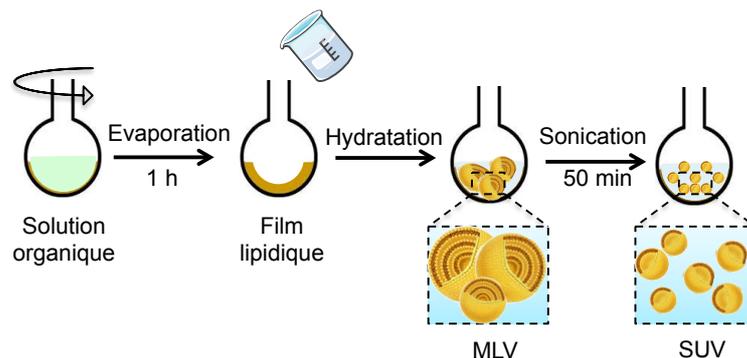


Figure 43 : Représentation schématique de la formulation des liposomes MLV et SUV.

1.2.1.2. Formulation des REV

Les REV (en anglais, Reverse-phase evaporation vesicles) sont des vésicules de grands diamètres essentiellement unilamellaires, de concentration et de composition identiques aux MLV et SUV. Elles sont obtenues par la reprise du film lipidique par du diéthyléther fraîchement saturé en eau mQ, suivie de l'addition d'1/3 du volume de tampon HEPES 10 mM-Sorbitol 5% (P/V) à pH 6,5. Le mélange ainsi obtenu est soumis aux ultrasons pendant 2 à 3 minutes dans le but d'obtenir une émulsion. Après évaporation sous pression réduite du diéthyléther, les REV se forment (figure 44). Le reste du tampon est ajouté et les liposomes sont placés sous vide (Rotavap Büchi, Suisse), afin d'éliminer les traces d'éther résiduel.

Enfin, une centrifugation (MicroCentaur, MSE Laboratory Centrifuges, UK) de deux minutes à 13 000 rpm est nécessaire pour éliminer d'éventuelles particules de titane.

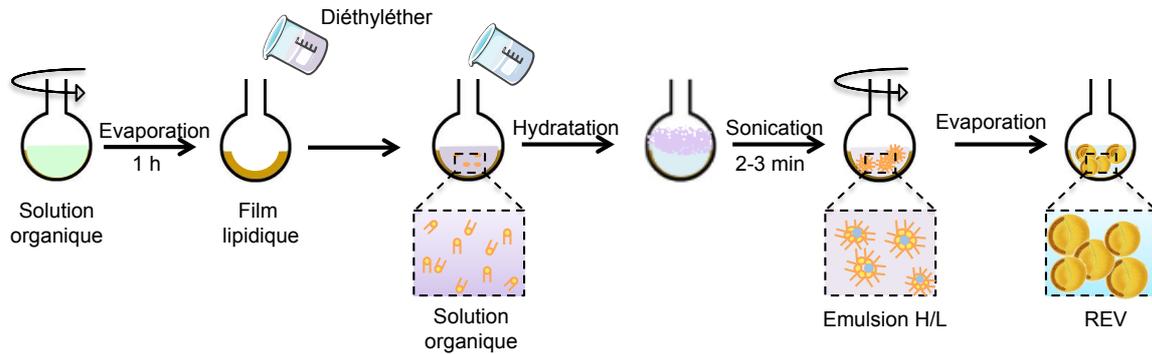


Figure 44 : Représentation schématique de la formulation des liposomes REV.

1.2.1.3. Préparation des liposomes ultra-déformables ou transfersomes

Les transfersomes sont préparés à 15 mM à partir de SPC et de déoxycholate de sodium à un ratio molaire de 68/27. A cette composition sont également ajoutés l'ancre DPGMal et l'adjuvant Pam₂CAG à un ratio molaire de 5 et 0,2, respectivement. Si l'ancre est présente dans la formulation, la proportion d'ancre ajoutée est déduite de la proportion de SPC.

La première étape de préparation des transfersomes est similaire à la première étape de formulation des liposomes SUV et MLV. La solution organique (chloroforme/méthanol 9/1 V/V) de SPC, DPGMal et Pam₂CAG est évaporée sous vide (rotavap Büchi, Suisse), dans un tube en verre, pendant 1 h. Le film lipidique obtenu est remis en suspension dans de l'éthanol (8,5% (V/V) du volume final souhaité) et agité vigoureusement (Vortex, Top Mix 11118, Fisher Bioblock Scientific, France) pendant 2 minutes. Le tampon HEPES 10 mM-Sorbitol 5% (P/V) contenant le déoxycholate de sodium à 2,7 mM est alors ajouté à la suspension, puis le mélange est agité vigoureusement pendant 2 minutes. Cette première étape permet d'obtenir des transfersomes MLV. Ceux-ci subissent ensuite une extrusion manuelle (extrudeur LiposoFast-Basic, Avestin, Canada) consistant à faire passer la suspension de MLV à travers une membrane poreuse de 100 nm, afin de réduire leur diamètre et d'obtenir des SUV (figure 45). Vingt passages ont été nécessaires afin d'obtenir des transfersomes SUV de diamètre homogène.



Figure 45: Extrudeuse LiposoFast-Basic[®], Avestin.

1.2.2. Couplage des peptides aux liposomes

1.2.2.1. Couplage des peptides d'intérêt ErbB2 et Ha sur les différents liposomes

Le couplage des peptides s'effectue sur les liposomes préformés dans la bicouche phospholipidique desquels une ancre fonctionnalisée a été incorporée lors de la première étape de formulation. On peut noter qu'on suppose que l'ancre se répartit statistiquement dans la bicouche, c'est-à-dire que la moitié des fonctions réactives sont orientées vers le cœur hydrophile des liposomes, tandis que l'autre moitié est disponible à la surface de ces mêmes liposomes. Ainsi, à l'équivalence, la quantité de peptide mise en contact avec les liposomes correspond à 0,5 équivalent pour 1 équivalent d'ancre (DPGMal ou DPGBr) totale.

Lors de l'utilisation de l'ancre DPGMal, la fonction maléimide de cette ancre permet le couplage par addition de Michaël d'un peptide possédant un thiol à pH 6,5 dans un tampon HEPES 10 mM-sorbitol 5% (P/V) (figure 46).

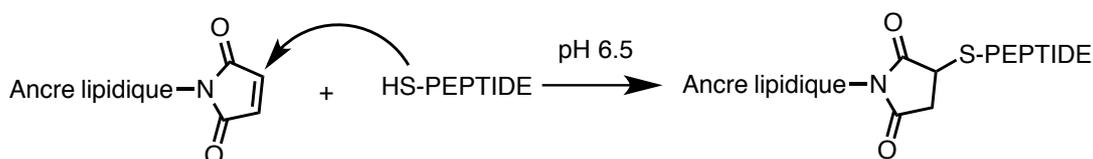


Figure 46 : Conjugaison des peptides à l'ancre DPGMal par addition de Michaël.

Pour l'ancre DPGBr, la fonction bromoacétamide permet le couplage, par substitution nucléophile, d'un peptide possédant un thiol à pH 9,0 dans un tampon CHES 10 mM-sorbitol 5% (P/V) (figure 47).

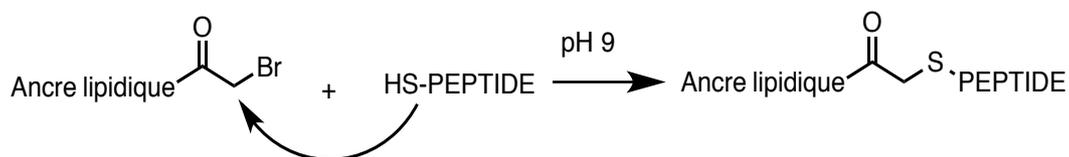


Figure 47 : Conjugaison des peptides à l'ancre DPGBr par substitution nucléophile.

Dans un premier temps, les quantités nécessaires d'épitopes ErbB2 et Ha (modifiés afin de présenter une cystéine dans leur séquence) sont solubilisées dans de l'eau mQ et mises en contact avec du TCEP à raison de 0,7 équivalent pour 1 équivalent molaire de peptide,

pendant 15 minutes à température ambiante. Dans un second temps, les deux peptides (en présence du TCEP) sont mis en contact simultanément avec les liposomes ou les transfersomes à pH 6,5 sous argon, durant au moins 3 h à température ambiante. Après le couplage, les fonctions maléimides de l'ancre DPGMal n'ayant pas réagi sont réduites par du β -mercaptoéthanol (10 équivalents de β -mercaptoéthanol pour 1 équivalent de DPGMal) pendant 30 minutes sous argon à température ambiante. Enfin, les échantillons sont dialysés contre du tampon HEPES 10 mM-Sorbitol 5% (P/V), pour éliminer le β -mercaptoéthanol, le TCEP et l'excès éventuel de peptides n'ayant pas réagi avec l'ancre. Pour cela, l'échantillon à dialyser est placé dans un FastDialyzer[®] et recouvert d'une membrane de dialyse (Spectra/Por, limite d'exclusion 12-14 KDa, Spectrum laboratories, USA). La dialyse est faite à 4°C et pH 7,4 pendant 36 h, avec un volume de tampon équivalent à 1000 fois le volume d'échantillon à dialyser et 2 renouvellements de bain.

Les différentes étapes du couplage sont représentées par la figure 48.

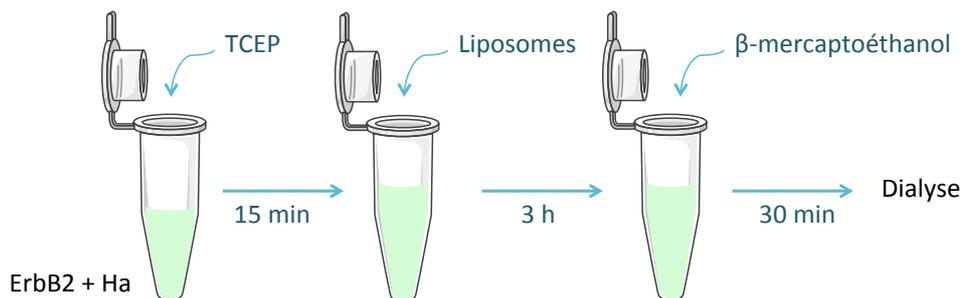


Figure 48 : Schéma récapitulatif du couplage d'ErbB2 et Ha aux liposomes.

Cette méthode de couplage des épitopes peptidiques a été appliquée aux SUV (y compris aux SUV contenant du DPGG) comme décrit ci-dessus, mais également aux REV, aux MLV et aux transfersomes.

1.2.2.2. Couplage du peptide CMT2 sur les SUV

Un couplage du peptide CMT2 sur les vaccins liposomiques a été réalisé, afin de cibler les cellules M nasales dans le but d'augmenter l'efficacité vaccinale. Pour mettre au point ce couplage, **différentes formulations de liposomes SUV ont été préparées.**

- liposomes vectorisant uniquement le CMT2 après couplage avec l'ancre DPGMal. Ces formulations avaient pour but de déterminer les conditions optimales de couplage du peptide aux vecteurs (proportion et temps de couplage).

- vaccin complet vectorisant les peptides ErbB2 et Ha, l'adjuvant, et le peptide CMT2, obtenu par couplage avec l'ancre DPGMal. Ces formulations avaient pour but de déterminer les conditions de couplage des trois peptides (couplage simultané ou successif).

- vaccin complet vectorisant les peptides ErbB2 et Ha, l'adjuvant, et le peptide CMT2, obtenu par couplage avec l'ancre DPGBr. CMT2 présentant une meilleure solubilité apparente à pH basique, ces formulations avaient pour but de déterminer si un meilleur couplage du CMT2 pouvait être obtenu avec l'ancre DPGBr qui, selon les travaux antérieurs du laboratoire, permet un couplage peptidique optimal à pH 9,0 dans un tampon CHES 10 mM-Sorbitol 5% (P/V).

Détermination des conditions optimales de couplage du CMT2 : différentes conditions de couplage du peptide sur les liposomes SUV préformés ont été évaluées. Dans un premier protocole, le peptide a été mis en contact avec les liposomes, en proportions croissantes (1,25 et 3,75 % par rapport à la quantité de phospholipides), pendant un temps fixe de 4 h. Dans un deuxième protocole, le peptide CMT2 a été mis en contact avec les liposomes à une proportion fixe de 2,5 % pendant des durées croissantes (2 à 24 h).

Détermination des conditions de couplage des trois peptides (couplage simultané ou successif) ; deux stratégies de couplage ont été évaluées :

- mise en contact des 3 peptides simultanément avec les liposomes fonctionnalisés pendant 4 h selon la figure 49.

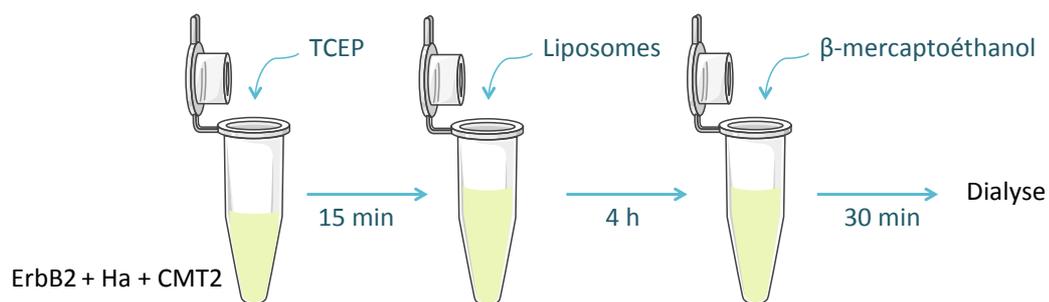


Figure 49 : Schéma récapitulatif du couplage simultané des peptides CMT2, ErbB2 et Ha.

- mise en contact du CMT2 avec les liposomes fonctionnalisés pendant la 1^{ère} heure, suivi de l'ajout des peptides Ha et ErbB2 pendant 3 h, afin de potentiellement favoriser la fixation du CMT2 (figure 50).

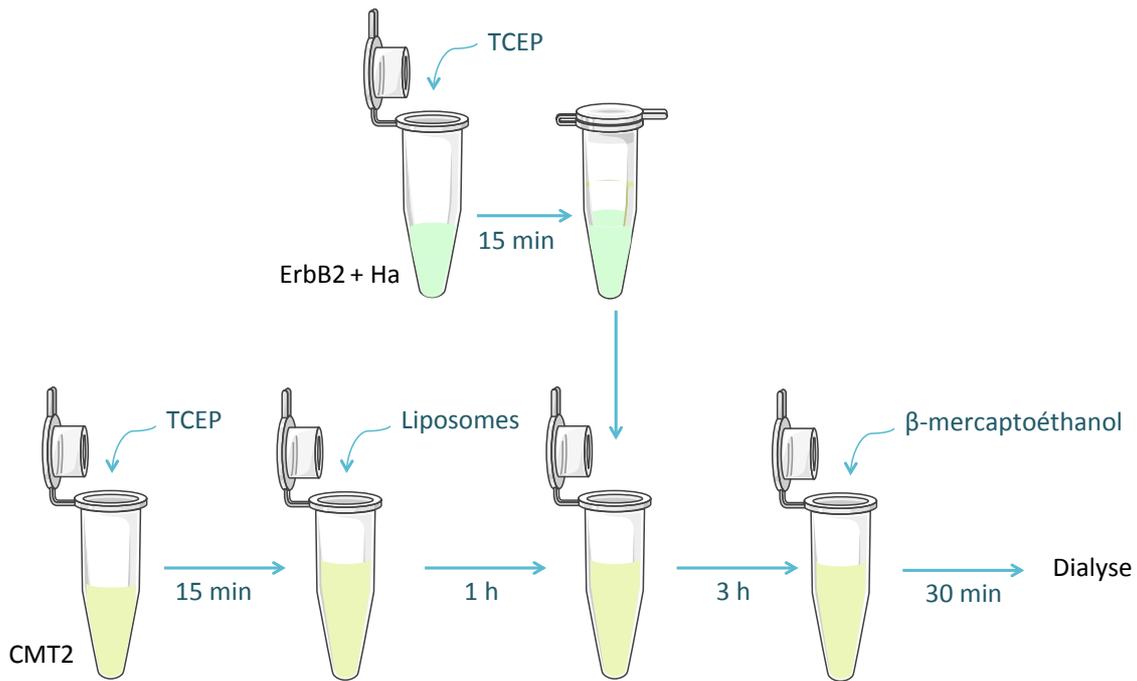


Figure 50 : Schéma récapitulatif du couplage successif du CMT2 puis des épitopes ErbB2 et Ha.

Couplage du CMT2 en conditions basiques : des liposomes préformés PC/PG/Chol/DPGBr/Pam₂CAG de ratio molaire 72,5/20/50/7,5/0,2 ont été préparés dans du tampon CHES 10 mM-Sorbitol 5% (P/V) à pH 9,0. Ensuite, les peptides ont été couplés aux liposomes selon la stratégie de couplage successif, c'est-à-dire la mise en contact du CMT2 avec les liposomes SUV pendant la 1^{ère} heure, suivie de l'ajout des peptides Ha et ErbB2 pendant 3 h.

Dans tous les protocoles de couplage du CMT2, les autres étapes et conditions de couplage, c'est-à-dire le contact avec le TCEP, la température, la réduction des fonctions maléimides de l'ancre DPGBr n'ayant pas réagi et la dialyse ont été identiques à celles décrites précédemment.

1.2.3. Concentration des préparations vaccinales

Certaines études nous ont amenés à concentrer 5 fois les préparations vaccinales, afin de pouvoir administrer aux animaux des volumes de vaccin plus faibles tout en maintenant la dose de ces vaccins. Ceci a été le cas lorsque nous souhaitions cibler uniquement la cavité nasale. Pour cela, des unités de concentrations (Vivaspin, 10 000 kDa ; Sartorius Stedim Biotech, Allemagne) ont été utilisées. Les préparations vaccinales, dans le tampon HEPES 10 mM-Sorbitol 5% (P/V) à pH 7,4 ont été déposées dans la partie supérieure des unités, qui ont

ensuite été centrifugées à 5 000 g à 4°C (centrifuge 4K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Allemagne) sous argon jusqu'à l'obtention d'1/5 du volume initialement déposé. Il est à noter que plus les liposomes présentent de gros diamètres plus le temps nécessaire à la concentration par centrifugation est important.

1.2.4. Préparation de gels de liposomes SUV

Afin d'augmenter le temps de résidence des formulations vaccinales au niveau nasal, la viscosité des préparations vaccinales a été augmentée par l'ajout d'HPMC ou de CMC conduisant à la formulation de gels vaccinaux. Pour préparer des gels vaccinaux à 0,5, 1 ou 2% (P/V), différents volumes d'une solution à 2% d'HPMC ou de CMC dans un tampon HEPES 10 mM-sorbitol 5% (P/V) à pH 7,4 ont été ajoutés aux liposomes. Ces derniers ont ensuite été concentrés 5 fois par centrifugation selon la méthode décrite ci-dessus.

1.2.5. Conservation des vaccins

Les préparations vaccinales sont ensuite congelées après addition de 4% (P/V) de glucose utilisé comme cryoprotecteur, puis conservées à -80°C. Les transfersomes ont été congelés de la même manière en présence de 10% de glucose (P/V). Dans ces conditions, après une seule décongélation, ni la taille ni le couplage peptidique ne sont affectés (données non présentées). Suite à la décongélation, les diamètres moyens des formulations sont systématiquement mesurés, avant leur administration aux souris.

1.3. Caractérisation physicochimique

1.3.1. Dosage du phosphate inorganique

Pour déterminer la concentration exacte de chaque solution stock de phospholipides (chloroforme/méthanol), avant l'étape de formulation des liposomes, nous avons eu recours au dosage du phosphate inorganique selon Rouser et collaborateurs (Rouser et al., 1970). Différents volumes des solutions à doser, ainsi qu'une gamme étalon de KH_2PO_4 à 1 mM sont évaporés à sec. Puis, les différentes préparations sont hydrolysées sous l'action de 300 μL d'acide perchlorique (Acros Organics, Geel, Belgique) à 200°C pendant 20 minutes. Les orthophosphates solubles libérés sont ensuite mis en contact avec 500 μL de molybdate d'ammonium (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) à 1,25% (P/V) pour former de l'acide

phosphomolybdique. Ce dernier est alors réduit à 100°C pendant 5 minutes par 500 µL d'une solution d'acide ascorbique (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) à 5% (P/V) pour former un complexe bleu dont l'absorbance à 820 nm (SAFAS, Xenius, Monaco) est proportionnelle à la concentration d'orthophosphates.

1.3.2. Mesure du diamètre moyen par diffusion dynamique de la lumière

La mesure de la distribution de taille des formulations de liposomes et de transfersomes a été réalisée par diffusion quasi-élastique de la lumière en utilisant un nano ZS (Zetasizer nano ZS, Malvern) à 25°C. Cette méthode, aussi appelée spectroscopie de corrélation photonique ou diffusion quasi-élastique de la lumière, mesure le mouvement Brownien des particules (mouvement aléatoire lié à leur petite taille et leur faible densité) qu'elle relie à leur taille. Les particules en suspension sont placées dans une cellule de mesure traversée par un faisceau laser He-Ne à 633 nm. L'intensité de la lumière diffractée mesurée est liée aux fluctuations dues aux mouvements browniens des particules. Cette intensité est corrélée à la vitesse de déplacement des particules, elle-même dépendante de leur taille. Cette technique mesure donc le coefficient de diffusion des particules et calcule une distribution de la taille au moyen de la relation de corrélation de Stokes-Einstein. Pour réaliser la mesure, l'échantillon est dilué au 100^{ème} (ou au 500^{ème} pour les échantillons concentrés) dans du tampon HEPES 10 mM-Sorbitol 5% (P/V) à pH 7,4. Trois mesures sont réalisées par échantillon. La viscosité des tampons utilisés est de 1,014 cP. L'indice de réfraction du milieu est de 1,34 cP. L'angle de mesure est de 173°. La distribution de la taille des échantillons est appréciée par le diamètre moyen en intensité des liposomes et par l'indice de polydispersité (PDI) qui est inférieur à 0,3 en présence d'une population monodisperse.

1.3.3. Dosage de la phosphatidylcholine

Il s'agit d'un dosage enzymatique de la choline à l'aide d'un Kit commercial (LabAssayTM Phospholipid Wako, Japon) qui permet de déduire la concentration en PC. Il est basé sur l'hydrolyse de la PC par la phospholipidase C permettant de libérer la choline, qui est ensuite oxydée par la choline oxydase présente dans le kit. Cette réaction enzymatique forme du peroxyde d'hydrogène. Ce dernier va être utilisé par une peroxydase pour transformer un substrat en un produit coloré qui sera quantifié par une mesure d'absorbance à 590 nm (SAFAS, Xenius, Monaco). En pratique, une solution de choline standard de

concentration connue est utilisée pour établir une gamme étalon dans les puits d'une plaque de microtitration. En parallèle, les échantillons de liposomes à doser sont déposés en triplicat. 200 μL de réactif enzymatique sont ajoutés à l'ensemble des puits. La microplaque est incubée à 37°C pendant 10 minutes (Incubateur Stat Fax 220, Awareness technology inc), puis une lecture de l'absorbance à 590 nm est réalisée (SAFAS, Xenius, Monaco).

1.3.4. Dosage des peptides

Les peptides couplés à la surface des liposomes sont quantifiés par un dosage à la fluorescamine, selon la méthode de Böhlen et al. (Bohlen et al., 1973). La fluorescamine réagit avec les amines primaires conduisant à la formation d'un fluorophore. Plus il y aura d'amines primaires initialement disponibles sur les peptides, plus la fluorescence sera importante. Une hydrolyse acide à chaud des peptides permet la libération des acides aminés et la réduction de R-NH en R-NH₂.

Pratiquement, les échantillons de vaccins conjuguant les peptides sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique à 37% (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) à 110°C pendant 12 h (Reacti-therm III, Heating Module, Pierce). Après l'hydrolyse, ils sont centrifugés (Speed Vac Plus modèle SC110AR, Savant Instruments INC, Holbrook, USA) et neutralisés par ajout de NaOH 6 N. Pour le dosage, 40 μL d'échantillon hydrolysé, 1,5 mL de tampon borate 50 mM à pH 9,0 (préparé à partir d'acide borique (Merck, Darmstadt, Allemagne) et de borax (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA)) et 500 μL d'une solution de fluorescamine (1,1 mM dans du dioxane, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) sont additionnés dans une cuve en quartz de façon extemporanée. Après une homogénéisation rapide, la fluorescence du mélange réactionnel est mesurée à $\lambda_{\text{excitation}} = 400 \text{ nm}$ ($d = 6 \text{ nm}$) et $\lambda_{\text{émission}} = 480 \text{ nm}$ ($d = 10 \text{ nm}$) avec une tension P_m de 450 eV (SAFAS, Xenius, Monaco). Une gamme étalon est obtenue dans les mêmes conditions à partir des peptides seuls hydrolysés, ou de mélanges physiques peptides + liposomes (ou transfersomes) également hydrolysés. L'hydrolyse d'une préparation de liposomes/transfersomes sans peptide est aussi réalisée, afin de déduire la contribution des phospholipides à la fluorescence totale. De même, des témoins sont réalisés avec 50 μL d'eau mQ.

2. Evaluation biologique des vaccins

2.1. Evaluation de l'activité de ciblage du peptide CMT2 *in vitro*

En culture, la mise en place de jonctions serrées au sein d'une monocouche cellulaire s'accompagne d'une augmentation de résistance électrique transépithéliale (TEER). Une baisse de cette TEER peut être liée à une ouverture de ces jonctions serrées, notamment suite à l'interaction des protéines des complexes jonctionnels avec d'autres protéines n'en faisant pas partie. Le peptide MT2 est capable de se lier à la claudine-4, qui participe à la formation des jonctions serrées intercellulaires. Ainsi, la mesure de la TEER de monocouches épithéliales en culture a été utilisée pour étudier l'activité de ciblage du peptide CMT2.

2.1.1. Lignées cellulaires

2.1.1.1. Calu-3

Les cellules épithéliales Calu-3 (HTB-55TM, American Type Culture Collection) dérivées d'une effusion pleurale d'un adénocarcinome pulmonaire humain ont été retenues pour ce travail, en raison de leur capacité à former des jonctions serrées impliquant la claudine-4 (Go et al., 2006). Cette lignée cellulaire a été cultivée à 37°C en présence de 5% de CO₂, dans des flacons de culture contenant du milieu DMEM/F-12 supplémenté avec 10% (V/V) de sérum de veau fœtal, 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 5 mM d'HEPES (Invitrogen, Gibco, USA). À confluence, les cellules ont été détachées de leur support par un traitement avec de la trypsine (Invitrogen, Gibco, USA), puis remises en culture dans des flacons en vue de leur multiplication, ou dans des inserts en vue d'expériences.

2.1.1.2. Caco-2

La lignée Caco-2 (HTB-37TM, American Type Culture Collection) est une lignée épithéliale dérivée d'un adénocarcinome colique humain. Comme les Calu-3, ces cellules expriment la claudine-4. Cette lignée cellulaire a été cultivée à 37°C en présence de 5% de CO₂ dans du milieu DMEM supplémenté en GlutaMAX (2 mM), sérum de veau fœtal décomplémenté (20% V/V), glucose (4,5 g/L), antibiotiques (100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine), antifongique (25 µg/mL d'amphotéricine) et acides aminés

essentiels (0,1 mM) (Invitrogen, Gibco, USA). À confluence, les cellules ont été détachées de leur support par un traitement à la trypsine (Invitrogen, Gibco, USA), puis remises en culture dans des flacons en vue de leur multiplication, ou dans des inserts en vue d'expériences.

2.1.2. Evaluation de la capacité du peptide CMT2 à altérer la TEER de monocouches cellulaires

Pour ces expériences, des cellules Calu-3 ou Caco-2 ont étéensemencées sur des inserts ($2,4 \times 10^5$ cellules/insert de plaques 24 puits, BD FalconTM, USA), afin d'obtenir une monocouche cellulaire à l'interface d'un compartiment apical et d'un compartiment basolatéral. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant le temps nécessaire à l'obtention d'une TEER maximale, soit environ 20 jours. Le jour de l'expérience, le peptide CMT2, sous forme libre ou couplé à des liposomes SUV, a été mis en contact avec des monocouches de cellules Calu-3 ou Caco-2, à raison de 10 et 100 $\mu\text{g/mL}$ de CMT2. Les échantillons ont été déposés du côté apical des cultures. Des liposomes ne contenant pas le peptide ont été également utilisés comme contrôle. La mesure de la TEER a été effectuée grâce à un ohmmètre (EVOM, World Precision Instruments, USA) avant ($t = 0$ h) et après différents temps de contact des échantillons ($t = 4$ h et/ou 24 h) (figure 51). Les valeurs de TEER mesurées après contact ont été exprimées en pourcentage par rapport à la valeur de TEER initiale ($t = 0$ h).

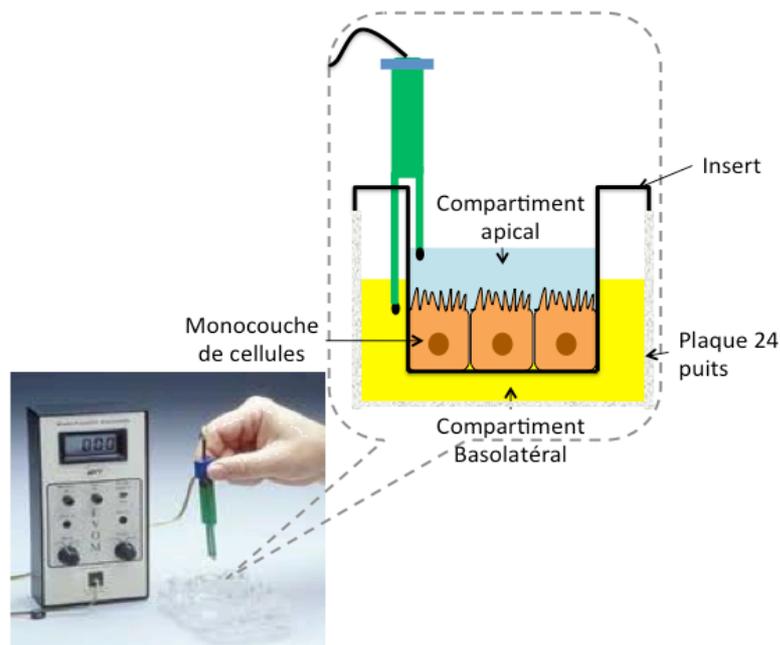


Figure 51 : Mesure de la TEER. L'électrode mesure une différence de potentiel entre le compartiment apical et le compartiment basolatéral. Cette différence de potentiel permet de déduire la TEER par application de la loi d'Ohm.

2.2. Evaluation de l'activité immunostimulatrice et de l'efficacité antitumorale des vaccins *in vivo* chez la souris

2.2.1. Animaux

Des souris femelles de souche BALB/cJRj, âgées de 6-8 semaines au moment du début de l'expérimentation, ont été utilisées dans ce travail. Les animaux, fournis par la société Janvier (France), ont été hébergés dans des cages ventilées (M.I.C.E.[®] cages, Animal Care Systems) par groupe de 3 à 5, dans des conditions de température ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) et d'humidité ($50 \pm 10\%$) contrôlées avec un cycle lumière/obscurité de 12 h/12 h. Les animaux avaient un accès à l'eau et à la nourriture (Aliment 4RF21, Mucedola, France) *ad libitum*. Une période d'acclimatation aux structures sanitaires de 1-2 semaines minimum a été respectée avant le début de chaque expérimentation. Pendant la durée des expériences, un suivi régulier de l'état physique général et du poids des animaux a été réalisé, afin de mettre en évidence toute variation anormale traduisant une souffrance. L'ensemble des expérimentations a été effectué dans l'animalerie de la faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg (N° d'agrément : 67-218.26) en accord avec les réglementations relatives à l'expérimentation animale en France.

2.2.2. Modes d'administration des vaccins

Les vaccins ont été administrés aux souris par instillation nasale ou injection s.c.

L'instillation nasale nécessite d'anesthésier l'animal par injection intra-péritonéale d'un mélange de kétamine (50 mg/kg, Imalgen[®], Merial, Lyon, France) et de xylazine (3,33 mg/kg, Rompun[®], Bayer, Puteaux, France), puis à déposer goutte à goutte une solution de vaccin à l'entrée des narines de l'animal à l'aide d'une micropipette. Dans notre travail, cette instillation a été réalisée selon deux procédures : une procédure assurant une distribution de la solution dans l'ensemble des voies respiratoires (nez + voies respiratoires inférieures), appelée dans ce travail administration respiratoire, et une procédure visant à n'atteindre que la cavité nasale, appelée dans ce travail administration nasale.

Dans le cas d'une administration respiratoire, les animaux anesthésiés ont reçu une instillation de vaccin, ou de son contrôle, d'un volume de 25 μL , à raison de 12,5 μL par narine. Ils ont été maintenus en position verticale pendant l'instillation et dans une position inclinée à 60° par rapport à la verticale jusqu'à leur réveil, afin de promouvoir la distribution

du vaccin dans les poumons via la respiration (figure 52). Cette procédure d'administration est utilisée depuis de nombreuses années au laboratoire. Des travaux de l'équipe ont montré qu'elle permet une distribution de nanoparticules en suspension jusque dans les alvéoles.



Figure 52 : Administration respiratoire des vaccins

Dans le cas d'une administration nasale, les animaux anesthésiés ont reçu une instillation de vaccin, ou de son contrôle, d'un volume de 5 μL , à raison de 2,5 μL par narine. Ils ont été maintenus en décubitus dorsal pendant l'instillation et jusqu'à leur réveil, afin d'assurer la rétention du vaccin dans la cavité nasale (figure 53). Cette procédure d'administration n'avait jamais été utilisée au laboratoire. Elle a donc fait l'objet d'une mise au point, qui a notamment porté sur le volume de solution à administrer pour n'atteindre que le nez. Cette mise au point nous a permis de déterminer, en accord avec d'autres travaux publiés dans la littérature (Southam et al., 2002), qu'un volume de 5 μL était optimal.



Figure 53 : Administration nasale des vaccins.

Dans le cas d'une administration s.c., 200 μL de vaccin ont été injectés dans le flanc gauche des souris.

2.2.3. Evaluation de l'activité immunostimulatrice des vaccins

L'activité immunostimulatrice des vaccins, après immunisation respiratoire ou nasale, a été étudiée au niveau local et au niveau systémique. La réponse immune locale a été mesurée en déterminant le nombre total et le nombre différentiel de cellules immunitaires et/ou en quantifiant les cytokines et chimiokines présentes dans les liquides de lavages

bronchoalvéolaires (LBA) ou de lavages nasaux (LN) des animaux. La réponse immune systémique a été évaluée en quantifiant l'IFN- γ produit par les splénocytes des animaux vaccinés, après culture de ces cellules *ex vivo* et stimulation par les peptides ErbB2 et Ha.

2.2.3.1. Protocoles d'immunisation et de recueil des échantillons

Afin d'étudier la réponse immune locale induite par les vaccins, les souris ont reçu une administration respiratoire ou nasale de vaccin, et ont été euthanasiées soit 24 h plus tard (étude à temps fixe), soit 2, 6, 8, 18, 24 et 48 h après la vaccination (cinétique). Afin d'évaluer la réponse immune systémique, des souris ont reçu 2 administrations de vaccin au jour 0 et au jour 14 (cas de la vaccination nasale), ou 3 administrations de vaccin au jour 0, au jour 14 et au jour 28 (cas de la vaccination respiratoire). Dans les deux protocoles, les animaux ont été euthanasiés 7 jours après la dernière administration, afin de prélever leur rate.

2.2.3.2. Mesure de la réponse immune locale

a. Réalisation des lavages bronchoalvéolaires

Les souris sont euthanasiées par injection intrapéritonéale d'une surdose d'anesthésique. Une canule est insérée dans la trachée de l'animal après trachéotomie. Les voies aériennes inférieures sont lavées avec du sérum physiologique contenant 2,6 mM d'EDTA-0,9% NaCl (P/V), à raison de 6 instillations de 0,5 mL. Le premier millilitre de ces lavages sert au dosage des cytokines et chimiokines. Il est centrifugé à 200 g pendant 5 minutes à 4°C, et le surnageant obtenu est congelé et stocké à -20°C jusqu'au dosage des médiateurs. Les culots cellulaires de l'ensemble des lavages sont recueillis par centrifugation (200 g, 5 min, 4°C) et utilisés pour déterminer le nombre total et différentiel de cellules infiltrées dans les voies aériennes.

b. Réalisation des lavages nasaux

Les souris sont euthanasiées par injection intrapéritonéale d'une surdose d'anesthésique. La tête de l'animal est sectionnée au niveau du cou, et la mâchoire supérieure est isolée du reste de la tête par dissection. Une canule est insérée dans la choane à travers l'ouverture pharyngée. La cavité nasale est rincée avec 0,5 mL de sérum physiologique contenant 2,6 mM d'EDTA-0,9% NaCl (P/V). Le liquide de lavage recueilli, qui servira au

dosage des cytokines et chimiokines, est centrifugé à 200 g pendant 5 min à 4°C, et congelé et stocké à -20°C.

- c. Détermination du nombre total et différentiel de cellules dans les liquides de lavage

Après lyse des globules par choc hypotonique, les culots cellulaires issus des liquides de lavages sont remis en suspension dans 500 µL de sérum physiologique contenant 2,6 mM d'EDTA. Le nombre total de cellules est déterminé par comptage à l'aide d'un hémocytomètre (chambre de Neubauer). La suspension cellulaire est ensuite diluée pour obtenir une concentration d'environ 250 000 cellules par mL, puis 200 µL de cette suspension diluée sont cytocentrifugés (Cytospin[®] 4 Shandon, Thermo-Scientific). Les préparations cytologiques ainsi obtenues sont ensuite colorées à l'hématoxyline/éosine (Microscopy Hemacolor[®], Merck, Darmstadt, Allemagne). Le comptage différentiel des cellules est effectué sur ces préparations cytologiques en dénombrant au moins 400 cellules par préparation. Les cellules sont différenciées en macrophages, neutrophiles, éosinophiles et lymphocytes et sont exprimées en nombre absolu à partir du nombre total de cellules.

- d. Dosage des cytokines et chimiokines dans les liquides de lavage

Les cytokines et chimiokines IL-6, TNF- α et KC (en anglais, Keratinocyte chemoattractant) ont été quantifiées dans les LBA et/ou les LN par ELISA (en anglais, Enzyme-linked immunoSorbent assay) à l'aide de kits commerciaux conformément aux instructions des fabricants (eBiosciences pour l'IL-6 (référence : 88-7064-88) ; BD Biosciences pour le TNF- α (référence : 555268) ; R&D Systems pour KC (référence DY453)).

2.2.3.3. Mesure de la réponse immunitaire systémique

- a. Isolement des splénocytes

Les rates ont été recueillies dans du milieu de culture complet (RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutabio, 2 g/L de NaHCO₃, 10% de SVF décomplémenté (V/V), de la pénicilline à 100 UI/ ml, 100 pg/mL de streptomycine (Eurobio, Courtaboeuf, France)) à 4° C. Ensuite, chaque rate a été broyée sur un tamis cellulaire de nylon de mailles de 70 µm de diamètre (BD FalconTM, France) pour obtenir une suspension homogène de splénocytes.

Cette suspension de cellules a été centrifugée à 12 000 rpm (Centrifuge 3-1, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Allemagne) pendant 10 min. Le culot cellulaire a été remis en suspension dans du tampon ACK (0,15 M de NH_4Cl , 1 M K_2CO_3 et 0,1 M EDTA, pH 7,4 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA)) à température ambiante pendant 1 min pour lyser les érythrocytes. Pour inhiber l'activité de l'ACK du milieu de culture complet a été ajouté. La suspension cellulaire a été centrifugée de nouveau et le culot cellulaire a été remis en suspension dans du milieu de culture complet. Les cellules viables ont été comptées dans une chambre de Neubauer en présence de bleu trypan. Enfin, les splénocytes des souris ayant subi le même traitement ont été regroupés à nombre de cellule égal.

b. ELISpot IFN- γ

La production d'IFN- γ par les splénocytes a été évaluée par la technique ELISpot (en anglais, Enzyme-linked ImmunoSpot), qui permet de déterminer plus précisément le nombre de clones de splénocytes produisant de l'IFN- γ . Pour ce faire, des plaques de filtration en fluorure de polyvinylidène (MultiscreenHTS, Merck Millipore, USA) au format 96 puits ont été activées avec 20 μL /puits d'éthanol 35% (V/V) pendant 1 minute. Après trois rinçages avec du PBS stérile, les plaques ont été recouvertes d'un anticorps purifié de capture anti-IFN- γ de souris (clone AN-18, 1,5 μg /puits, BD PharmingenTM, San Diego, USA) dans du PBS pendant une nuit à 4° C. Après deux lavages avec de l'eau stérile, les plaques ont été bloquées avec du milieu de culture complet pendant au moins 2 h à 37° C. Après trois lavages avec du milieu de culture sans SVF, les splénocytes dans du milieu RPMI supplémenté avec du Glutabio (2 mM), du NaHCO_3 (2 g/L), de la pénicilline (100 UI/ml), de la streptomycine (100 pg/mL) (Eurobio, Courtaboeuf, France) et du sérum normal de souris (2% (V/V), Dutscher, Brumath, France) ont été ajoutés à raison de 4×10^5 cellules/puits en présence de 2 μg de peptide (Ha ou ErbB2). Un témoin négatif ne contenant que des cellules sans stimuli et un témoin positif contenant des cellules en présence de 0,25 μg de Concanavalline-A (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA), ont été testés dans les mêmes conditions. De l'IL-2 humaine recombinante (6 UI/puits) a été ajoutée pour favoriser la prolifération, la différenciation et la survie des cellules T activées par les antigènes. Après 18 h à 37° C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO_2 , les cellules ont été éliminées par six lavages avec du Tween[®] 20/PBS (0,01% V/V). Ensuite, un anticorps anti-IFN- γ biotinylé (clone R4-6A2, 0,1 μg /puits dans du PBS contenant 0,9% (P/V) d'albumine de sérum bovin ; PharmingenTM BD, San Diego, USA) a été ajouté. Après 2 h à 37° C, les

puits ont été rincés avec du PBS/Tween[®] 20. Ensuite, de l'extravidine conjuguée à la phosphatase alcaline (0,07 µg/puits ; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) a été ajoutée et incubée pendant 45 min à 37° C. Après trois lavages avec du PBS/Tween[®] 20 et trois lavages avec du PBS seul, les clones produisant de l'IFN-γ ont été révélés par l'ajout du substrat NBT/BCIP (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) et une incubation de 15 min à l'obscurité. La révélation a été stoppée par un lavage abondant à l'eau. Les plaques, séchées pendant une nuit à l'obscurité, ont été analysées à l'aide d'un analyseur automatique ImmunoSpot CTL (CTL-Europe, Allemagne).

2.2.4. Evaluation de l'efficacité antitumorale des vaccins

2.2.4.1. Lignée cellulaire Renca-LacZ-ErbB2

Les cellules Renca-LacZ-ErbB2 sont des cellules d'adénocarcinomes rénaux murins syngéniques co-transfectées par le gène LacZ et le gène ErbB2 codant respectivement pour la β-galactosidase bactérienne et la protéine ErbB2 humaine (Maurer-Gebhard et al., 1999). (figure 54). Elles sont cultivées à 37°C dans une atmosphère à 5% CO₂ et 95% d'humidité, dans du milieu de culture RPMI 1640 (L-glutamine et NaHCO₃ 2 g/L) contenant du sérum de veau fœtal décomplémenté (10% V/V, Eurobio, Brumath, France), de la pénicilline (100 UI/mL, Eurobio, Brumath, France), de la streptomycine (100 µg/mL, Eurobio, France), de la généticine (0,5 mg/mL, Invitrogen, Carlsbad, USA) et de la zéocine (0,2 mg/mL, Invitrogen, Carlsbad, USA). Elles sont repiquées tous les 3-4 jours à raison de 1,8*10⁶ cellules par boîte de 150 mm.

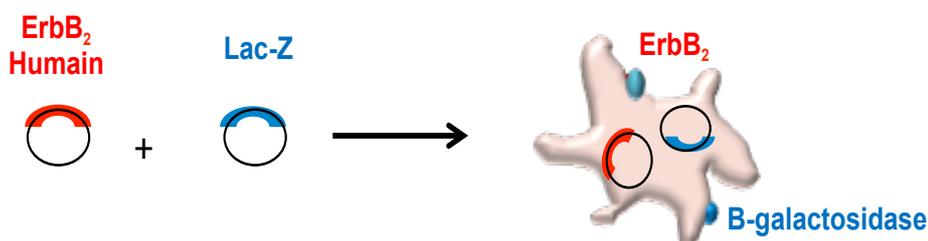


Figure 54 : Représentation schématique du modèle de cellules tumorales utilisées.

2.2.4.2. Modèles de tumeurs chez la souris

Les cellules Renca-LacZ-ErbB2 sont à la base des deux modèles murins de tumeurs utilisés au cours de notre travail. Implantées en s.c. (5. 10⁶ cellules/50 µL dans du PBS avec Ca²⁺ et Mg²⁺/flanc droit), ces cellules induisent la formation de tumeurs solides s.c., et

injectées en i.v. ($5 \cdot 10^5$ cellules /100 μ L dans du PBS avec Ca^{2+} et Mg^{2+}), elles conduisent à la formation de tumeurs pulmonaires chez des souris BALB/c (figure 55).

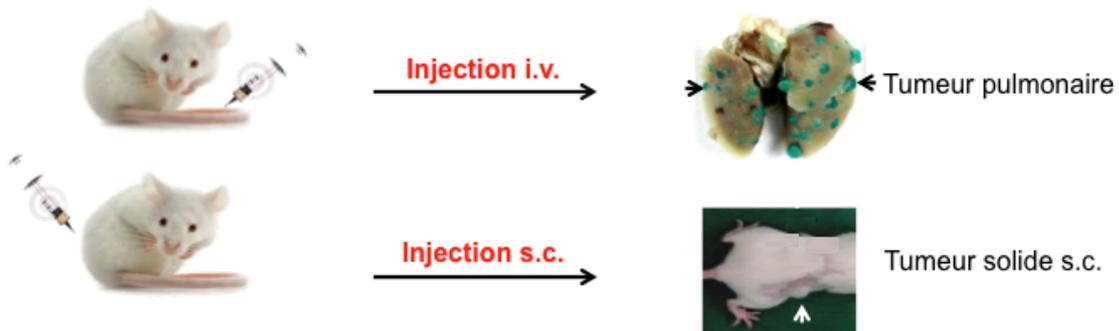


Figure 55 : Implantation i.v. ou s.c. des cellules Renca-LacZ- ErbB2 chez la souris BALB/c.

2.2.4.3. Calendriers de vaccination et d'implantation des tumeurs

a. Vaccination par voie respiratoire

L'efficacité antitumorale des vaccins par voie respiratoire a été étudiée dans les 2 modèles de tumeurs (tumeurs pulmonaires et tumeurs solides s.c.), suivant deux protocoles de vaccination, prophylactique et thérapeutique.

Dans le protocole prophylactique, les souris ont reçu trois administrations de vaccins aux jours 0, 14 et 28 tel que décrit au § 2.2.2. du matériels et méthodes. Les cellules Renca-lacZ-ErbB2 ont été implantées à ces souris par voie i.v. ou s.c. au jour 35 (figure 56a). Dans le protocole thérapeutique, les souris ont reçu des cellules Renca-lacZ-ErbB2 au jour 0 et ont été vaccinées aux jours 2 et 7 (figure 56b). Dans le modèle de tumeurs pulmonaires, les souris ont été euthanasiées un mois après l'implantation des cellules, et l'efficacité du vaccin a été évaluée par le nombre de nodules pulmonaires et la quantité de médiateurs dans le tissu pulmonaire (§ 2.2.4.4. du matériels et méthodes). Dans le modèle de tumeurs solides s.c., l'efficacité du vaccin a été évaluée par le nombre de souris développant des tumeurs après l'implantation des cellules (§ 2.2.4.5. du matériels et méthodes).

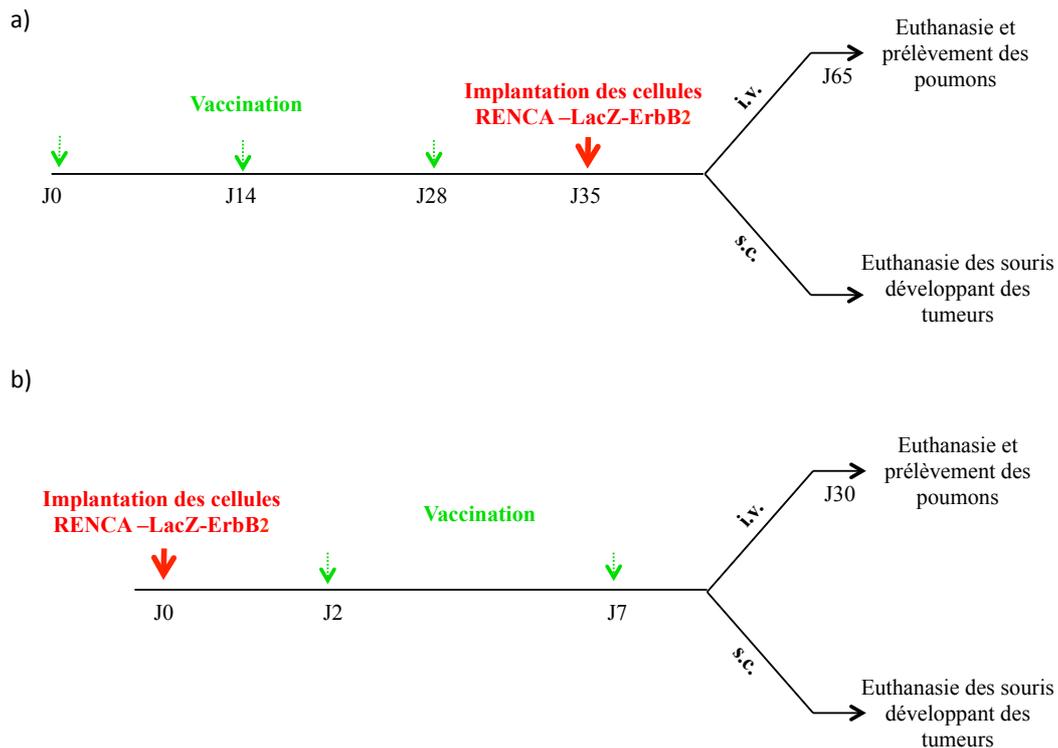


Figure 56 : Calendriers dans le cas de la vaccination prophylactique a) ou thérapeutique b) par voie respiratoire

b. Vaccination par voie nasale

L'efficacité antitumorale des vaccins par voie nasale a été étudiée dans les 2 modèles de tumeurs, suivant un protocole de vaccination prophylactique.

Dans ce cas, les souris ont reçu deux vaccinations aux jours 0 et 14, tel que décrit au § 2.2.2. du matériels et méthodes. Les cellules Renca-lacZ-ErbB2 ont été implantées aux souris par voie i.v. ou s.c. au jour 21 (figure 57). Comme dans le cas de l'administration respiratoire, l'efficacité antitumorale a été appréciée d'une part, par le nombre de nodules pulmonaires et la quantité de médiateurs dans le tissu pulmonaire, et d'autre part, par le nombre de souris développant des tumeurs (§ 2.2.4.4-5. du matériels et méthodes).

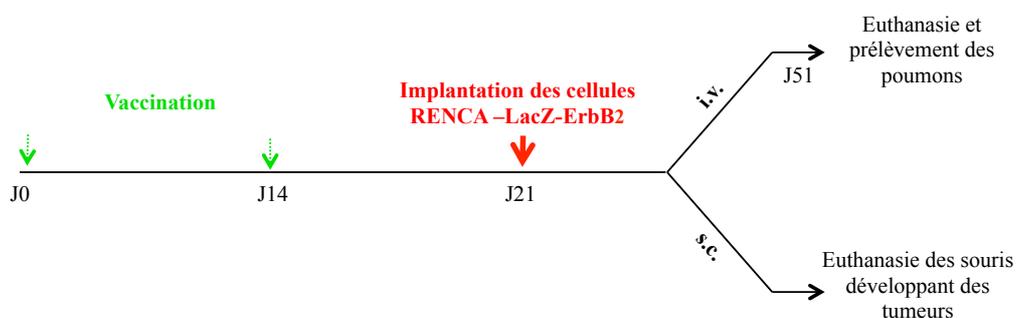


Figure 57 : Calendrier dans le cas de la vaccination par administration nasale.

c. Vaccination par voie sous-cutanée

L'efficacité antitumorale des vaccins après injection s.c. a été étudiée dans le modèle de tumeurs pulmonaires, suivant le protocole de vaccination prophylactique utilisé pour la voie respiratoire (cf figure 56a).

Les souris ont reçu trois administrations de vaccins aux jours 0, 14 et 28 tel que décrit au § 2.2.2. du matériels et méthodes. Les cellules Renca-lacZ-ErbB2 ont été injectées à ces souris par voie i.v. au jour 35 (figure 56 a). Les souris ont été euthanasiées un mois après l'implantation des cellules, et l'efficacité du vaccin a été évaluée par le nombre de nodules pulmonaires et la quantité de médiateurs dans le tissu pulmonaire (§ 2.2.4.4. du matériels et méthodes).

2.2.4.4. Evaluation de l'efficacité des vaccins dans le modèle de tumeurs pulmonaires

Dans le modèle de tumeurs pulmonaires, l'efficacité des vaccins a été évaluée par comptage du nombre de tumeurs pulmonaires et par le dosage de médiateurs dans le tissu pulmonaire.

a. Prélèvement des poumons

Les souris ont été euthanasiées par injection intra-péritonéale d'une surdose d'anesthésique. Après thoracotomie, les poumons ont été perfusés *in situ* avec du PBS, puis prélevés. Les lobes droits ont été congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80° C en vue d'un dosage des médiateurs dans les tissus pulmonaires. Les lobes gauches ont été utilisés pour le comptage des tumeurs pulmonaires.

b. Comptage des tumeurs pulmonaires

Les lobes gauches des poumons ont été fixés dans une solution de formaldéhyde à 4% (V/V) préparée dans du PBS. Après 24 h de fixation, ils ont été rincés à deux reprises dans du PBS. Ensuite, les tumeurs ont été révélées grâce à une solution de coloration (5mM $K_4Fe(CN)_6$, 5mM $K_3Fe(CN)_6$ et 2 mM $MgCl_2$) contenant 1 mg/mL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne) qui est le substrat de la β -

galactosidase. Après 24 h de coloration, les tumeurs colorées en vert ont été comptées sous une loupe.

c. Dosage des médiateurs dans les tissus pulmonaires

Les médiateurs KC, MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) et TGF- β 1 (facteur de croissance tumoral-beta1) ont été dosés dans des homogénats de poumon par ELISA. Les homogénats ont été préparés à partir du lobe droit du poumon. Les lobes congelés ont été broyés dans 2 mL de PBS/lobe contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (1 comprimé complet sans EDTA/50 mL de PBS, Roche, Allemagne) en utilisant un homogénéisateur Ultra-Turrax[®] (T25, Ika, Staufen, Allemagne). Les homogénats obtenus ont été centrifugés (10 000 g, 20 min, 4°C) avant dosage des différents médiateurs. Le dosage des différents médiateurs a été réalisé à l'aide de kits ELISA commerciaux conformément aux instructions des fabricants ((R&D Systems pour KC (référence : DY453); BD Biosciences pour MCP-1 (référence : 555252); eBiosciences pour TGF- β 1 (référence : 88-8350-88)).

2.2.4.5. Evaluation de l'efficacité des vaccins dans le modèle de tumeurs solides s.c.

Dans le cas du modèle de tumeurs solides s.c., l'efficacité des vaccins a été évaluée par le nombre de souris sans tumeurs après l'implantation des cellules Renca-lacZ-ErbB2. Ainsi, 2 à 3 fois par semaine, le flanc dans lequel les cellules ont été implantées a été palpé, et la taille des éventuelles tumeurs développées a été mesurée. Pour éviter la souffrance des animaux, les souris développant des tumeurs ont été euthanasiées lorsque la taille de ces dernières atteignait 0,8 cm³.

2.3. Analyse statistique des données

Les expériences *in vitro* ont été réalisées au moins en duplicat. Les résultats ont été exprimés sous la forme de moyennes \pm SEM. Les différences entre les groupes expérimentaux ont été analysées par une analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivie du post-test de Bonferroni. Les expériences *in vivo* ont été réalisées sur des groupes d'au moins trois souris. Les résultats ont été exprimés sous la forme de moyennes \pm SEM. Les différences de réponse entre les groupes ont été analysées par le test non paramétrique de Mann-Whitney, à l'exception des expériences concernant le modèle de tumeurs solides s.c.

pour lesquelles les données ont été présentées individuellement et l'analyse des différences a été effectuée par le test non paramétrique de Log-rank. L'ensemble des analyses a été réalisé à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6. Les différences entre groupes ont été considérées comme significatives pour des valeurs de $p < 0,05$.

Résultats

Préambule

L'objectif du travail de thèse était de : **1)** concevoir de nouvelles constructions liposomiques destinées à la vaccination antitumorale par voie respiratoire, à partir de la construction précédemment validée au laboratoire pour une vaccination par voie sous-cutanée (construction que nous avons appelée construction d'origine), et **2)** évaluer l'activité immunomodulatrice et l'efficacité antitumorale de ces constructions *in vivo* chez la souris.

Pour cela, notre travail s'est organisé en deux temps :

- **dans un premier temps**, nous avons cherché à faire la preuve de concept de l'efficacité de la construction d'origine, dans le tractus respiratoire. Cette formulation a alors été évaluée après administration respiratoire, permettant une distribution du vaccin dans la cavité nasale et les voies respiratoires inférieures.
- **dans un second temps**, nous avons cherché à optimiser la construction d'origine en faisant varier un certain nombre de paramètres physicochimiques susceptibles d'influencer l'efficacité de ce vaccin (taille, composition, structure, présence de peptide de ciblage ...), et comparer l'activité de ces nouvelles formulations à celle de la formulation d'origine. Dans cette partie de notre travail, le vaccin d'origine et les nouvelles formulations ont été évaluées après administration nasale, afin de n'atteindre que la muqueuse nasale.

1. Formulation, activité et efficacité du vaccin d'origine après administration respiratoire chez la souris

Dans une première partie de notre travail, nous avons cherché à faire la preuve de concept de l'efficacité de la construction d'origine, dans le tractus respiratoire. Pour cela, l'administration du vaccin a été réalisée selon une procédure permettant une distribution dans la cavité nasale et les voies respiratoires inférieures.

1.1. Formulation du vaccin

Différentes stratégies de conjugaison de peptides sur les liposomes ont été mises au point au laboratoire, dans le but de développer des constructions vaccinales sous-unitaires entièrement synthétiques. Ces techniques impliquent l'incorporation, dans la bicouche phospholipidique de liposomes, d'ancres synthétiques fonctionnalisées dont la réactivité chimique permet la formation d'une liaison covalente avec le ou les peptide(s) d'intérêt. Les réactions chimiques engagées sont notamment l'addition de Mickaël sur une fonction maléimide, la substitution nucléophile sur un bromoacétamide ou encore la click chemistry. Il s'agit de méthodes douces, en milieu aqueux qui préservent la structure des peptides (Frisch et al., 2010; Schelte et al., 2000). Ces travaux ont permis de développer un vaccin synthétique liposomique de type SUV présentant, à sa surface, différents peptides, associés à une molécule adjuvante (souvent un ligand des TLR) insérée dans la bicouche. Ce type de construction a démontré son potentiel en vaccination antitumorale après administration par voie sous-cutanée (Roth et al., 2005; Thomann et al., 2011), et en vaccination antibactérienne après administration par voie intramusculaire (Said Hassane et al., 2009), ou respiratoire (Heurtault et al., 2009). La construction utilisée en vaccination antitumorale était constituée de liposomes SUV auxquels les peptides Ha et ErbB2 (via l'ancre DPGMal) ainsi que la molécule adjuvante Pam₂CAG, ligand des TLR2/6, étaient associés (figure 58).

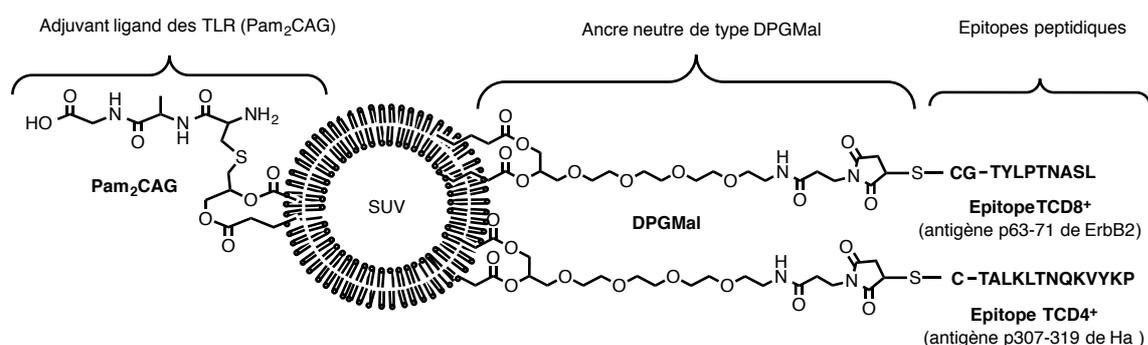


Figure 58 : Représentation schématique de la construction d'origine SUV/Ha/ErbB2/Pam₂CAG.

Sur la base de ces travaux, nous souhaitons évaluer la capacité de cette construction à induire une réponse antitumorale par voie respiratoire. Pour cela, elle a été formulée selon le protocole précédemment établi au laboratoire (Roth et al., 2005). Il s'agit dans un premier temps, de formuler des liposomes SUV en présence de Pam₂CAG et de l'ancre DPGMal par la technique d'hydratation d'un film lipidique suivie d'une sonication. Les liposomes préformés sont ensuite mis en contact avec les peptides Ha et ErbB2 (simultanément) en solution pendant 3 h à raison de 0,5 équivalent de chacun des peptides (soit 1 équivalent de peptides) pour 1 équivalent d'ancre disponible à la surface. La composition de ce vaccin est indiquée dans le tableau 6.

Tableau 6 : Composition du vaccin synthétique d'origine à base de liposomes SUV

Formulation	PC (%)	PG (%)	Chol (%)	DPGMal (%)	Pam ₂ CAG (%)	Ha (%)	ErbB2 (%)
Liposomes blancs	80	20	50	5	/	/	/
SUV/DPGMal/Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG	75	20	50	5	0,2	1,25	1,25

L'étude de la distribution des tailles du vaccin liposomique ainsi obtenu montre une population de particules monodisperse homogène (coefficient de variation (CV) faible et PDI inférieur à 0,3) d'un diamètre moyen de 64 nm (tableau 7). Ces caractéristiques physicochimiques sont similaires à celles des liposomes blancs (ne contenant ni peptide ni adjuvant), et similaires aux résultats obtenus préalablement au sein du laboratoire. Le taux de couplage des peptides est de 88% sans modification significative de la taille des vésicules par rapport aux liposomes blancs. Ces résultats sont reproductibles (n = 9).

Tableau 7 : Caractérisation du vaccin synthétique d'origine à base de liposomes SUV.

	Formulations	Conditions de couplage	Proportion de Ha+ ErbB2 (%)	Diamètre moyen (nm) (% de la population)	CV (%)	PDI	Taux de fixation des peptides (%)
Liposomes sans peptide, ni adjuvant	SUV blancs	/	/	69 ± 12 (94%)	17	0,19	/
Vaccin complet (n=9)	SUV/DPGMal /Ha/ErbB2 /Pam ₂ CAG	pH 6,5 3 h	2,5	64 ± 9 (96%)	14	0,19	88

Ces caractéristiques physicochimiques sont compatibles avec les études *in vivo* que nous souhaitons engager, à savoir des liposomes de diamètre moyen inférieur ou égal à 100 nm obtenus de façon reproductible avec des taux de couplage suffisamment importants pour à la fois limiter les quantités de vecteurs à administrer et le coût de production.

1.2. Activité immunostimulatrice et efficacité antitumorale du vaccin après administration respiratoire chez la souris

L'évaluation biologique du vaccin a été initiée à la dose de 3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG. Cette dose a été définie à partir des résultats antérieurs du laboratoire en vaccination par voie s.c., en tenant compte des spécificités de l'administration par voie respiratoire chez la souris (volume maximal administrable = 25 µL).

1.2.1. Activité immunostimulatrice locale

L'activité immunostimulatrice locale du vaccin SUV/Ha/ErbB2/Pam₂CAG a été évaluée par le comptage et la caractérisation des cellules inflammatoires, ainsi que par la quantification de chimiokines et cytokines marqueurs de la réponse innée (TNF- α , KC, IL-6) dans les liquides de LBA d'animaux vaccinés. Pour cela, des souris ont reçu 1 administration respiratoire de la formulation, à la dose de 3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG dans 25 µL, et ont été euthanasiées 24 h plus tard. Des animaux contrôles ont reçu du tampon.

L'analyse des LBA a montré une augmentation significative du nombre total de cellules immunitaires chez les souris vaccinées ($1,6 \times 10^6$ cellules) par rapport au groupe contrôle ($2,5 \times 10^5$ cellules) (figure 59A). Cette augmentation résultait d'un infiltrat de polynucléaires neutrophiles ($1,5 \times 10^6$ cellules). Cet infiltrat de neutrophiles s'accompagnait d'une baisse significative des macrophages par rapport aux souris contrôles. L'activité immunostimulatrice du vaccin, suggérée par cet infiltrat de neutrophiles, a été confirmée par la quantification des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires. En effet, comme le montre la figure 59B, une augmentation significative de la concentration de TNF- α , KC, et IL-6 a été observée dans les LBA des souris vaccinées par comparaison aux souris contrôles.

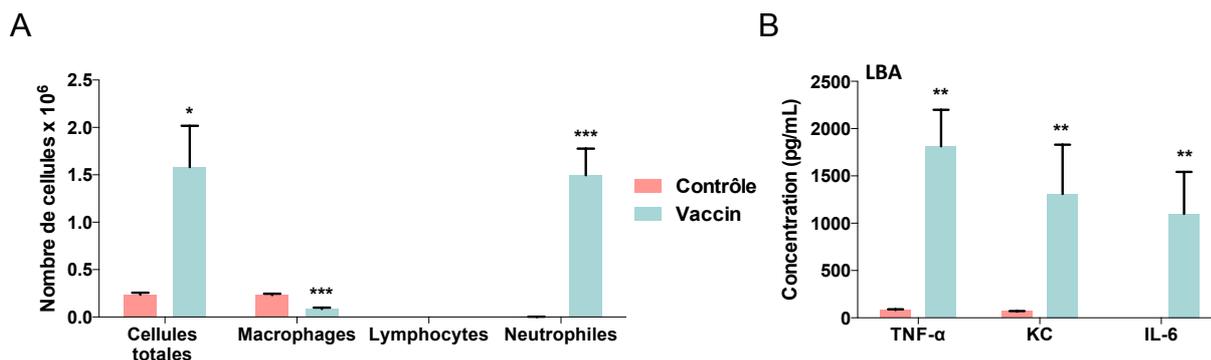


Figure 59 : Activité immunostimulatrice locale du vaccin original après administration respiratoire. (A) Nombre total et différentiel des cellules inflammatoires et (B) concentration en chimiokines et cytokines dans les LBA des animaux, 24 h après une administration de 25 μ L de vaccin (3,5 μ g d'ErbB2, 4,9 μ g d'Ha et 0,5 μ g de Pam₂CAG) ou de tampon (contrôle). Les résultats sont les moyennes \pm SEM de n = 4-5 animaux par lot. Les différences entre le groupe vacciné et le groupe contrôle ont été analysées statistiquement (* p < 0,05, ** p < 0,01 et *** p < 0,001).

1.2.2. Activité immunostimulatrice systémique

La réponse immunitaire systémique induite par le vaccin SUV/Ha/ErbB2/Pam₂CAG a été déterminée par la mesure de la production d'IFN- γ par les splénocytes des animaux vaccinés, après culture et stimulation *ex vivo* de ces splénocytes avec les peptides d'intérêt Ha et ErbB2. Pour cela, des souris ont reçu 3 administrations du vaccin, à une dose de 3,5 μ g d'ErbB2, 4,9 μ g d'Ha et 0,5 μ g de Pam₂CAG, à 14 jours d'intervalle (J0, J14 et J28), et ont été euthanasiées 7 jours après la dernière administration. Des animaux contrôles ont reçu du tampon.

La mise en contact des splénocytes des souris vaccinées avec le peptide Ha ou ErbB2 pendant 18 h s'est traduite par une production élevée et significative d'IFN- γ (90 colonies productrices d'IFN- γ /4x10⁵ cellules) comparée au groupe de souris contrôles qui ne présentait pas de production d'IFN- γ quel que soit le stimuli (figure 60). Parallèlement, la culture des splénocytes dans du milieu de culture sans stimuli (contrôle négatif) n'a déclenché aucune production d'IFN- γ , montrant ainsi la spécificité de la production induite par les peptides Ha et ErbB2. De même, la Concanavaleine-A, un activateur cellulaire non spécifique, a permis de stimuler une production d'IFN- γ par les splénocytes de tous les groupes d'animaux, permettant alors de déduire que l'absence de stimulation des splénocytes des souris contrôles par les peptides Ha et ErbB2 est bien due à une non reconnaissance des peptides, et non pas à un mauvais état ou à une mort des cellules (résultats non présentés). Ainsi, ces résultats montrent la mise en place d'une réponse immunitaire systémique après trois administrations respiratoires du vaccin.

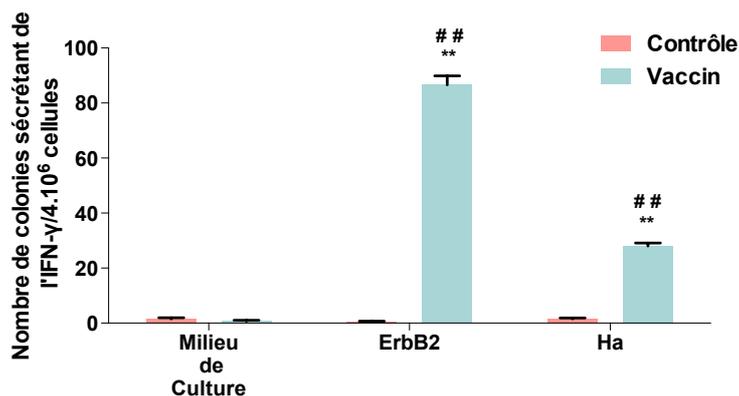


Figure 60 : Activité immunostimulatrice systémique du vaccin original après administration respiratoire. La rate des souris ayant reçu 3 administrations respiratoires du vaccin (3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG) ou de tampon (contrôle) a été prélevée une semaine après la dernière vaccination. Un dosage de l'IFN-γ par ELISpot a été réalisé après mise en culture et stimulation *ex vivo* des splénocytes par les peptides Ha et ErbB2 ou par du milieu de culture seul. Les résultats présentés sont représentatifs de deux expériences et ont été obtenus sur un pool de cellules provenant de n = 3 animaux par lot. Ils sont la moyenne ± SEM de n = 6 puits. Les différences de réponse entre le groupe vacciné et le groupe contrôle (*) ainsi que le témoin négatif sans stimuli (#) ont été analysées statistiquement ($p < 0,05$ (un symbole), $p < 0,01$ (deux symboles) et $p < 0,001$ (trois symboles)).

1.2.3. Efficacité antitumorale

L'efficacité antitumorale du vaccin SUV/Ha/ErbB2/Pam₂CAG après vaccination respiratoire a été évaluée selon un calendrier prophylactique ou thérapeutique.

1.2.3.1. Efficacité antitumorale après vaccination respiratoire prophylactique

L'efficacité antitumorale du vaccin SUV/Ha/ErbB2/Pam₂CAG après vaccination respiratoire prophylactique a été évaluée contre des tumeurs pulmonaires et solides s.c.. Pour cela, des souris ont reçu 3 administrations de vaccin, correspondant à une dose de 3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG, à 14 jours d'intervalle (J0, J14 et J28), suivies au jour 35, d'une injection i.v. ou s.c. de cellules Renca-lacZ-ErbB2. Dans le modèle de tumeurs pulmonaires, l'efficacité du vaccin a été appréciée par le nombre de nodules pulmonaires se développant, et par la quantité des médiateurs pro-inflammatoires KC, MCP-1 et TGF-β1, présents dans le tissu pulmonaire. Dans le modèle de tumeurs solides s.c., l'efficacité a été estimée par l'absence de développement de tumeurs.

Dans le cas de tumeurs pulmonaires, les résultats ont montré une efficacité totale (absence de tumeur) du vaccin comparé aux souris contrôles qui ont toutes développées des tumeurs (49 tumeurs en moyenne) (figure 61A). A titre de comparaison, dans ces expériences, un groupe d'animaux a été vacciné par voie s.c. avec une dose de vaccin de

15 μg d'ErbB2, 21 μg d'Ha et 2,2 μg de Pam₂CAG. Malgré une dose 4 fois plus élevée, l'administration par voie s.c. s'est traduite par une efficacité partielle du vaccin, puisque les animaux ainsi traités ont développé des tumeurs. Une baisse du nombre de tumeurs a été constatée, mais cette baisse était non significative par rapport au groupe contrôle. A noter, que pour cette voie d'administration, une efficacité totale du vaccin était attendue, selon les résultats déjà décrits au laboratoire (Thomann et al., 2011). L'activité antitumorale très efficace du vaccin après administration respiratoire s'est accompagnée d'une diminution significative des médiateurs KC (150 pg/mL), MCP-1 (30 pg/mL) et TGF- β 1 (600 pg/mL) dans le tissu pulmonaire des souris vaccinées par rapport aux souris contrôles (700 pg/mL pour KC, 400 pg/mL pour MCP-1 et 3300 pg/mL pour TGF- β 1) (figure 61 B), alors que dans le cas d'une vaccination s.c., une baisse significative n'a été observée que pour le TGF- β 1 (1300 pg/mL).

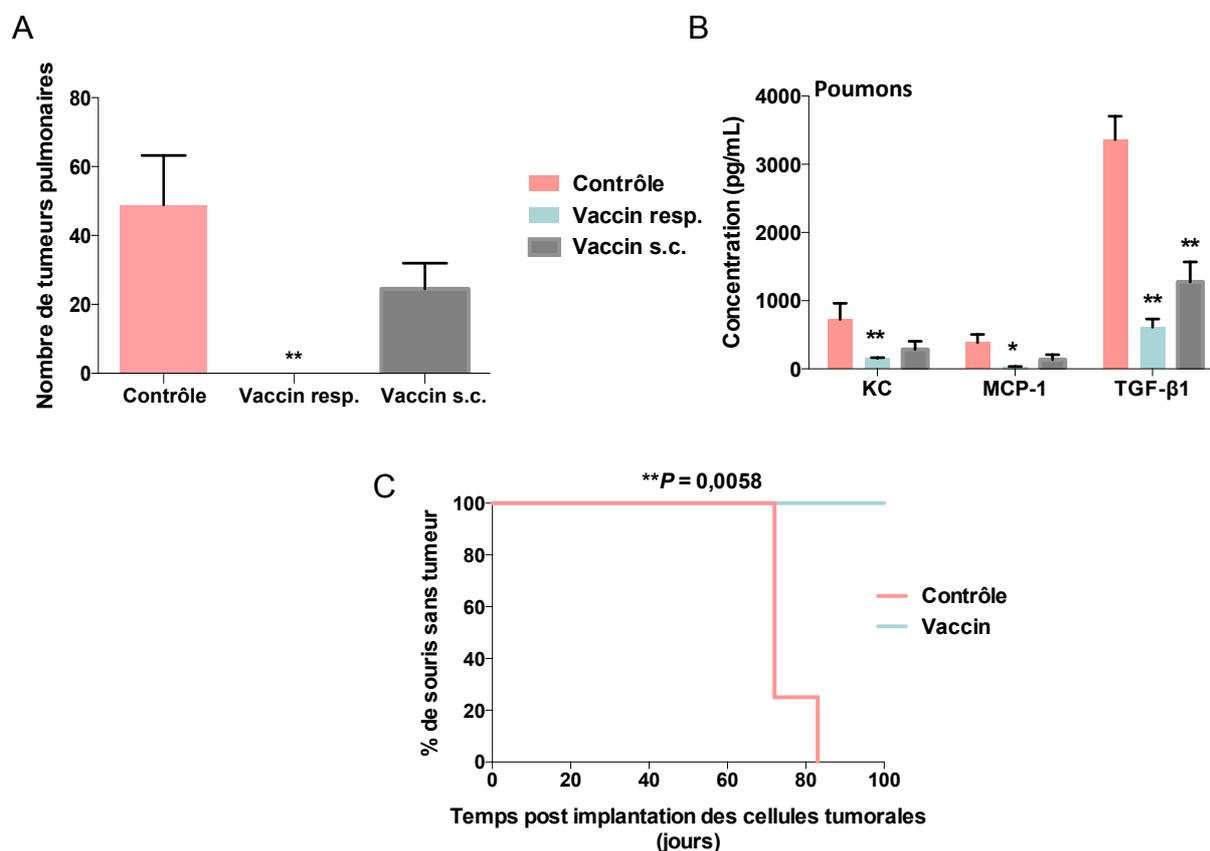


Figure 61 : Efficacité antitumorale du vaccin original contre des tumeurs pulmonaires (A et B) et solides s.c. (C), après vaccination prophylactique par voie respiratoire. (A) Nombre de tumeurs pulmonaires ; (B) Production de médiateurs pro-inflammatoires ; (C) Pourcentage de souris ne développant pas de tumeurs. Des souris ont reçu trois administrations de vaccin (3,5 μg d'ErbB2, 4,9 μg d'Ha et 0,5 μg de Pam₂CAG) ou de tampon (contrôle) par voie respiratoire aux jours 0, 14, et 28, suivies, au jour 35, d'une implantation s.c. ou i.v. de cellules Renca-lacZ-ErbB2. A titre de comparaison, dans ces expériences, un groupe d'animaux a été vacciné par voie s.c. avec une dose de vaccin de 15 μg d'ErbB2, 21 μg d'Ha et 2,2 μg de Pam₂CAG, puis a reçu une injection i.v. de cellules Renca. Les résultats sont la moyenne \pm SEM de n = 4-6 animaux par lot. Les différences de réponse entre les groupes vaccinés et le groupe contrôle ont été analysées statistiquement (* p < 0,05, ** p < 0,01 et *** p < 0,001).

Une efficacité totale du vaccin administré par voie respiratoire a également été observée dans le modèle de tumeurs solides s.c. En effet, 100 jours après l'implantation des cellules Renca-LacZ-ErbB2, aucune souris vaccinée n'avait développé de tumeurs, alors qu'au jour 83, 100% des souris contrôles étaient porteuses de tumeurs solides s.c. (figure 61C).

1.2.3.2. Efficacité antitumorale après vaccination respiratoire thérapeutique

L'efficacité antitumorale du vaccin SUV/Ha/ErbB2/Pam₂CAG après vaccination respiratoire thérapeutique a été évaluée contre des tumeurs pulmonaires et solides s.c.. Pour cela, des souris ont reçu une injection i.v. ou s.c. de cellules Renca-lacZ-ErbB2 au jour 0 du protocole, et ont été vaccinées aux jours 2 et 7. Comme précédemment, la dose de vaccin était de 3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG.

Dans le cas de tumeurs pulmonaires, les résultats ont montré une diminution significative du nombre de tumeurs (9 tumeurs) chez les souris vaccinées comparées aux souris contrôles (39 tumeurs) (figure 62A). Cette activité antitumorale s'est accompagnée d'une diminution significative de la concentration en médiateurs KC (240 pg/mL) et MCP-1 (0 pg/mL) dans le tissu pulmonaire de souris vaccinées par rapport aux souris contrôles (400 pg/mL pour KC et 80 pg/mL pour MCP-1) (figure 62B). Pour le TGF-β1, bien qu'une tendance à la baisse ait été observée, elle était non significative.

En revanche, la vaccination respiratoire thérapeutique n'a pas permis de protéger les animaux contre le développement de tumeurs s.c.. En effet, toutes les souris vaccinées ont développé des tumeurs après l'implantation des cellules tumorales, avec la même cinétique que les souris contrôles (figure 62C).

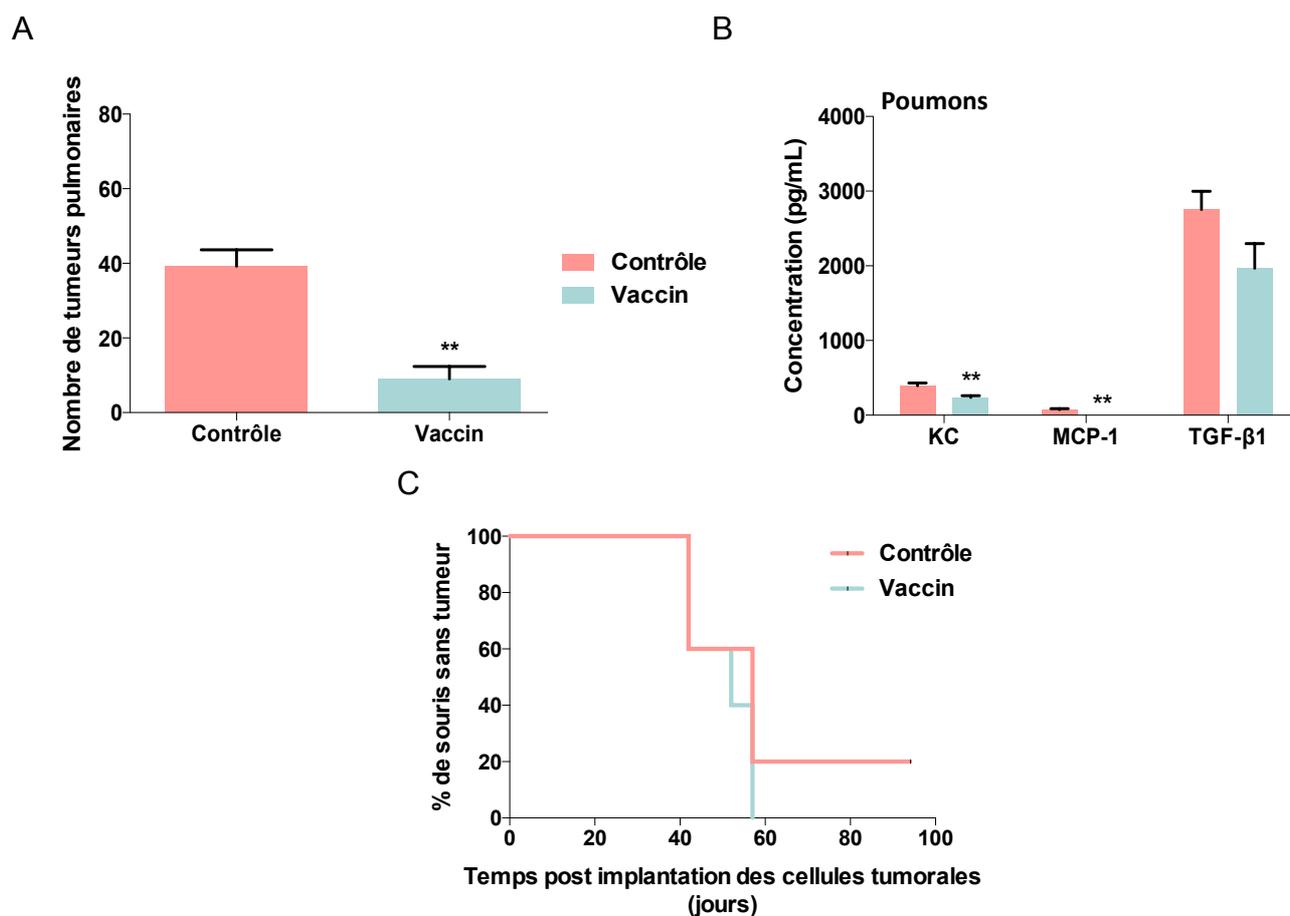


Figure 62 : Efficacité antitumorale du vaccin original contre des tumeurs pulmonaires (A et B) ou solides s.c. (C), après vaccination thérapeutique respiratoire. (A) Nombre de tumeurs pulmonaires ; (B) Production de médiateurs pro-inflammatoires ; (C) Pourcentage de souris ne développant pas de tumeurs. Des souris ont reçu une injection i.v. ou s.c. de cellules Renca-lacZ-ErbB2 au jour 0 du protocole, et ont été vaccinées aux jours 2 et 7. Lors des vaccinations, les animaux ont reçu une dose de vaccin de 3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG ou du tampon (contrôle). Les résultats sont la moyenne ± SEM de n = 5 animaux par lot. Les différences de réponse entre le groupe vacciné et le groupe contrôle ont été analysées statistiquement (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

En conclusion, l'analyse des liquides de LBA et la restimulation des splénocytes *ex vivo* ont montré une activité immunostimulatrice locale et systémique du vaccin original SUV/Ha/ErbB2/Pam₂CAG suite à son administration respiratoire. La vaccination prophylactique par cette voie a conduit à une efficacité antitumorale totale, quel que soit le type de tumeurs, pulmonaires ou solides s.c. En vaccination respiratoire thérapeutique, la construction originale a montré une efficacité partielle contre des tumeurs pulmonaires, mais aucune efficacité face à des tumeurs solides s.c..

Cette première partie de notre travail nous a donc permis de montrer un intérêt certain de la voie respiratoire pour la vaccination antitumorale à visée locale et distale, à l'aide de liposomes. Toutefois, le mode d'administration utilisé impliquait à la fois la cavité nasale et les voies aériennes inférieures. Ce mode d'administration ne permet donc pas de discriminer

le rôle de chaque partie du tractus respiratoire dans la réponse induite par le vaccin. Or, cette information est essentielle pour définir le système d'administration optimal en vue d'une vaccination chez l'homme (spray nasal, aérosol). Pour une utilisation en thérapeutique humaine, l'administration nasale a l'avantage d'être plus facile à mettre en œuvre que l'administration pulmonaire, en termes de dispositifs d'administration, mais également d'accessibilité pour le patient. Ainsi, dans la suite de notre travail, nous avons cherché à cibler la cavité nasale, qui présente également l'avantage d'être équipée de tissus lymphoïdes contenant toutes les cellules nécessaires à l'obtention d'une réponse immunitaire

2. Evaluation et optimisation du vaccin d'origine dans le cadre d'une administration nasale

Dans la deuxième partie de nous travail, nous nous sommes donc attachés à évaluer notre vaccin d'origine par voie nasale, puis à l'optimiser.

Pour cela, les conditions d'administration des vaccins ont été adaptées pour limiter leur dépôt au niveau de la muqueuse nasale. Ainsi, nous avons préalablement défini que, pour une distribution exclusivement nasale, le volume de vaccin à déposer dans les fosses nasales devait être limité à 2,5 μL par narine, soit 5 μL au total, au lieu de 25 μL pour une administration respiratoire. Cependant, dans un premier temps, nous ne souhaitons pas nous écarter des quantités de peptide et d'adjuvant qui nous avaient permis d'obtenir une réponse antitumorale par voie respiratoire. Compte tenu des techniques de formulation, il ne nous était pas possible de réaliser d'emblée des formulations vaccinales 5 fois concentrées. Ceci explique pourquoi, pour pouvoir administrer une dose de vaccin équivalente à celle que nous avons retenue pour la voie respiratoire, nous avons été amenés à formuler les liposomes à une concentration dite normale avant de les concentrer par centrifugation à l'aide d'unités de concentration. Le dosage de la PC des préparations avant et après concentration nous a permis de vérifier qu'il n'y avait pas de phénomène de rétention des liposomes sur le filtre des unités de concentration.

Par ailleurs, afin d'optimiser nos constructions, nous avons fait varier plusieurs paramètres physicochimiques susceptibles d'influencer leur efficacité vaccinale : diamètre, structure, composition, viscosité, présence d'éléments de ciblage.... Ainsi, différentes constructions liposomiques ont été formulées, et leur activité ainsi que leur efficacité *in vivo* ont été comparées à celles obtenues avec le vaccin original.

2.1. Evaluation du vaccin d'origine par voie nasale, et influence du diamètre et de la structure des liposomes

Une première étape dans notre étude de vaccination par voie nasale a été de caractériser l'activité et l'efficacité du vaccin d'origine, tout en évaluant l'influence du diamètre et de la structure des liposomes sur les réponses obtenues. En effet, dans nos études antérieures, nous nous sommes concentrés sur l'utilisation de liposomes de type SUV. C'est avec ces liposomes de petites tailles et unilamellaires que des réponses en vaccination antibactérienne

et antitumorale ont été obtenues. Cependant, comme nous l'avons soulevé dans l'introduction, le paramètre de taille des vecteurs est essentiel en vaccination. En effet, la distribution initiale du vecteur et/ou sa capture par les cellules peuvent en dépendre, et ceci en fonction de la voie d'administration.

2.1.1. Formulation des vaccins liposomiques concentrés de type SUV, MLV et REV

Pour obtenir les différentes préparations vaccinales, nous avons joué sur la technique de formulation ce qui nous a permis d'obtenir des liposomes multilamellaires de grande taille de type MLV (en éliminant l'étape de sonication qui transforme les MLV en SUV), et des liposomes unilamellaires de grande taille de type REV (obtenus par inversion de phase au cours d'une étape d'évaporation) (figure 44). Ces liposomes présentaient la même composition de base que les liposomes SUV formulés pour la première partie de ce travail, à savoir PC/PG/Chol/DPGMal/Pam₂CAG à un ratio molaire de 75/20/50/5/0,2 (tableau 6).

Les caractéristiques des liposomes obtenus pour cette étude, avant et après une étape de concentration de 5 fois, sont réunies dans le tableau 8.

Tableau 8 : Caractérisation des constructions vaccinales à base de liposomes de diamètre et de structure différents avant et après concentration.

Formulations	Avant concentration					Après concentration 5X		
	Conditions de couplage	Proportion de Ha+ ErbB2 (%)	Diamètre moyen (nm) (% de la population)	PDI	Taux de fixation des peptides (%)	Diamètre moyen (nm) (% de la population)	PDI	Taux de fixation des peptides (%)
SUV /DPGMal/ Ha/ErbB2/ Pam ₂ CAG (n = 6)	pH 6,5 3 h	2,5	64 ± 9 (96%)	0,19	88	68 ± 13 (95%)	0,20	84
REV /DPGMal/ Ha/ErbB2/ Pam ₂ CAG (n = 3)	pH 6,5 3 h	2,5	223 ± 43 (97 %)	0,18	77	231 ± 55 (97 %)	0,18	70
MLV /DPGMal/ Ha/ErbB2/ Pam ₂ CAG (n = 3)	pH 6,5 3 h	2,5	ND*	ND*	80	ND*	ND*	77

ND : non déterminé

Les REV obtenus par la méthode d'inversion de phase sont des liposomes uni- ou oligo-lamellaires (Prathyusha et al., 2013) qui présentent une population monodisperse (PDI <0,3) d'un diamètre moyen de 223 nm (environ 4 fois plus grand que les SUV). Le taux de

couplage peptidique avec ces liposomes est de 77%. Les constructions vaccinales à base des MLV n'ont pas pu être caractérisées par notre méthode de mesure. En effet, ces particules, de plus grosses tailles, ont tendance à sédimenter. Elles n'ont donc plus le mouvement Brownien indispensable pour appliquer la technique de diffusion quasi-élastique de la lumière. Néanmoins, leur aspect très blanc et des résultats de la littérature obtenus dans les mêmes conditions de formulation avec une composition similaire, nous permettent de supposer que leur diamètre moyen est > 500 nm avec une distribution très large (Laouini et al., 2012). Le taux de couplage peptidique pour ces liposomes est de 80%. Comme nous pouvons le constater ce taux est plus faible pour les REV et MLV que celui des SUV. Dans notre procédé de préparation des formulations, les peptides sont mis en contact avec les liposomes préformés. Or, à l'inverse des SUV, les REV et surtout les MLV présentent plusieurs bicouches concentriques. Donc, nous pouvons supposer qu'une plus grande partie de l'ancre DPGMal est orientée vers l'intérieur des liposomes ce qui la rend non accessible pour le couplage peptidique. Ces taux de couplage restent cependant compatibles avec les études *in vivo* que nous souhaitons réaliser.

Après concentration, les propriétés de taille n'ont pas été modifiées quel que soit le type de liposomes. En revanche, nous avons observé une baisse des taux de fixation peptidique de l'ordre de 10% pour les formulations REV et de 4% pour les MLV.

2.1.2. Activité immunostimulatrice et efficacité antitumorale du vaccin de type SUV

Avant de mener une étude comparative de l'activité et de l'efficacité antitumorale des vaccins de différents diamètres et formes par voie nasale, nous avons caractérisé celles du vaccin de type SUV, correspondant au vaccin d'origine concentré 5X. Dans ce travail, nous avons donc utilisé la même dose de vaccin que par voie respiratoire, soit de 3,5 μg d'ErbB2, 4,9 μg d'Ha et 0,5 μg de Pam₂CAG contenue dans 5 μL .

2.1.2.1. Activité immunostimulatrice locale

L'activité immunostimulatrice locale du vaccin SUV/Ha/ErbB2/Pam₂CAG a été évaluée dans les liquides de lavages nasaux (LN) d'animaux ayant reçu une administration de vaccin à la dose de 3,5 μg d'ErbB2, 4,9 μg d'Ha et 0,5 μg de Pam₂CAG. Les animaux ont été euthanasiés 2, 6, 8, 18, 24 et 48 h après l'administration du vaccin afin de réaliser une étude cinétique de la réponse induite. En effet, l'administration nasale n'ayant jamais été utilisée au

laboratoire, nous voulions être sûr de mesurer la réponse du vaccin à son temps optimum. En l'absence d'infiltrat cellulaire significatif, cette réponse n'a été évaluée que par la quantification des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires dans les LN. Seules, l'IL-6 et KC ont été mesurées, le TNF- α étant indétectable.

L'analyse des LN a révélé une augmentation significative de la concentration en IL-6 et KC à partir de 2 h après la vaccination pour atteindre un maximum à 6-8 h (environ 2300 pg/mL pour IL-6 et 700 pg/mL pour KC (figure 63). Ensuite, la réponse a diminué progressivement, pour finalement atteindre, à 48 h, un niveau semblable à celui des souris non vaccinées. Ce profil montre la présence d'une cinétique de la réponse inflammatoire locale atteignant son maximum entre 6 et 8 h. Le temps de 6 h est la durée la plus courte pour avoir une réponse locale optimale. Ainsi, pour la suite de nos travaux, nous avons décidé d'utiliser préférentiellement ce temps de 6 h afin d'évaluer l'activité locale induite par les différents types de vaccins destinés à l'administration nasale.

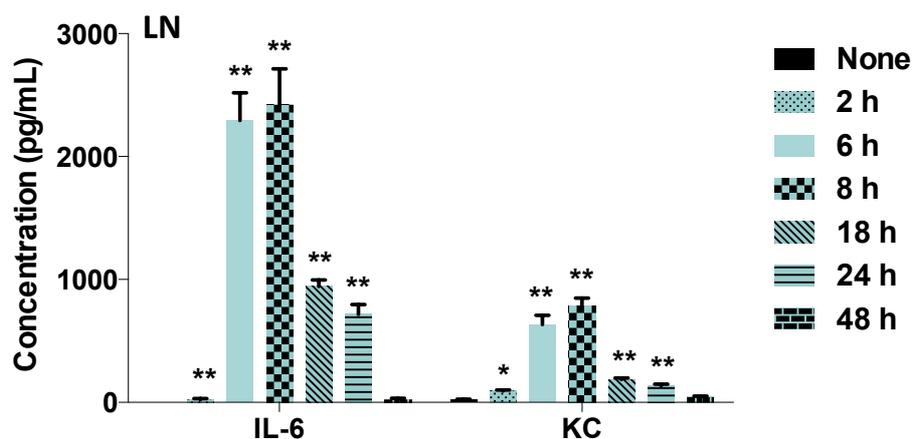


Figure 63 : Activité immunostimulatrice locale du vaccin original après administration nasale. Des souris ont reçu une administration nasale de vaccin à la dose de 3,5 μ g d'ErbB2, 4,9 μ g d'Ha et 0,5 μ g de Pam₂CAG. L'IL-6 et KC ont été quantifiées dans les LN 2, 6, 8, 18, 24 et 48 h après l'administration. Des animaux non vaccinés (None) ont été utilisés comme contrôle. Les résultats sont la moyenne \pm SEM de n = 5 animaux par lot. Les différences de réponse entre les différents temps ont été analysées statistiquement (* p < 0,05, ** p < 0,01 et *** p < 0,001).

2.1.2.2. Activité immunostimulatrice systémique

La réponse immunitaire systémique induite par le vaccin SUV/Ha/ErbB2/Pam₂CAG suite à son administration nasale a été déterminée par la mesure de la production d'IFN- γ par les splénocytes des animaux vaccinés, après culture et stimulation *ex vivo* de ces splénocytes

avec les peptides d'intérêt Ha et ErbB2. Pour cela, des souris ont reçu 2 administrations de vaccin, à une dose de 3,5 μg d'ErbB2, 4,9 μg d'Ha et 0,5 μg de Pam₂CAG, à 14 jours d'intervalle (J0, J14), et ont été euthanasiés 7 jours après la dernière administration. Des animaux contrôles ont reçu du tampon.

La mise en contact des splénocytes des souris vaccinées avec les peptides Ha et ErbB2 ne s'est pas traduite par l'apparition d'une production d'IFN- γ (figure 64), alors que la mise en contact des cellules avec le témoin positif Concanavaline-A a bien permis une production d'IFN- γ (résultats non illustrés). Ainsi, ces résultats suggèrent que la vaccination nasale ne permet pas d'obtenir une réponse immunitaire systémique, puisque qu'aucun splénocyte spécifique de ces peptides n'est détecté.

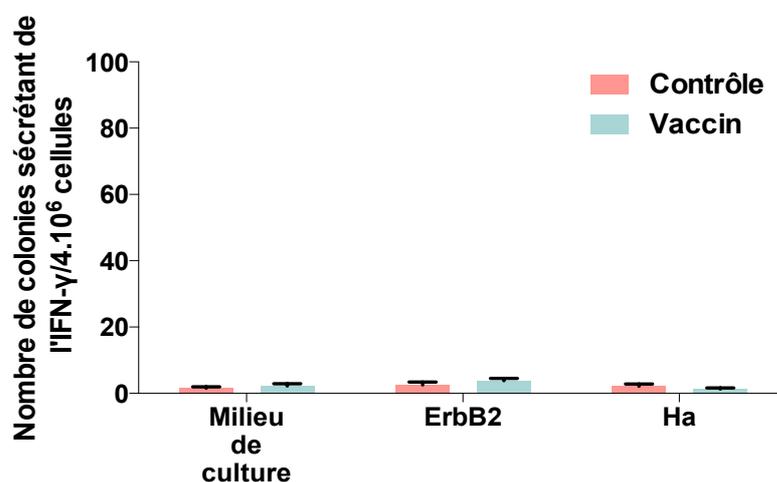


Figure 64 : Activité immunostimulatrice systémique du vaccin original après administration nasale. La rate des souris ayant reçu 2 administrations nasales du vaccin (3,5 μg d'ErbB2, 4,9 μg d'Ha et 0,5 μg de Pam₂CAG) ou de tampon (contrôle) a été prélevée une semaine après la dernière vaccination. Un dosage de l'IFN- γ par ELISpot a été réalisé après mise en culture et stimulation *ex vivo* des splénocytes par les peptides Ha et ErbB2 ou par du milieu de culture seul. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences réalisées sur un pool de cellules provenant de n = 3-4 animaux par lot. Ils sont la moyenne \pm SEM de n = 3-4 puits. Les différences de réponse entre le groupe vacciné et le groupe contrôle (*) ainsi que le témoin négatif sans stimuli (#) ont été analysées statistiquement ($p < 0,05$ (un symbole), $p < 0,01$ (deux symboles) et $p < 0,001$ (trois symboles)).

2.1.2.3. Efficacité antitumorale

L'efficacité antitumorale du vaccin SUV/Ha/ErbB2/Pam₂CAG après administration nasale a été évaluée contre des tumeurs pulmonaires et solides s.c dans un protocole de vaccination prophylactique. Pour cela, des souris ont reçu 2 ou 3 administrations de vaccin, à la dose de 3,5 μg d'ErbB2, 4,9 μg d'Ha et 0,5 μg de Pam₂CAG, ou de tampon (contrôle), à 14 jours d'intervalle (J0, J14 et J28), suivies 7 jours après la dernière vaccination d'une

injection s.c. ou i.v. de cellules Renca-lacZ-ErbB2. Dans le modèle de tumeurs pulmonaires, l'efficacité antitumorale a été appréciée par le nombre de tumeurs pulmonaires et la quantification des médiateurs KC et MCP-1 dans le tissu pulmonaire. Dans le modèle de tumeurs solides s.c., elle a été mesurée par l'absence du développement de tumeurs.

Dans le cas de tumeurs pulmonaires, les résultats ont montré une diminution significative d'environ 70% du nombre de tumeurs chez les souris vaccinées (14 tumeurs) par rapport aux souris contrôles (43 tumeurs) (figure 65A). Cette efficacité antitumorale a été confirmée par une baisse significative de la concentration des médiateurs KC (185 pg/mL) et MCP-1 (40 pg/mL) dans le tissu pulmonaire des souris vaccinées par rapport aux souris contrôles (390 pg/mL pour KC et 130 pg/mL pour MCP-1) (figure 65B).

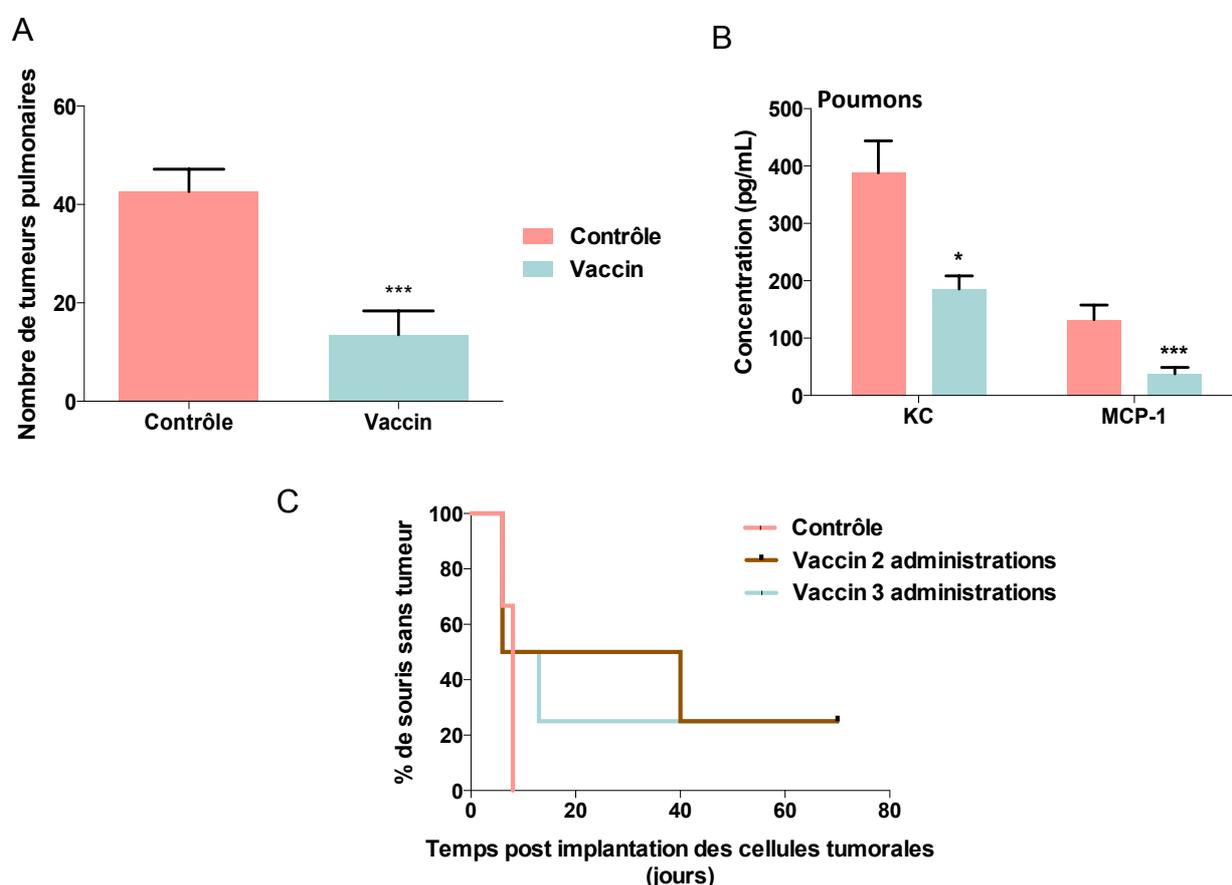


Figure 65 : Efficacité antitumorale du vaccin original contre des tumeurs pulmonaires (A et B) ou solides s.c. (C), après vaccination prophylactique nasale. (A) Nombre de tumeurs pulmonaires ; (B) Production de médiateurs ; (C) Pourcentage de souris ne développant pas de tumeurs. Des souris ont reçu 2 ou 3 administrations de vaccin (3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG) ou de tampon (contrôle) par voie nasale aux jours 0, 14 et 28, suivies, 7 jours après la dernière vaccination, d'une injection s.c. ou i.v. de cellules Renca-lacZ-ErbB2. Les résultats sont la moyenne ± SEM de n = 4-14 animaux par lot. Les différences de réponse entre les groupes vaccinés et le groupe contrôle ont été analysées statistiquement (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

Dans le cas de tumeurs s.c., seules 20% des souris ayant reçu 2 vaccinations n'avaient pas développé de tumeurs s.c., ce résultat étant non significatif par rapport aux souris non vaccinées (figure 65C). L'augmentation du nombre de vaccinations à 3 n'a pas permis d'améliorer ce résultat.

En conclusion, nos données ont montré une activité inflammatoire locale du vaccin original SUV/Ha/ErbB2/Pam₂CAG suite à son administration nasale, mais n'ont pas permis de conclure sur une activité immunostimulatrice systémique. Cependant, la vaccination prophylactique par cette voie a conduit à une efficacité antitumorale partielle contre des tumeurs pulmonaires, et ceci après seulement deux vaccinations contre trois dans le cas de la vaccination par voie respiratoire. Prises dans leur ensemble, ces données ont donc montré qu'atteindre la muqueuse nasale suffit à l'obtention d'une protection antitumorale locale, bien que partielle, mais ne permet pas une protection significative vis-à-vis de tumeurs distales sous-cutanées, justifiant une optimisation de notre construction.

Suite à ces résultats, les formulations de différents diamètres et structures ont été comparées. Dans ces expériences, seules l'activité immunostimulatrice locale et l'activité antitumorale contre des tumeurs pulmonaires en vaccination prophylactique ont été étudiées.

2.1.3. Influence du diamètre et de la structure du vecteur sur l'activité immunostimulatrice et l'efficacité antitumorale du vaccin

2.1.3.1. Activité immunostimulatrice locale

L'activité immunostimulatrice locale des constructions de type SUV, MLV et REV a été évaluée chez des souris ayant reçu une administration de vaccin à la dose de 3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG. Suivant l'expérience, les animaux ont été euthanasiés 24 h après l'administration du vaccin, ou 2, 6, 8, et 24 h après la vaccination, afin de réaliser une étude cinétique.

L'étude de l'activité des différentes préparations à 24 h a montré une augmentation significative de la concentration d'IL-6 pour les vaccins à base de SUV (415 pg/mL) et de REV (335 pg/mL) comparés au groupe contrôle ayant reçu du tampon (0 pg/mL), mais aucune augmentation par le vaccin MLV (figure 66A). Le même profil a été obtenu lors de la quantification de KC avec 195 et 155 pg/mL respectivement pour les vaccins à base de SUV

et REV comparés à 6 pg/mL pour le groupe contrôle. Le vaccin MLV a induit une production de KC, mais 3 à 4 fois plus faible que celle obtenue avec les autres préparations.

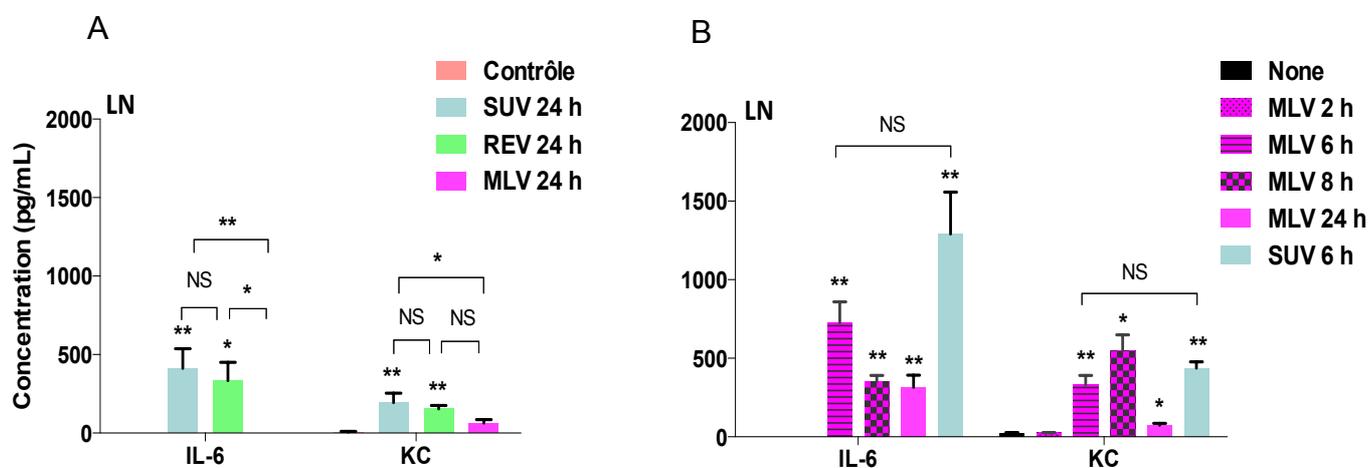


Figure 66 : Influence du diamètre et de la structure du vecteur sur l'activité immunostimulatrice locale du vaccin d'origine après administration nasale. (A) Etude comparative des vaccins à 24 h. L'IL-6 et KC ont été quantifiées dans les LN 24 h après une seule administration nasale de vaccin préparé à partir de SUV, REV ou MLV. Pour chaque préparation, la dose de vaccin administrée était de 3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG. Le groupe contrôle a reçu du tampon. (B) Etude cinétique sur le vaccin à base de MLV. L'IL-6 et KC ont été quantifiées dans les LN à différents temps (2, 6, 8, 18 et 24 h) après une administration nasale de préparation vaccinale à base de MLV (3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG). Parallèlement, un groupe de souris a reçu la préparation vaccinale à base de SUV à dose équivalente. Un groupe contrôle n'a reçu aucune injection. Les résultats sont la moyenne ± SEM de n = 4-5 animaux par lot. Les différences de réponse entre les groupes ont été analysées statistiquement (Non significatif (NS), **p* < 0,05, ***p* < 0,01 et ****p* < 0,001).

Ces premiers résultats suggéraient une différence d'activité entre d'une part, les liposomes SUV de diamètre moyen <100 nm et REV de diamètre moyen d'environ 220 nm, induisant à 24 h une réponse immunitaire locale similaire, et d'autre part, les liposomes MLV de grande taille ayant une activité de très faible intensité. Cette différence pourrait s'expliquer par un profil cinétique différent. C'est pourquoi, nous avons évalué l'activité immunostimulatrice de ces MLV au cours du temps. Les résultats de cette étude cinétique ont montré un profil de réponse identique à celui obtenu précédemment pour le vaccin à base de SUV. En effet, une augmentation de la production d'IL-6 et de KC au cours du temps avec un maximum à 6 h (725 pg/mL pour IL-6 et 340 pg/mL pour KC) et à 8 h (355 pg/mL pour IL-6 et 550 pg/mL pour KC), puis une diminution progressive jusqu'à 24 h a été observée (figure 68B). Nous avons également mis en évidence qu'à 6 h les quantités d'IL-6 et de KC produites n'étaient statistiquement pas différentes de celles obtenues avec le vaccin à base de SUV. De plus, cette activité immunostimulatrice locale était significativement différente comparée au groupe contrôle.

A l'inverse de notre première expérience à 24 h, où une très faible activité avait été obtenue, ces résultats de cinétique ont donc montré une activité significative du vaccin MLV. Cette divergence de résultat pourrait s'expliquer par une hétérogénéité de la taille de la préparation liposomique à base de MLV. Bien que la préparation soit composée de vésicules de grands diamètres allant de 500 à 1000 nm, elle renferme aussi un faible pourcentage de liposomes de petits diamètres dont la proportion est susceptible de varier selon les préparations.

2.1.3.2. Efficacité antitumorale

L'efficacité antitumorale des vaccins de différents diamètres et structures a été évaluée contre des tumeurs pulmonaires par la détermination du nombre de tumeurs et la quantification des médiateurs dans le tissu pulmonaire, dans le cadre d'une vaccination prophylactique. Pour cela, des souris ont reçu 2 administrations de vaccin, à la dose de 3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG, ou de tampon (contrôle), à 14 jours d'intervalle (J0 et J14), suivies 7 jours après la dernière vaccination d'une injection i.v. de cellules Renca-lacZ-ErbB2.

Les résultats ont montré une diminution du nombre de tumeurs d'environ 50% quel que soit le type de liposomes (figure 67A). Cette diminution était significative pour les vaccins à base de SUV (21 tumeurs) et de REV (19 tumeurs) par rapport au groupe contrôle (42 tumeurs). Par contre, bien que le nombre de tumeurs chez les souris ayant reçu le vaccin à base de MLV (20 tumeurs) était équivalent à celui des groupes SUV et REV, les données de ce groupe n'étaient pas significativement différentes de celles du groupe contrôle, probablement en raison d'une plus grande hétérogénéité des données. Malgré une baisse du nombre de tumeurs pulmonaires pour les différents types de vaccins, aucune diminution significative de la concentration en KC ou MCP-1 dans le tissu pulmonaire n'a été observée (figure 67B).

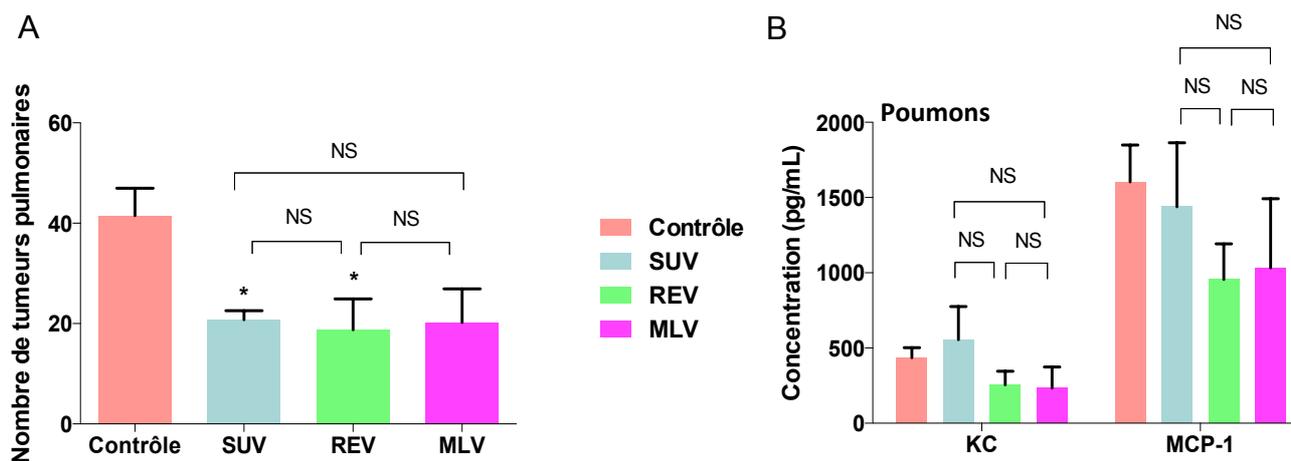


Figure 67 : Influence du diamètre et de la structure du vecteur sur l'efficacité antitumorale du vaccin d'origine contre des tumeurs pulmonaires, après vaccination nasale prophylactique. (A) Nombre de tumeurs pulmonaires ; (B) Concentration de KC et de MCP-1 dans le tissu pulmonaire. Des souris ont reçu 2 administrations de vaccin (à la dose de 3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG) ou de tampon, à 14 jours d'intervalle (J0 et J14), suivies 7 jours après la dernière vaccination d'une injection i.v. de cellules Renca-lacZ-ErbB2. Les résultats sont la moyenne ± SEM de n = 4-5 animaux par lot. Les différences de réponse entre les groupes ont été analysées statistiquement (NS, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

En conclusion, quels que soient leur diamètre et leur structure, toutes les constructions ont permis d'obtenir une activité immunostimulatrice locale et une efficacité antitumorale prophylactique significative, bien que partielle, sans qu'un type de liposome ne se démarque des autres.

Aussi, notre travail d'optimisation des formulations s'est poursuivi avec les constructions de type SUV, en raison du recul que nous avons sur ces constructions.

2.2. Optimisation de la dose vaccinale

Actuellement, en raison d'effets indésirables observés chez des patients, l'utilisation des adjuvants est très controversée. Ainsi, nous avons tenté d'optimiser la dose vaccinale. L'objectif était de déterminer la plus petite dose d'adjuvant et/ou de peptides permettant de conserver l'activité immunostimulatrice et l'efficacité antitumorale du vaccin d'origine.

Deux stratégies de diminution de la dose vaccinale ont été adoptées :

- la première a consisté à diminuer uniquement la dose d'adjuvant Pam₂CAG de 0,2% à 0,004%,
- la deuxième a porté sur la diminution des doses d'adjuvant et de peptides Ha et ErbB2, par dilution du vaccin.

Ce travail a donc nécessité la formulation de vaccins liposomiques SUV/Ha/ErbB2/Pam₂CAG contenant des proportions variables d'adjuvant.

2.2.1. Formulation de vaccins liposomiques contenant des proportions variables d'adjuvant

Des constructions vaccinales identiques aux constructions d'origine (SUV) ont été formulées en faisant varier les proportions de Pam₂CAG de 0,004% à 0,2% par rapport à la quantité de phospholipides totaux. Les proportions des autres composants PC/PG/Chol/DPGMal/Ha/ErbB2/Pam₂CAG étaient identiques à savoir : 75/20/50/5/1,25/1,25/0,004 à 0,2.

Ces constructions présentent une population monodisperse de distribution étroite et de diamètre inférieur à 100 nm avec un taux de couplage des peptides élevé ($\geq 80\%$) (tableau 9). Ainsi, la diminution de la quantité d'adjuvant n'affecte pas la taille et le taux de couplage des peptides comparé aux formulations d'origine à 0,2% de Pam₂CAG. Ces formulations ont été concentrées, afin de permettre l'administration de 3,5 μg d'ErbB2 dans 5 μL . Cette étape n'a pas modifié leurs caractéristiques.

Tableau 9 : Caractérisation des constructions vaccinales à base de liposomes SUV avec différentes proportions d'adjuvant.

Formulations	Conditions de couplage	Proportion de Ha+ ErbB2 (%)	Proportion de Pam ₂ CAG (%)	Diamètre moyen (nm) (% de la population)	PDI	Taux de fixation des peptides (%)
SUV/DPGMal/Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG (n = 2)	pH 6,5 3 h		0,2	62 \pm 9 (96%)	0,19	76
		2,5	0,04	71 \pm 16 (95 %)	0,2	86
			0,004	66 \pm 9 (96%)	0,2	80

2.2.2. Influence de la proportion d'adjuvant sur l'activité immunostimulatrice et l'efficacité antitumorale

L'activité immunostimulatrice locale des constructions contenant des proportions variables d'adjuvant a été évaluée chez des souris ayant reçu une administration de vaccin. Les préparations vaccinales contenaient une proportion molaire de Pam₂CAG de 0,2 (0,5 μg), 0,04 (0,1 μg) ou 0,004% (0,01 μg). Les quantités de peptides restaient identiques, c'est-à-dire

de 3,5 µg d'ErbB2 et 4,9 µg d'Ha. Sur la base des études cinétiques précédentes, les animaux ont été euthanasiés 6 h après l'administration des vaccins.

Comme le montre la figure 68, une augmentation significative d'IL-6 (de 660 à 1130 pg/mL) a été observée quelle que soit la proportion d'adjuvant dans le vaccin comparé aux animaux contrôles (270 pg/mL). Bien que la concentration d'IL-6 mesurée semblait d'autant plus faible que la proportion d'adjuvant diminuait, aucune différence significative n'a été observée entre les différents vaccins. Par contre, dans le cas de KC, seules les souris ayant reçu la dose habituelle d'adjuvant, c'est-à-dire 0,2%, présentaient un taux de cytokine élevé (800 pg/mL). Ce taux était significativement plus important que celui des contrôles (270 pg/mL), mais aussi des vaccins à 0,04% (320 pg/mL) et 0,004% (170 pg/mL) de Pam₂CAG.

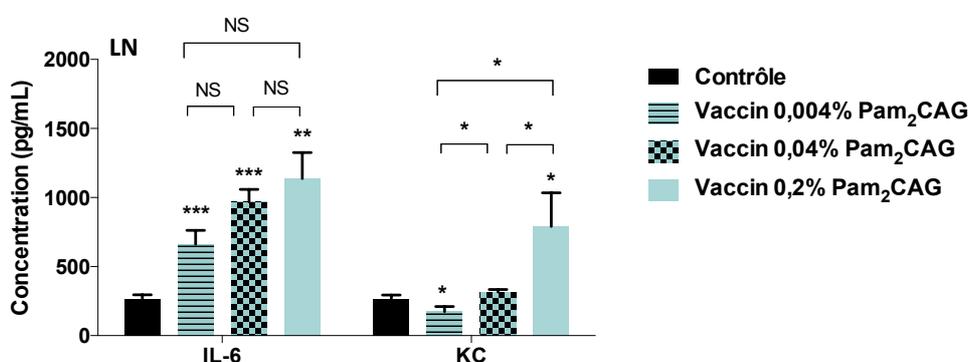


Figure 68: Influence de la proportion d'adjuvant Pam₂CAG sur l'activité immunostimulatrice locale du vaccin après vaccination nasale. L'IL-6 et KC ont été quantifiés dans les LN des souris 6 h après une administration nasale de préparations vaccinales contenant une proportion molaire de Pam₂CAG de 0,2 (0,5 µg) ; 0,04 (0,1 µg) ou 0,004% (0,01 µg). Les quantités de peptides restaient identiques, c'est-à-dire de 3,5 µg d'ErbB2 et 4,9 µg d'Ha. Les souris contrôles ont reçu du tampon. Les résultats sont la moyenne ± SEM de n = 4-5 animaux par lot. Les différences de réponse entre les groupes ont été analysées statistiquement (NS, **p* < 0,05, ***p* < 0,01 et ****p* < 0,001).

L'efficacité antitumorale des différents vaccins a été évaluée contre des tumeurs pulmonaires, dans le cadre d'une vaccination prophylactique. Pour cela, des souris ont reçu 2 administrations de vaccin ou de tampon (contrôle), à 14 jours d'intervalle (J0 et J14), suivies 7 jours après la dernière vaccination d'une injection i.v. de cellules Renca-lacZ-ErbB2. Les résultats ont montré une efficacité partielle, mais significative, pour la proportion d'adjuvant de 0,2% (21 tumeurs) comparé au groupe contrôle (42 tumeurs) (figure 69A). Une baisse du nombre de tumeurs a été observée pour les proportions de 0,04% (34 tumeurs) et 0,004% (19 tumeurs), mais cette baisse était statistiquement non différente par rapport au groupe contrôle. En effet, la diminution de la dose d'adjuvant semblait augmenter la variabilité intra-groupe comparée à la dose de référence où une réponse plus reproductible était observée.

Concernant les médiateurs (figure 69B), de manière surprenante, seule la proportion la plus faible d'adjuvant, c'est-à-dire celle de 0,004% a conduit à une diminution de concentration de ces médiateurs (195 pg/mL pour KC et 645 pg/mL pour MCP-1) par rapport au groupe contrôle (435 pg/mL pour KC et 1605 pg/mL pour MCP-1).

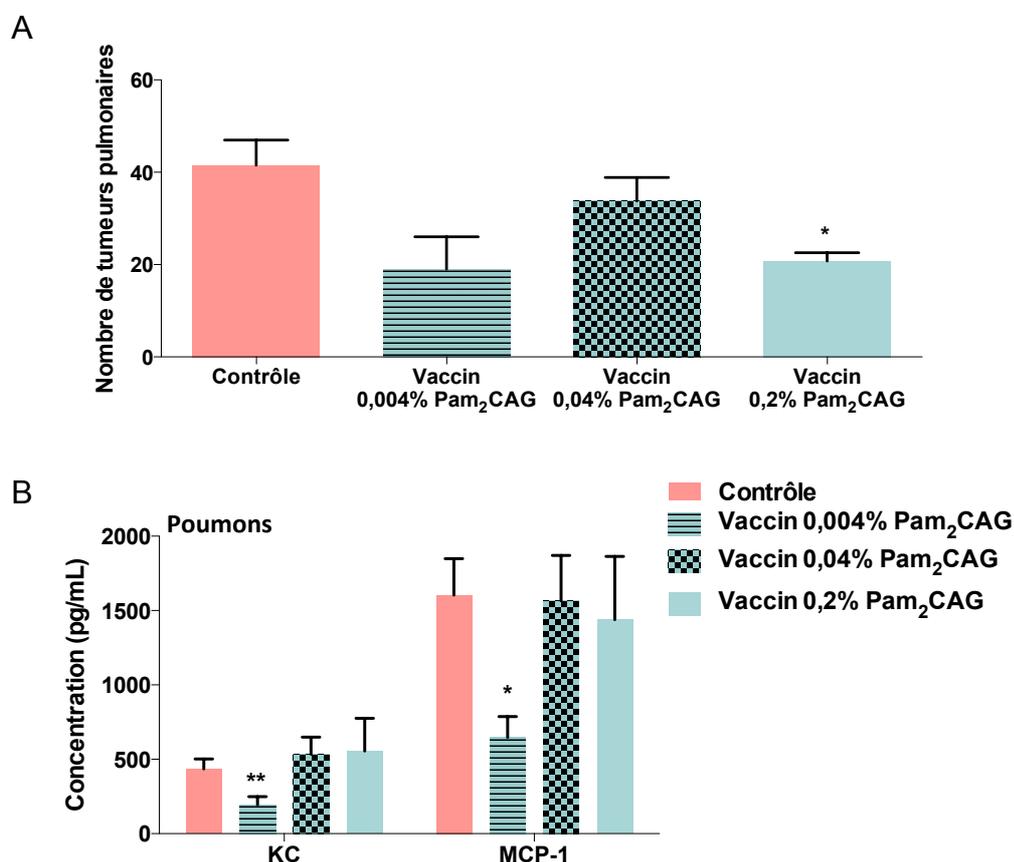


Figure 69 : Influence de la proportion d'adjuvant Pam₂CAG sur l'efficacité antitumorale du vaccin contre des tumeurs pulmonaires, après vaccination nasale prophylactique. (A) Nombre de tumeurs pulmonaires ; (B) Production de médiateurs pro-inflammatoires. Des souris ont reçu 2 administrations nasales de préparation vaccinale contenant une proportion molaire de Pam₂CAG de 0,2 (0,5 µg) ; 0,04 (0,1 µg) ou 0,004% (0,01 µg) à J0 et J14. Les quantités de peptides restaient identiques, c'est-à-dire de 3,5 µg d'ErbB2 et 4,9 µg d'Ha. Les souris contrôles ont reçu deux administrations de tampon. A J21, les cellules Renca-LacZ-ErbB2 ont été implantées en i.v.. Les résultats sont la moyenne ± SEM de n = 4-5 animaux par lot. Les différences de réponse entre les groupes et le contrôle ont été analysées statistiquement (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

2.2.3. Influence de la dose totale de vaccin sur l'activité immunostimulatrice locale et l'efficacité antitumorale

Afin d'étudier l'influence de la dose totale de vaccin, la dose habituellement utilisée (3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG) a été comparée à une dose 5 fois plus faible (0,7 µg d'ErbB2, 1 µg d'Ha et 0,1 µg de Pam₂CAG) par administration de 5 µL du

vaccin non concentré. Ainsi, les proportions de chacun des constituants sont restées identiques dans les 2 cas.

L'activité immunostimulatrice des deux doses de vaccin a été évaluée 6 h après une administration nasale. Une augmentation significative d'IL-6 a été observée dans les LN des souris vaccinées avec 1/5^{ème} de la dose habituelle (940 pg/mL) par rapport aux souris contrôles (270 pg/mL, figure 70). Cette réponse était comparable à celle obtenue (1135 pg/mL) avec la dose habituelle de vaccin (3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG). La dose réduite de vaccin a également conduit à une augmentation de la concentration en KC. Cette augmentation était également proche de celle induite par la dose habituelle de vaccin, mais toutefois non statistiquement significative par rapport au contrôle.

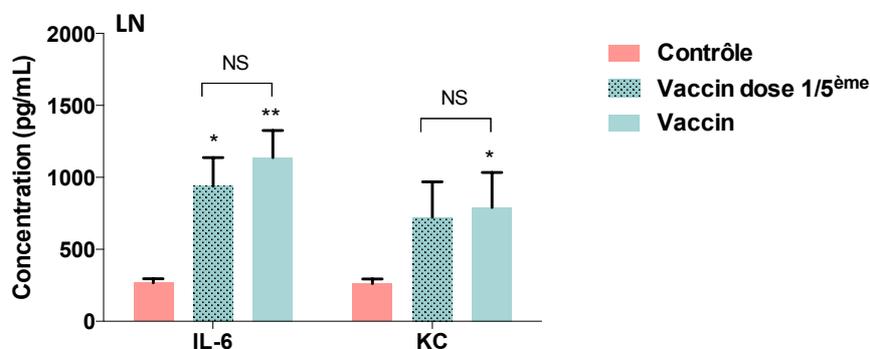


Figure 70 : Influence de la dose sur l'activité immunostimulatrice de vaccin après administration nasale. L'IL-6 et KC ont été quantifiées dans les LN des souris 6 h après une administration nasale de vaccin à une dose de 0,7 µg d'ErbB2, 1 µg d'Ha et 0,1 µg de Pam₂CAG ou une dose de 3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG. Les souris contrôles ont reçu du tampon. Les résultats sont la moyenne ± SEM de n = 10 animaux par lot. Les différences de réponse entre les groupes ont été analysées statistiquement (NS, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

L'efficacité antitumorale des deux doses de vaccin a été évaluée contre des tumeurs pulmonaires, dans le cadre d'une vaccination prophylactique. Pour cela, des souris ont reçu 2 administrations de vaccin ou de tampon (contrôle), à 14 jours d'intervalle (J0 et J14), suivies 7 jours après la dernière vaccination d'une injection i.v. de cellules Renca-lacZ-ErbB2. Malgré une activité immunostimulatrice locale du vaccin à la dose à 1/5^{ème}, exprimée par une augmentation de l'IL-6 et de KC dans les LN, aucune efficacité antitumorale prophylactique contre des tumeurs pulmonaires n'a été observée à cette dose de vaccin. En effet, aucune diminution notable du nombre de tumeurs pulmonaires (33 tumeurs pour les souris vaccinées contre 45 tumeurs pour les contrôles) ni de la concentration en KC ou MCP-1 dans le tissu pulmonaire n'a été observée pour cette dose, alors que la dose habituelle du vaccin a permis d'obtenir une efficacité antitumorale 70% significativement différente du contrôle et de la dose à 1/5^{ème} (figure 71).

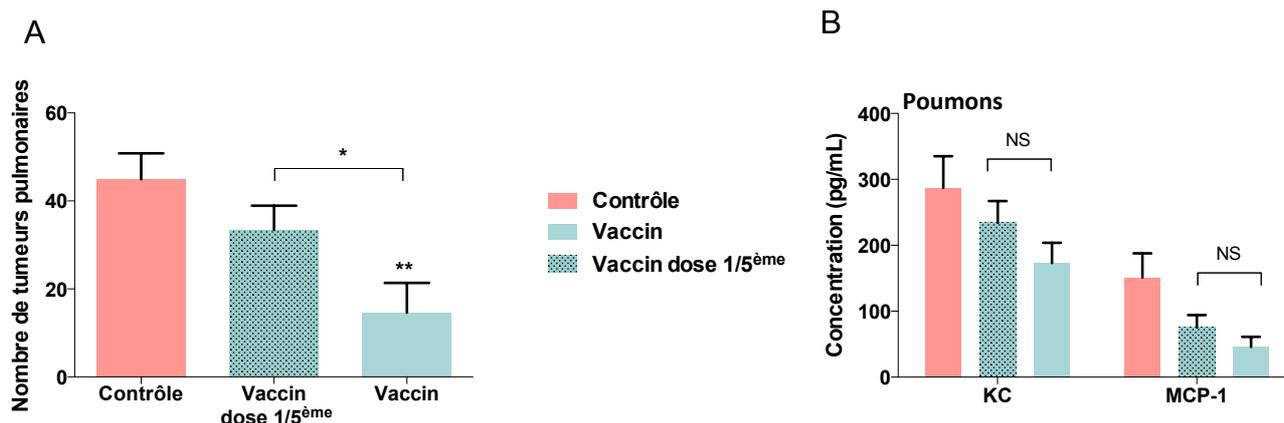


Figure 71 : Influence de la dose totale de vaccin sur l'efficacité antitumorale contre des tumeurs pulmonaires, après vaccination nasale prophylactique. (A) Nombre de tumeurs pulmonaires ; (B) Production de médiateurs. Des souris ont reçu 2 administrations nasales de vaccin à la dose habituelle (3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG) ou au 1/5^{ème} de cette dose (0,7 µg d'ErbB2, 1 µg d'Ha et 0,1 µg de Pam₂CAG) à J0 et J14. Des souris contrôles ont reçu deux administrations de tampon. A J21, les cellules Renca-LacZ-ErbB2 ont été implantées en i.v.. Les résultats sont la moyenne ± SEM de n = 10 animaux par lot. Les différences de réponse entre les groupes ont été analysées statistiquement (NS, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

En conclusion, ces données ont montré l'existence d'une relation entre la proportion en adjuvant et la réponse immunostimulatrice du vaccin au niveau nasal, sans toutefois de corrélation entre cette réponse immunostimulatrice et l'efficacité antitumorale. Ainsi, la proportion la plus faible en adjuvant ayant conduit à une faible réponse immunostimulatrice, s'est traduite par une efficacité antitumorale équivalente au vaccin d'origine. Par ailleurs, la diminution de la dose totale de vaccin a conduit à une perte d'efficacité antitumorale, mais sans baisse de la réponse immunostimulatrice locale. Ces données ont donc montré une absence de corrélation entre réponse immunostimulatrice et l'efficacité antitumorale. Elles suggèrent par ailleurs que les quantités d'adjuvant ne déterminent pas à elles seules la réponse immunostimulatrice du vaccin.

Ce travail d'optimisation de la dose vaccinale nous a permis de déterminer une dose de vaccin sans activité antitumorale. Suite à ces données, nous avons entrepris de modifier d'autres paramètres de formulation, dans le but notamment, de déterminer si ces paramètres pouvaient nous permettre de restaurer l'activité du vaccin dilué, ou augmenter celle du vaccin non dilué.

2.3. Couplage du peptide CMT2 sur les liposomes

Une des stratégies d'optimisation de notre vaccin a consisté à cibler les cellules M de l'épithélium nasal par le couplage sur nos liposomes du peptide MT2, ligand de la claudine-4,

exprimée par les cellules M et supposée agir, dans ces cellules, comme un récepteur d'endocytose favorisant la capture des antigènes particuliers.

2.3.1. Formulation de liposomes incorporant le CMT2

L'adjonction d'une cystéine au peptide MT2 en N-terminal (conduisant au peptide nommé CMT2) nous a permis d'envisager son couplage aux liposomes via l'ancre DPGMal. Nous souhaitons formuler des liposomes associant à la fois les épitopes peptidiques et le CMT2. C'est pourquoi, la proportion d'ancre a été augmentée de 5 à 7,5% (y compris pour les constructions ne contenant que du CMT2), afin de maintenir les proportions d'épitopes constantes par rapport aux formulations antérieures (1,25% chacun) et de pouvoir y ajouter 1,25% de CMT2. Des travaux antérieurs indiquent que la concentration maximale d'ancre pouvant être incorporée dans la bicouche des liposomes sans la déstabiliser est de l'ordre de 10%. La figure 72 représente la structure du vaccin correspondant, vectorisant les trois peptides. Dans cette figure, l'ancre DPGMal peut être remplacée par une ancre DPGBr.

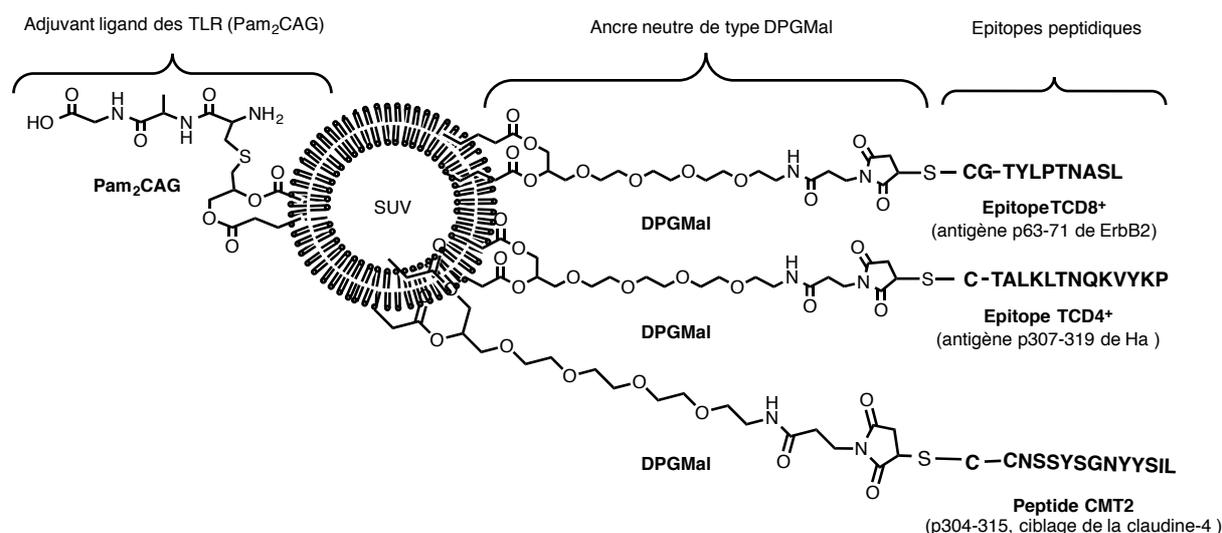


Figure 72 : Représentation schématique des constructions liposomiques multiépitopiques vectorisant les peptides Ha et ErbB2, l'adjuvant Pam₂CAG, ainsi que le CMT2. Dans ce schéma, les différents peptides sont couplés par l'intermédiaire de l'ancre DPGMal.

La première étape dans nos travaux de conception des constructions vaccinales a consisté à définir les conditions optimales de couplage du CMT2 aux liposomes contenant l'ancre DPGMal, en l'absence de tout autre peptide. Au cours de cette étude, nous avons fait varier, soit la proportion de peptide mise en contact avec les liposomes, soit le temps de contact.

* Dans un premier temps, le peptide CMT2 a été mis en contact avec des liposomes pendant 4 h en proportions croissantes comprises entre 1,25 et 3,75% molaire par rapport aux phospholipides, tout en maintenant la proportion d'ancre DPGMal à 7,5%. Le tableau 10, qui présente les caractéristiques des constructions ainsi obtenues, montre la présence de plusieurs populations de liposomes de taille variable, avec une population majoritaire (entre 61 et 81% des liposomes). Le diamètre moyen des liposomes de cette population majoritaire est homogène entre les lots, aux alentours de 60 nm, quelle que soit la proportion de CMT2. En revanche, l'indice de polydispersité des constructions qui reflète la distribution de taille des particules, croît avec la proportion de CMT2 mise en contact avec les liposomes. Ce diamètre n'est pas influencé par la présence du peptide puisque l'on n'observe aucune différence entre les liposomes blancs et les liposomes chargés en CMT2. De plus, le taux de fixation peptidique diminue de façon non négligeable (de 100 à 78%) lorsque la proportion de CMT2 augmente. Sur la base de ces résultats, nous avons choisi de garder pour la suite de notre travail les proportions de CMT2 de 1,25 et 2,5%, car celles-ci nous permettront d'incorporer des quantités suffisantes de CMT2 dans des constructions liposomales de taille homogène, inférieure à 100 nm avec un fort taux de fixation (100 et 91%).

Tableau 10 : Caractérisation des liposomes SUV vectorisant le peptide CMT2.

Formulations	Condition de couplage	Temps de contact (h)	Proportion de CMT2 (%)	Diamètre moyen (nm) (% de la population)	PDI	Taux de fixation de(s) peptide(s) (%)
SUV blancs	/	/	/	69 ± 12 (95%)	0,21	/
SUV/DPGMal/CMT2 (n = 1-2)	pH 6,5	4	1,25	59 ± 9 (81%)	0,29	100
			2,5	57 ± 8 (73%)	0,35	91
			3,75	62 ± 9 (61%)	0,38	78
SUV/DPGMal/CMT2 (n = 1-2)	pH 6,5	2 3 4 24	2,5	63 ± 8 (73%)	0,31	73
				135 ± 56 (80%)	0,36	91
				57 ± 9 (73%)	0,35	91
				71 ± 16 (64%)	0,39	82
SUV/DPGMal/CMT2/ Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG (n = 3-4)	pH 6,5	4	1,25	59 ± 9 (52%)	0,42	100
				Couplage simultané		
SUV/DPGBr/CMT2/ ErbB2/ Ha/Pam ₂ CAG (n = 3)	pH 9,0	1+ 3	1,25	78 ± 9 (63%)	0,53	100
				Couplage séquentiel		

* Dans un deuxième temps, le peptide CMT2 a été mis en contact avec les liposomes pendant des durées croissantes (2 à 24 h) pour une proportion fixe de CMT2 (2,5%). Le tableau 10 montre que la fixation du peptide est supérieure à 70%, quel que soit le temps de contact. Cependant, la taille des constructions varie avec le temps de contact. De façon surprenante, pour des temps de contact de 3 h, le diamètre moyen des constructions est supérieur à 100 nm. Seuls les temps de couplage de 2, 4 et 24 h conduisent à une population majoritaire dont le diamètre moyen est inférieur à 100 nm. Le temps de contact le plus faible (2 h) se traduit par un taux de couplage des peptides plus faible, et un contact de 24 h n'améliore ni la distribution de taille des constructions, ni le taux de couplage des peptides par rapport à un contact de 4 h.

Donc, le temps de couplage de 4 h a été retenu pour la suite de l'étude, car il nous permet d'obtenir une population de diamètre moyen inférieur à 100 nm avec un bon taux de fixation pour des proportions de CMT2 de 1,25 à 2,5%, ceci sur un temps relativement court.

Dans une deuxième étape, l'objectif était d'ajouter le peptide CMT2 à une formulation contenant également les peptides Ha et ErbB2 en présence d'adjuvant Pam₂CAG.

Pour ceci, deux stratégies de couplage du CMT2 ont été évaluées :

- mise en contact des 3 peptides simultanément pendant 4 h,
- mise en contact du CMT2 avec les liposomes fonctionnalisés pendant la 1^{ère} heure, suivie de l'ajout des peptides Ha et ErbB2, méthode de couplage séquentiel qui pourrait favoriser la fixation du CMT2.

Les formulations obtenues ont été comparées entre elles et aux formulations sans CMT2 (tableau 7 et 10). Les diamètres moyens des constructions sont similaires à ceux obtenus précédemment, donc la fixation des trois peptides ne vient pas modifier ce paramètre. Pour les deux stratégies de couplage, les indices de polydispersité supérieurs à 0,3 nous indiquent une distribution de taille polydisperse, mais avec un couplage efficace des peptides (100 % de fixation). Il semble cependant que la stratégie d'ajout des peptides de façon séquentielle permette d'obtenir une proportion de liposomes de diamètre moyen inférieur à 100 nm plus importante que l'ajout concomitant des trois peptides (63% en contact séquentiel comparé à 52% en contact simultané). Donc, pour la suite des formulations, cette stratégie de couplage séquentiel a été retenue.

A ce stade, nous étions capables de conjuguer le peptide CMT2 à des constructions vaccinales ayant déjà démontré leur intérêt en vaccination. Cependant, toutes les formulations obtenues présentaient des indices de polydispersité plus importants et une population majoritaire beaucoup plus faible, que ceux observés dans nos travaux antérieurs. Jusqu'à présent, nous avons appliqué avec succès cette technique de couplage à des peptides solubles en milieu aqueux. Or, la séquence peptidique du CMT2 fait qu'il est moins soluble ce qui pourrait expliquer cette hétérogénéité de diamètre des constructions. C'est pourquoi, dans la suite de nos travaux, nous avons tenté de coupler le CMT2 à pH basique, pH pour lequel le peptide présente une meilleure solubilité. Ce couplage a été réalisé par l'utilisation de l'ancre DPGBr, adaptée à un couplage à pH 9,0. Dans ces expériences, le couplage des peptides s'est fait de façon séquentielle.

Comme le montrent les résultats présentés dans le tableau 10, le couplage avec l'ancre DPGBr à pH 9,0 a permis d'obtenir une population majoritaire de liposomes plus importante (84%) mais qui n'atteint pas les valeurs proches de 95% obtenues avec les autres peptides. L'indice de polydispersité de 0,26 indique une monodispersité de la population. Cependant, le taux de couplage peptidique a largement diminué dans ces conditions, passant de 100% à 63%. C'est pourquoi l'ancre DPGBr n'a pas été retenue pour la suite des travaux.

2.3.2. Influence de l'incorporation du peptide CMT2 sur l'efficacité du vaccin

Afin d'évaluer l'apport de l'incorporation du peptide CMT2 au vaccin, nous avons souhaité, dans un premier temps, vérifier la capacité de ciblage du peptide CMT2 *in vitro*. Dans un second temps, nous avons évalué l'apport du CMT2 à l'efficacité antitumorale du vaccin *in vivo*.

2.3.2.1. Evaluation de l'activité de ciblage du peptide CMT2 *in vitro*

Pour évaluer la capacité de ciblage du peptide CMT2 *in vitro*, nous avons eu recours à deux lignées cellulaires connues pour former des jonctions serrées et pour développer une résistance électrique transépithéliale (TEER) lors de leur culture en monocouches sur des inserts, les lignées Calu-3 et Caco-2. L'activité de ciblage du peptide CMT2 a été évaluée par mesure de la capacité du peptide CMT2 à induire une baisse de la TEER de monocouches de ces lignées. En effet, une baisse de la TEER traduit une altération des jonctions serrées,

altération qui dans notre cas, pourrait résulter d'une interaction du peptide CMT2 avec la claudine-4, qui participe à la formation des jonctions serrées. Ainsi, des monocouches de cellules Calu-3 ou Caco-2 ayant développé une TEER maximale ont été incubées en présence de 100 µg/mL de CMT2 en solution ou couplé à des liposomes, et la TEER a été mesurée au cours du temps.

Les résultats ont montré une baisse de 40% de la TEER des monocouches de cellules Calu-3 et Caco-2 après 4 h de contact avec 100 µg/mL de peptide CMT2 en solution, ajouté au pôle apical des cellules (figure 73). Dans le cas des cellules Caco-2, cette baisse à 4 h était statistiquement significative par rapport au temps 0 h, mais aussi par rapport au contrôle négatif sans peptide. A 24 h, les valeurs de TEER tendaient à remonter ce qui pourrait résulter d'un rétablissement des jonctions serrées et montrer la réversibilité du phénomène. A noter toutefois, que dans ces conditions expérimentales, le CMT2 couplé aux liposomes n'a induit aucune baisse de TEER (données non présentées).

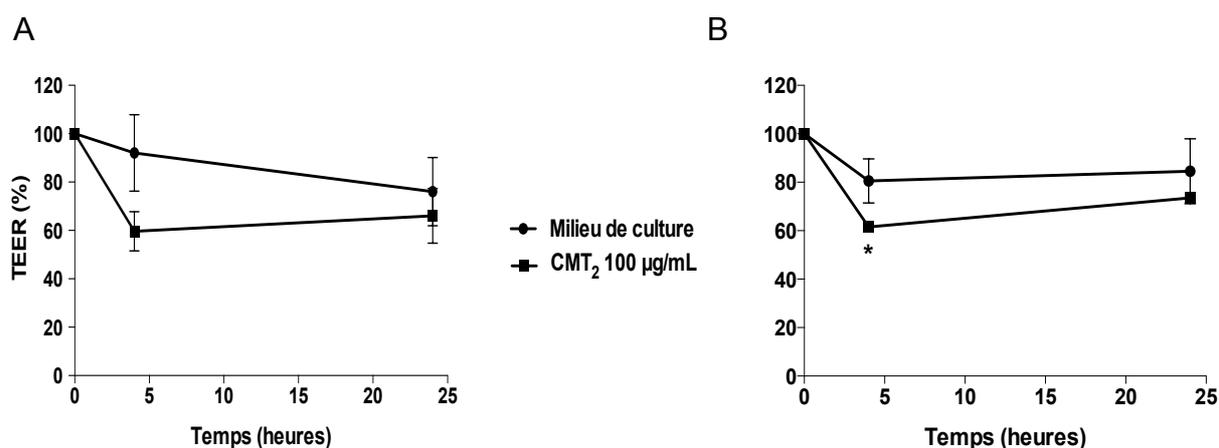


Figure 73 : Evaluation de l'activité de ciblage du peptide CMT2 *in vitro* par mesure de son impact sur la TEER de monocouches cellulaires en culture. Des cellules Calu-3 (A) ou Caco-2 (B) ont été cultivées sur inserts le temps nécessaire à l'obtention d'une TEER maximale. Le peptide CMT2, en solution, à raison de 100 µg/mL a été ajouté dans le compartiment apical des inserts, et la TEER a été mesurée au cours du temps (0, 4 et 24 h). Des inserts contrôles n'ont pas été mis en contact avec le peptide. La TEER mesurée aux différents temps a été exprimée en pourcentage de la valeur initiale. Les résultats sont la moyenne ± SEM de 2 à 6 inserts. Les différences de réponse à différents temps ainsi que les différences entre les cellules seules et les cellules en contact du CMT2 ont été analysées statistiquement (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

En conclusion, ces expériences *in vitro* nous ont permis de mettre en évidence une activité du peptide CMT2. Aussi, nous avons inclus ce peptide dans nos constructions, afin d'évaluer son apport à l'efficacité du vaccin. A noter que cette construction, baptisée SUV/CMT2/Ha/ErbB2/Pam₂CAG, contenait 0,9 µg de CMT2, pour 0,7 µg d'ErbB2, 1 µg d'Ha et 0,1 µg de Pam₂CAG, c'est-à-dire pour 5 fois moins d'épitopes Ha et ErbB2 et

d'adjuvant que dans le vaccin habituel. L'idée dans ce choix de dose vaccinale était de déterminer si l'ajout du CMT2 pouvait permettre de restaurer l'activité du vaccin dilué.

2.3.2.2. Apport du CMT2 à l'efficacité antitumorale du vaccin dilué

L'efficacité antitumorale du vaccin contenant le CMT2 a été évaluée contre des tumeurs pulmonaires, dans le cadre d'une vaccination prophylactique. Lors de ces expériences, trois vaccins ont été évalués en parallèle :

- le vaccin habituel administré à la dose de 3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG
- le vaccin contenant le CMT2 avec 5 fois moins d'épitopes Ha et ErbB2 et d'adjuvant que dans le vaccin habituel, soit 0,9 µg de CMT2, pour 0,7 µg d'ErbB2, 1 µg d'Ha et 0,1 µg de Pam₂CAG,
- le vaccin sans CMT2 avec 5 fois moins d'épitopes Ha et ErbB2 et d'adjuvant que dans le vaccin habituel, soit 0,7 µg d'ErbB2, 1 µg d'Ha et 0,1 µg de Pam₂CAG.

Les souris ont reçu 2 administrations de vaccin ou de tampon (contrôle), à 14 jours d'intervalle (J0 et J14), suivies 7 jours après la dernière vaccination d'une injection i.v. de cellules Renca-lacZ-ErbB2.

Contrairement à ce que pouvait le laisser espérer les résultats *in vitro*, aucune amélioration de l'efficacité antitumorale n'a été apportée par cette nouvelle construction vaccinale. En effet, comme le montre la figure 74A, les souris vaccinées avec la préparation liposomique contenant du CMT2 présentaient autant de tumeurs pulmonaires (26 tumeurs) que les souris vaccinées avec la même préparation sans CMT2 (30 tumeurs). De même, aucune diminution significative des médiateurs pro-inflammatoires n'a été constatée suite à l'ajout de CMT2 (figure 74B). Dans les mêmes conditions expérimentales, le vaccin original à la dose habituelle (3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG) a permis une protection totale, avec une diminution significative des tumeurs et médiateurs par rapport aux souris contrôles, mais aussi par rapport aux souris ayant reçu les autres préparations vaccinales.

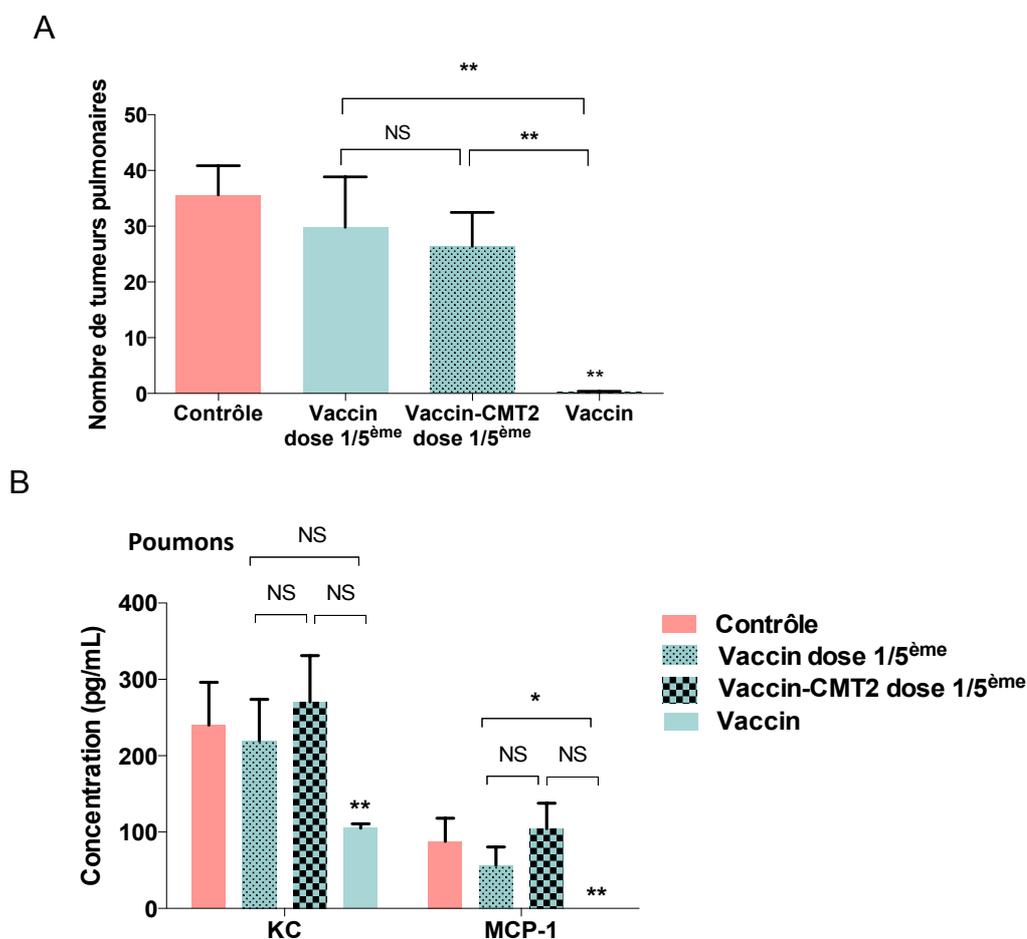


Figure 74 : Apport du CMT2 à l'efficacité antitumorale du vaccin contre des tumeurs pulmonaires, après vaccination nasale prophylactique. (A) Nombre de tumeurs pulmonaires ; (B) Concentration de médiateurs dans le tissu pulmonaire. Des souris ont reçu 2 administrations nasales de la construction vaccinale contenant en plus d'ErbB2, Ha et Pam₂CAG, le peptide CMT2, à J0 et J14. La quantité de peptides et d'adjuvant par dose de vaccin était de 0,9 µg de CMT2, 0,7 µg d'ErbB2, 1 µg d'Ha et 0,1 µg de Pam₂CAG. Parallèlement, des souris ont reçu le vaccin sans CMT2 à la dose habituelle (3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG) ou au 1/5^{ème} de la dose habituelle (0,7 µg d'ErbB2, 1 µg d'Ha et 0,1 µg de Pam₂CAG). Des souris contrôles ont reçu deux administrations de tampon. A J21, les cellules Renca-LacZ-ErbB2 ont été implantées en i.v.. Les résultats sont la moyenne ± SEM de n = 5 animaux par lot. Les différences de réponse entre les groupes ont été analysées statistiquement (NS, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

En conclusion, malgré un ciblage de la claudine-4 exprimé par une diminution de TEER *in vitro*, aucun apport du MT2 n'a été observé *in vivo*. En effet, l'ajout du peptide aux liposomes n'a pas permis une amélioration de l'efficacité antitumorale du vaccin d'origine dilué au 1/5^{ème}. Ces résultats nous ont alors orienté vers d'autres stratégies d'optimisation, mais en travaillant dans ce cas non plus sur un vaccin dilué mais sur un vaccin pur. En effet, ces travaux sur le CMT2 nous ont conduit à nous demander si la dose vaccinale diluée, n'induisant aucune protection, n'était pas, au final, trop faible.

2.4. Augmentation de la viscosité

Une stratégie afin d'augmenter l'efficacité de notre vaccin d'origine non dilué a été de tenter d'augmenter son temps de contact avec la muqueuse nasale. Pour cela, nous avons choisi d'augmenter sa viscosité.

2.4.1. Formulation du gel vaccinal

Afin d'augmenter la viscosité de notre vaccin, nous avons incorporé à nos formulations vaccinales des gélifiants celluloseux classiquement utilisés dans les préparations pharmaceutiques pour la voie nasale. Ainsi, des préparations vaccinales contenant de la CMC ou de l'HPMC à des concentrations comprises entre 0,5 et 2 % (P/V) ont été préparées.

Dans un premier temps, nous avons formulé des gels de liposomes blancs. D'après le tableau 11, l'incorporation de 0,5 ou 1% (P/V) de CMC ou d'HPMC n'a modifié ni le diamètre moyen ni la distribution du diamètre de ces liposomes. Nous avons également préparé des préparations liposomales contenant 2% (P/V) de gélifiant qui n'ont pas pu être caractérisées en raison de leur viscosité excessive. Ainsi, nous pouvons atteindre une proportion de gélifiant de 1% (p/v) tout en conservant l'intégrité des préparations liposomiques.

Tableau 11 : Caractérisation des liposomes blancs SUV en gel de CMC ou d'HPMC.

Formulations	Proportion de CMC (%)	Proportion de HPMC (%)	Diamètre moyen (nm) (% de la population)	PDI
SUV sans peptide, ni ancre, ni adjuvant (n = 1)	0		65 ± 10 (95%)	0,19
	0,5		73 ± 21 (95 %)	0,21
	1		67 ± 15 (93%)	0,21
	2		/	/
		0,5	63 ± 9 (95%)	0,19
		1	65 ± 9 (97%)	0,17
		2	/	/
SUV/DPGMal Non concentré (n = 1)	0	1	68 ± 9 (91%)	0,20
SUV/DPGMal Concentré (n = 1)	0	1	69 ± 15 (95%)	0,19

Dans un second temps, notre travail a consisté à préparer des gels de liposomes SUV incorporant 5% de DPGMal, concentrés ou non. Comme on peut le constater, l'ajout de DPGMal n'influe pas sur le diamètre moyen et sa distribution (tableau 11). Ces travaux nous ont permis de déterminer la proportion idéale de gel à incorporer aux vaccins complets et de déterminer les conditions de formulation.

Dans un troisième temps, notre objectif a été d'introduire 1% (P/V) de gélifiant dans des préparations vaccinales contenant les peptides ErbB2, Ha, ainsi que l'adjuvant Pam₂CAG. A ce jour, seul l'HPMC a été testé. Suite à son introduction dans la préparation vaccinale, nous conservons une population liposomale majoritaire (93%) de diamètre inférieur à 100 nm avec un indice de polydispersité de 0,21 (tableau 12). De même, le taux de fixation des peptides obtenu reste inchangé (82%). Ces résultats nous ont permis de déduire qu'il est possible de préparer des gels vaccinaux à base de liposomes.

Tableau 12 : Caractérisation de gel vaccinal à base de liposomes SUV à partir du gélifiant HPMC.

	Conditions de couplage	Proportion d'HPMC (%)	Proportion d'Ha+ ErbB2 (%)	Diamètre moyen (nm) (% de la population)	PDI	Taux de fixation des peptides (%)
Avant l'ajout d'HPMC (n = 1)	pH 6,5 3 h	0	2,5	65 ± 13 (92%)	0,12	82
Après l'ajout d'HPMC (n = 1)	pH 6,5 3 h	1	2,5	68 ± 15 (93%)	0,21	82

2.4.2. Influence de la viscosité sur l'activité immunostimulatrice du gel vaccinal

L'activité immunostimulatrice locale du gel vaccinal contenant 1% (P/V) d'HPMC a été caractérisée et comparée à celle des liposomes en gel sans peptide ni adjuvant (contrôle négatif), mais aussi à celle de notre construction de référence, c'est-à-dire le vaccin original. La dose de vaccin avec ou sans gel était de 3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG. Les souris ont été euthanasiées 6, 24 ou 48 h après une vaccination nasale, afin d'établir la cinétique de réponse du gel vaccinal, qui pourrait être modifiée en raison de l'augmentation de viscosité de la formulation.

L'analyse des LN sur les 48 h suivant l'immunisation nasale a montré une cinétique de réponse du gel vaccinal semblable à celle du vaccin sans gel (figure 75). En effet, une

réponse optimale avec une augmentation significative de la concentration d'IL-6 (1600 pg/mL) et de KC (1350 mg/mL), par rapport aux concentrations obtenues pour les liposomes en gel sans peptide ni adjuvant, a été observée 6 h après l'administration du gel vaccinal. Ensuite, cette réponse a progressivement diminué à 24 h où seule la concentration de KC (160 pg/mL) était encore significativement importante, pour disparaître totalement au bout de 48 h. De plus, bien que nous ayons constaté une réponse immunostimulatrice du gel vaccinal à 6 et 24 h, cette réponse est restée statistiquement non différente de celle obtenue avec le vaccin sans gel.

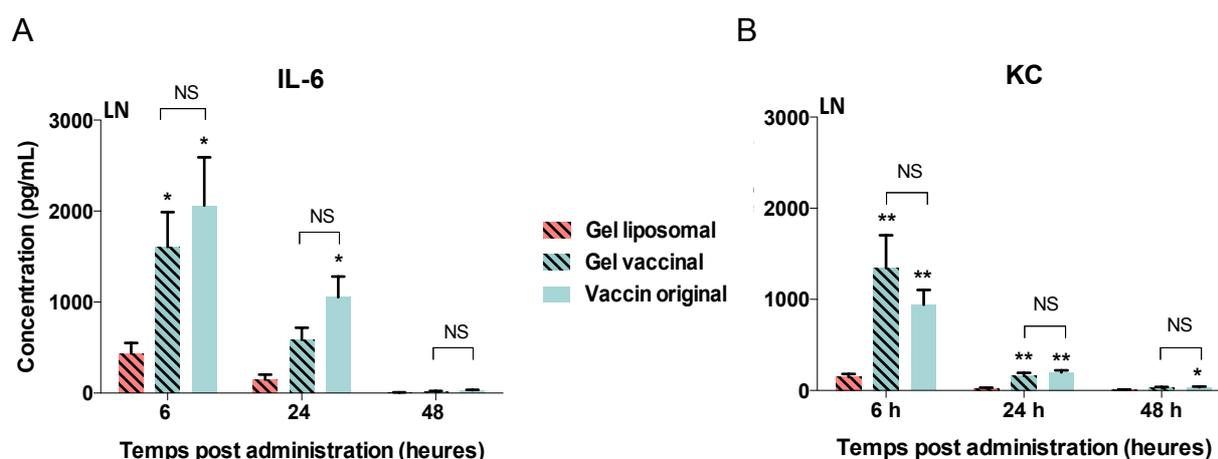


Figure 75 : Activité immunostimulatrice locale du gel vaccinal après administration nasale. L'IL-6 (A) et KC (B) ont été quantifiés dans les LN 6, 24 et 48 h après une administration nasale de gel vaccinal contenant 1% (P/V) d'HPMC. Des souris ont reçu le vaccin original sans gel comme contrôle positif. Dans chaque cas, la dose de vaccin administrée était de 3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG. Des souris ont reçu des liposomes en gel sans peptide ni adjuvant comme contrôle négatif. Les résultats sont la moyenne ± SEM de n = 5 animaux par lot. Les différences de réponse entre les groupes ont été analysées statistiquement (NS, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

Ainsi, la formulation d'un gel vaccinal n'a pas modifié la réponse immunostimulatrice locale induite par le vaccin, aussi bien en intensité que dans le temps. Suite à ces résultats, nous n'avons pas jugé opportun de conduire une étude d'efficacité antitumorale.

2.5. Incorporation de 1,2-dipalmitoylgalloyl glycérol ou DPGG

Une seconde stratégie envisagée pour favoriser le contact de la construction originale SUV/Ha/ErbB2/Pam₂CAG avec la muqueuse nasale a été l'incorporation du lipide DPGG (1,2-dipalmitoylgalloylglycérol) dans les préparations vaccinales. En effet, ce lipide possède des propriétés d'adhésion aux protéines et aux membranes biologiques (Pollastri et al., 2000).

2.5.1. Formulation du vaccin

Afin d'évaluer la faisabilité de son incorporation dans les bicouches des liposomes, nous avons commencé par formuler des liposomes SUV blancs contenant 5, 10 ou 20% de DPGG. La proportion de DPGG ajoutée a été retranchée à la proportion de PG utilisée dans les formulations.

Comme le montre le tableau 13, les liposomes avec DPGG présentent les mêmes caractéristiques que des liposomes blancs sans DPGG. Ils ont une population monodisperse avec un diamètre moyen inférieur à 100 nm et un indice de polydispersité inférieur à 0,3. Néanmoins, pour la préparation contenant 20% de DPGG, une augmentation de diamètre moyen de 30 nm environ est constatée, de même qu'une viscosité excessive. Ainsi, la plus forte proportion de DPGG qui a été retenue pour la suite des préparations est celle de 10%.

La deuxième étape de notre démarche a consisté à inclure 5% d'ancre DPGMal à des liposomes blancs contenant 10% de DPGG. L'ajout de DPGMal n'a impacté ni la taille ni la distribution de la population liposomale (tableau 13), qu'il s'agisse des formulations concentrées ou non.

Tableau 13 : Caractérisation des liposomes blancs SUV contenant du DPGG dans leur bicouche, en l'absence de peptides.

Formulations	Proportion de DPGG (%)	Diamètre moyen (nm) (% de la population)	PDI
SUV sans peptide, ni ancre, ni adjuvant (n = 1)	0	58 ± 9 (96%)	0,19
	5	60 ± 10 (93 %)	0,20
	10	63 ± 26 (100%)	0,21
	20	86 ± 11 (97%)	0,19
SUV/DPGMal Non concentré (n = 1)	10	70 ± 10 (97%)	0,17
SUV/DPGMal Concentré (n = 1)	10	70 ± 11 (96%)	0,18

Dans un troisième temps, sur ces liposomes préformés, ont été couplés les peptides Ha et ErbB2. Comme le montre le tableau 14, les liposomes ainsi obtenus présentaient une population majoritaire (95%) de diamètre moyen de 71 nm avec un indice de polydispersité de 0,19, indiquant une distribution monodisperse. Le taux de couplage était de 82%. Après concentration (5 fois) des constructions, ces différents paramètres n'ont pas été modifiés de

manière significative. Ainsi, nous avons pu préparer des liposomes vaccinaux avec ce nouveau lipide.

Tableau 14 : Caractérisation des constructions vaccinales à base des liposomes SUV contenant du DPGG dans leur composition.

Formulations	Conditions de couplage	Proportion de DPGG (%)	Proportion de Ha+ ErbB2 (%)	Diamètre moyen (nm) (% de la population)	PDI	Taux de fixation des peptides (%)
SUV/DPGMal/Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG (n = 6)	pH 6,5 3 h	0	2,5	64 ± 9 (96%)	0,19	88
SUV/DPGG/DPG Mal/Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG Non concentré (n = 2)	pH 6,5 3 h	10	2,5	71 ± 11 (95%)	0,19	82
SUV/DPGG/DPG Mal/Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG Concentré (n = 2)	pH 6,5 3 h	10	2,5	74 ± 11 (95%)	0,19	84

2.5.2. Influence de l'incorporation de DPGG sur l'activité immunomodulatrice du vaccin

L'activité immunostimulatrice locale induite par le vaccin incorporant 5 ou 10% de DPGG a été caractérisée, et comparée à celle de liposomes sans peptide ni adjuvant contenant la plus forte proportion de DPGG, c'est-à-dire 10% (contrôle négatif), ainsi qu'à celle du vaccin original. L'IL-6 et KC ont été quantifiés dans les LN des souris 6 h après une administration nasale des différentes formulations vaccinales à la dose de 3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG.

Une augmentation des concentrations d'IL-6 et/ou de KC a été observée pour les 2 vaccins incorporant du DPGG (figure 76). Cependant, seules les augmentations de KC étaient significativement différentes de celle observée avec les liposomes contrôles (600 pg/mL et 700 pg/mL pour les vaccins à 5 et 10% de DPGG contre 200 pg/mL pour les liposomes sans peptide ni adjuvant contenant 10% de DPGG). De plus, les augmentations d'IL-6 et de KC induites par les 2 vaccins incorporant du DPGG étaient plus faibles que celles induites par le vaccin original sans DPGG. En effet, pour ce dernier vaccin, les concentrations en IL-6 (3680 pg/mL) et KC (960 pg/mL) induites étaient nettement plus élevées, et significativement

différentes de celles obtenues avec les liposomes sans peptide ni adjuvant contenant 10% de DPGG.

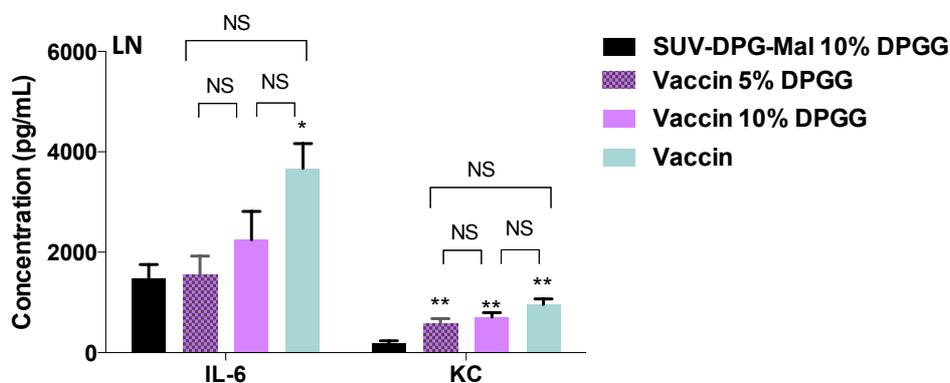


Figure 76 : Influence de l'incorporation de DPGG sur l'activité immunostimulatrice locale du vaccin après administration nasale. Deux vaccins contenant des proportions de DPGG de 10 ou 5 % ont été comparés au vaccin d'origine. Parallèlement, des animaux ont reçu des liposomes sans peptide ni adjuvant contenant 10% de DPGG, servant de contrôles négatifs. L'IL-6 et KC ont été quantifiés dans les LN des souris 6 h après une administration nasale des différentes formulations vaccinales à la dose équivalente à 3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG. Les résultats sont la moyenne ± SEM de n = 5 animaux par lot. Les différences de réponse entre les groupes ont été analysées statistiquement (NS, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

Ainsi, l'incorporation de DPGG n'a pas permis d'augmenter la réponse immunostimulatrice locale du vaccin. Suite à ces résultats, nous n'avons pas jugé opportun de conduire une étude d'efficacité antitumorale.

2.6. Vaccin à base de liposomes ultra-déformables ou transfersomes

Du fait de leur structure ultra-déformable, les transfersomes pourraient franchir plus facilement les espaces intercellulaires de l'épithélium nasal, et donc plus facilement accéder aux NALT. Nous avons donc préparé et évalué des vaccins à base de liposomes ultra-déformables.

2.6.1. Formulation des transfersomes vaccinaux

Pour la formulation des transfersomes, nous avons utilisé la méthode de Cevc (Cevc et al., 1998). Dans cette formulation, la PC de jaune d'œuf est remplacée par de la PC de soja (SPC) qui est solubilisée dans une solution organique de chloroforme/méthanol 9/1. Le film lipidique obtenu après évaporation de cette solution sous vide est réhydraté en présence d'éthanol et de déoxycholate de sodium. Les MLV ainsi obtenus sont extrudés pour conduire aux SUV.

Nous avons tout d'abord formulé des transfersomes sans peptide ni adjuvant, contenant du DPGMal. Comme le montre le tableau 15, ces transfersomes présentent une seule population de 58 nm de diamètre avec un indice de polydispersité de 0,11.

Tableau 15 : Caractérisation des préparations à base de transfersomes SUV.

	Formulations	Condition de couplage	Temps de contact (h)	Proportion de Ha+ ErbB2 (%)	Diamètre moyen (nm) (% de la population)	PDI	Taux de fixation des peptides (%)
Transfersomes blancs (n=1)	SUV/DPGMal	/	/	/	58 ± 8 (100%)	0,11	/
Transfersomes contenant l'adjuvant (n=2)	SUV/DPGMal /Pam ₂ CAG	/	/	/	72 ± 8 (100%)	0,09	/
Transfersomes complets (n=2)	SUV/DPGMal/ Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG	pH 6,5	3	2,5	63 ± 8 (100%)	0,08	71
Transfersomes complets, concentrés 5 fois (n=2)	SUV/DPGMal/ Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG	pH 6,5	3	2,5	62 ± 8 (98%)	0,15	77

Dans un second temps, nous avons formulé des transfersomes contenant en plus du DPGMal, l'adjuvant Pam₂CAG. Puis, ces transfersomes préformés ont été mis en contact avec les peptides Ha et ErbB2 en solution pendant 3 h. Comme le montre les résultats du tableau ci-dessus, le vaccin à base de transfersomes garde les mêmes caractéristiques que les transfersomes sans peptide, ainsi que les vaccins à base de liposomes classiques. En effet, 100% de la population présente un diamètre moyen de 63 nm avec un indice de polydispersité très faible de 0,08. Le taux de couplage des peptides est de 71% sans modification significative de la taille des vésicules. Après l'étape de concentration, le diamètre et la distribution des vésicules ne sont pas été modifiés. Une légère augmentation du taux de couplage considérée comme négligeable est observée. Ces transfersomes ont été congelés en présence de 10% (P/V) de cryoprotecteur (contre 4% d'habitude). Ils ont conservé leurs caractéristiques de diamètre et de taux de couplage après décongélation à température ambiante (données non présentées). La présence d'un agent tensio-actif dans la formulation augmente la flexibilité de la membrane de ces liposomes au détriment de leur

stabilité (Cevc and Blume, 1992). C'est sans doute la raison pour laquelle plus de cryoprotecteur a été nécessaire pour leur congélation.

2.6.2. Evaluation de l'activité immunostimulatrice du vaccin à base de transfersomes

Afin d'évaluer l'activité immunostimulatrice du vaccin à base de transfersomes, l'IL-6 et KC ont été quantifiés dans les LN de souris 6 h après une administration nasale du vaccin à la dose de 3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG. Parallèlement, un groupe de souris a reçu le vaccin original aux mêmes doses de peptides et d'adjuvant, servant de référence. Le groupe contrôle négatif a reçu des transfersomes avec l'ancre mais sans peptide ni adjuvant.

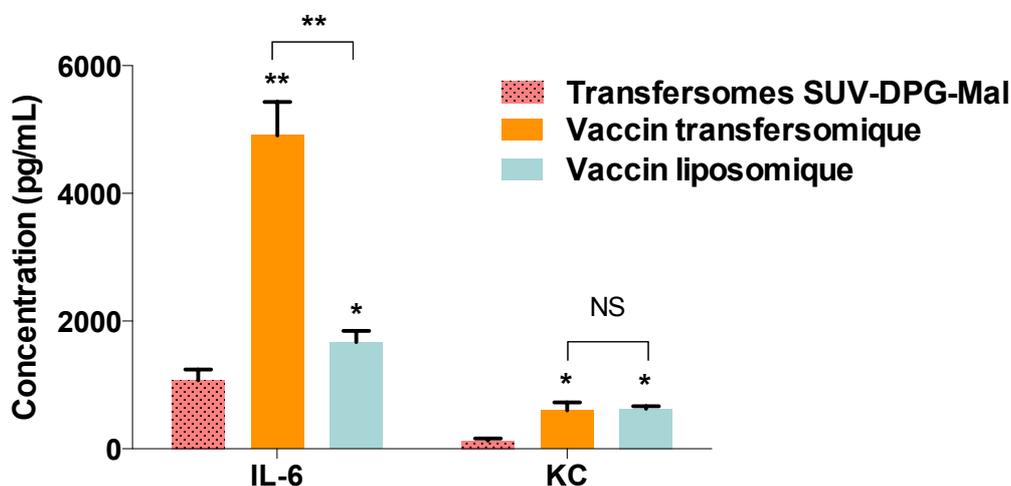


Figure 77 : Activité immunostimulatrice locale après administration nasale du vaccin à base de transfersomes. L'IL-6 et KC ont été quantifiés dans les LN 6 h après une administration nasale du vaccin à base de transfersomes à la dose de 3,5 µg d'ErbB2, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG. Parallèlement, un groupe de souris a reçu le vaccin original aux mêmes doses de peptides et d'adjuvant, servant de référence. Le groupe contrôle négatif a reçu des transfersomes sans peptide ni adjuvant. Les résultats sont la moyenne ± SEM n = 5 animaux par lot. Les différences de réponse entre les groupes ont été analysées statistiquement (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

Les résultats ont montré une production très importante d'IL-6 dans les LN des souris vaccinées avec les transfersomes (4900 pg/mL), ceci par rapport aux souris contrôles (1070 pg/mL) qui ont reçu des transfersomes sans peptide ni adjuvant, mais surtout par rapport aux animaux ayant reçu le vaccin original (1670 pg/mL) dans les mêmes conditions expérimentales (figure 77). Ainsi, cette forte réponse n'est pas due à une réaction non spécifique causée par un composant de la membrane des transfersomes. Une augmentation de KC a également été observée avec le vaccin à base de transfersomes par rapport aux transfersomes sans peptide ni adjuvant. Toutefois, aucune différence notable n'a été mise en évidence entre le vaccin à base de transfersomes et le vaccin original.

Discussion

Si l'on se réfère à la littérature, l'immunothérapie antitumorale est en pleine expansion, et la vaccination en particulier est une des stratégies envisagées. L'intérêt des vecteurs nanoparticulaires dans ce cadre est évident, mais ces vecteurs demeurent essentiellement exploités pour vectoriser des protéines. Les vaccins peptidiques dans la vaccination antitumorale présentent pourtant de multiples atouts comme leur spécificité, leur simplicité de fabrication et la possibilité de réaliser des constructions entièrement synthétiques. La technologie des nanoparticules et la notion de vaccin peptidique a conduit notre laboratoire à développer des vaccins peptidiques antitumoraux nanoparticulaires à base de liposomes. Il s'agit d'un concept innovant qui a fait ses preuves en vaccination antitumorale par voie sous-cutanée. Notre travail a eu pour objectif d'évaluer l'intérêt de ces constructions en vaccination par voie respiratoire ou nasale.

1. Préparation des constructions vaccinales

1.1. Formulation des vecteurs liposomiques

Cette étude a impliqué la formulation de différents types de liposomes. Il existe de nombreuses **méthodes de formulation** des liposomes qui peuvent être classées en fonction du mode de dispersion des phospholipides dans la phase aqueuse (Benoît et al., 2007). Dans nos travaux, ces nanovecteurs ont été formulés à partir de la méthode basée sur la solubilisation des phospholipides dans un solvant organique, l'évaporation de ce solvant et l'hydratation du film lipidique formé, suivies soit d'une sonication pour l'obtention de **petits liposomes unilamellaires (SUV)**, soit d'une extrusion pour la préparation de **transfersomes**. Cette technique conduit à **des liposomes de type MLV**, de grands diamètres hétérogènes et multilamellaires, lorsqu'on s'affranchit de l'étape de sonication. Lors de la formulation des transfersomes, l'étape de sonication, qui ne permettait pas d'homogénéiser correctement les transfersomes MLV et conduisait à deux populations de diamètres différents, a été remplacée par une étape d'extrusion, pour conduire à des transfersomes SUV présentant un diamètre moyen et une distribution de taille similaires aux liposomes « classiques ». Pour l'obtention de **liposomes uni- ou oligo-lamellaires de grand diamètre**, nous avons utilisé un procédé spécifique basé sur l'évaporation en phase inverse et conduisant à des REV. Le tableau 16 résume les caractéristiques physicochimiques des formulations ayant fait l'objet d'une évaluation biologique.

Tableau 16 : Résumé des caractéristiques physicochimiques des formulations ayant fait l'objet d'une évaluation biologique. Lorsque plusieurs lots d'une même formulation ont été évalués, les données correspondent à un lot représentatif.

Vaccin d'origine		Diamètre moyen (nm) (% de la population)	PDI	Taux de fixation des peptides (%)
SUV blancs	SUV	69 ± 12 (94%)	0,19	/
SUV	SUV/DPGMal/Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG	64 ± 9 (96%)	0,19	88

Adjuvant Pam₂CAG

Pam ₂ CAG 0,2%	SUV/DPGMal/Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG	62 ± 9 (96%)	0,19	76
Pam ₂ CAG 0,04%	SUV/DPGMal/Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG	71 ± 16 (95 %)	0,20	86
Pam ₂ CAG 0,004%	SUV/DPGMal/Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG	66 ± 9 (96%)	0,20	80

Diamètre et structure

REV	REV/DPGMal/Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG	231 ± 55 (97%)	0,18	70
MLV	MLV/DPGMal/Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG	ND*	ND*	77

Ciblage claudine

SUV-CMT2	SUV/DPGMal/CMT2/Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG	78 ± 9 (63%)	0,53	100
----------	---	--------------	------	-----

Gel

SUV dans 1% d'HPMC	SUV/DPGMal/Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG	68 ± 15 (93%)	0,21	82
--------------------	--	---------------	------	----

DPGG

SUV avec 10 % de DPGG	SUV/DPGMal/Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG	74 ± 11 (95%)	0,19	84
-----------------------	--	---------------	------	----

Transfersomes

Transfersomes	SUV/DPGMal/Ha/ErbB2/Pam ₂ CAG	62 ± 8 (98%)	0,15	77
---------------	--	--------------	------	----

ND : non déterminé

La technique de formulation des SUV, qui a fait l'objet de la majorité de ce travail, est simple et rapide à mettre en œuvre, même si elle est difficilement industrialisable dans la mesure où elle implique plusieurs étapes par opposition aux procédés de formulation de liposomes en continu, comme l'injection d'éthanol ou d'isopropanol (Benoît et al., 2007; Gentine et al., 2013; Gentine et al., 2012). Les SUV sont obtenus de façon reproductible (tableau 16), y compris lorsque leur composition de base diffère (proportion d'adjuvant, présence de DPGG). Ils présentent des diamètres inférieurs à 100 nm avec une distribution étroite (les coefficients de variation sont de 15% en moyenne). Ils sont majoritairement monodisperses (PDI <0,3). Dans les travaux antérieurs du laboratoire exploitant ces SUV, ce procédé a été utilisé avec succès pour la formulation de différents vaccins bi-épitopes antibactériens ou antitumoraux utilisés essentiellement par voie sous-cutanée (Roth et al., 2005; Thomann et al., 2011). Ce procédé de formulation est souvent critiqué pour ses faibles taux d'encapsulation (Benoît et al., 2007). Cependant, dans notre stratégie de conception de vaccins liposomiques, les molécules actives ne sont pas encapsulées, comme c'est très

souvent le cas, mais présentées à la surface du vecteur. De plus, le faible diamètre des liposomes SUV obtenus est un atout incontestable, car il conduit à une grande surface spécifique favorisant le couplage des molécules d'intérêt et les interactions avec le milieu biologique. Toutefois, il semblerait que l'incorporation des SUV dans le gel augmente la distribution de leur diamètre (CV = 22%). Par ailleurs, comme attendu les REV présentent des diamètres supérieurs aux SUV avec une distribution relativement large (CV=24%).

1.2. Couplage des peptides aux liposomes

Les peptides ont été couplés aux liposomes par la formation d'une liaison covalente entre une cystéine présente dans leur séquence et la fonction maléimide d'une molécule amphiphile incorporée dans la bicouche phospholipidique des liposomes. Il s'agit d'une méthode douce réalisée en milieu aqueux, particulièrement adaptée aux applications biologiques que nous envisageons (Schelte et al., 2000). Dans nos travaux, les taux de fixation des peptides par rapport à l'ancre disponible sont élevés (>70%), homogènes et reproductibles pour toutes les formulations. De plus, ce couplage n'a jamais modifié la distribution de taille des formulations liposomiques (tableau 16). Ce résultat est probablement lié au fait que nous avons choisi d'utiliser une technique qui consiste à coupler les peptides sur des liposomes préformés, de compositions différentes, mais très homogènes d'un point de vue physicochimique avant couplage. Ce procédé s'applique parfaitement aux peptides présentant une cystéine dans leur séquence (ou après ajout d'une cystéine) et solubles en milieu aqueux. C'est le cas des épitopes ErbB2 et Ha utilisés dans ce projet. En revanche, nous attribuons les difficultés de couplage que nous avons rencontrées avec le peptide CMT2 à la faible solubilité de celui-ci. En effet, les peptides dérivés de la CPE sont généralement peu solubles dans des solvants aqueux (Suzuki et al., 2012; Takahashi et al., 2011; Uchida et al., 2010). Pour cette raison, le couplage du peptide CMT2 aux liposomes représentait une difficulté, d'autant qu'il n'a jamais été rapporté dans la littérature. Néanmoins, après une adaptation de protocole, ce procédé a pu être appliqué et a conduit à un taux de couplage de 100%. Par ailleurs, l'étude du CMT2 nous a conduit pour la première fois à envisager l'association de trois peptides différents à la surface des liposomes. Ceci a été réalisé avec succès grâce à une méthode séquentielle. A noter toutefois, que le couplage peptidique basé sur l'incorporation d'une ancre fonctionnalisée dans la bicouche phospholipidique des liposomes ne permet pas d'augmenter indéfiniment les quantités de peptides. En effet, il est alors nécessaire d'augmenter la proportion d'ancre, ce qui, au-delà de 10% d'ancre, déstabilise les membranes liposomiques (données du laboratoire non publiées).

1.3. Autres étapes de formulations

Pour l'administration des vaccins par voie nasale, les différentes formulations devaient être concentrées. Différents procédés de concentration des liposomes sont utilisés, tels que l'évaporation de la phase aqueuse et de lyophilisation. Cependant, ces derniers se traduisent par une concentration de tous les composants des liposomes, y compris le véhicule, qui dans notre cas était le tampon Hepes 10 mM-sorbitol 5% (P/V). Afin d'éviter l'augmentation de la concentration osmotique, la technique de concentration basée sur la centrifugation en présence d'un filtre retenant les liposomes a été retenue. Ce procédé n'a jamais modifié les propriétés physicochimiques des différentes formulations liposomiques.

La congélation des constructions est indispensable pour leur utilisation. En effet, il n'est pas possible de réaliser l'ensemble des constructions de façon extemporanée, en considérant que toutes les étapes de formulation et de caractérisation nécessitent plusieurs jours. Nous avons montré que cette congélation, réalisée en présence d'un cryoprotecteur, n'a pas d'influence sur les caractéristiques physicochimiques des vaccins, si elle n'est suivie que d'une seule décongélation.

Les transfersomes ont été préparés à partir de PC de soja, de déoxycholate de sodium et d'éthanol. La PC de soja est composée de 70% d'acide linoléique qui présente une température de transition de phase inférieure à 0° C. Cette faible température de transition de phase contribue à la fluidité de la membrane des transfersomes (Kumavat et al., 2013). Le déoxycholate de sodium, un détergent anionique, s'insère entre les phospholipides et augmente la fluidité membranaire (Honeywell-Nguyen and Bouwstra, 2005; Prasanthi and Lakshmi, 2012). L'éthanol contribue également à la fluidité membranaire. De part cette composition, les transfersomes étaient susceptibles d'être plus sensibles aux étapes de concentration et de congélation. Si cela n'a pas eu de conséquence sur l'étape de la concentration, cela a nécessité en revanche, d'augmenter la proportion de cryoprotecteur lors de la congélation à 10% pour maintenir les caractéristiques initiales de nos transfersomes.

En conclusion, dans ces travaux de formulation nous avons mis à profit la versatilité des liposomes pour préparer de multiples constructions vaccinales. La stratégie de formulation que nous avons utilisée est particulièrement robuste, puisque les caractéristiques physicochimiques de l'ensemble des préparations évaluées *in vivo* sont semblables, quelle que soit la composition des vaccins liposomiques (proportion d'adjuvant, présence de gel, DPGG, CMT2...) (tableau 16). Ainsi, après mise au point des conditions optimales, l'étape de formulation n'a pas été un facteur limitant pour la suite de nos travaux.

2. Evaluation biologique des vaccins

Le tableau 17 résume l'ensemble des données sur l'activité et l'efficacité des vaccins évalués *in vivo* chez la souris. Ces données sont discutées ci-dessous.

Tableau 17 : Résumé des résultats de l'évaluation biologique des vaccins *in vivo*.

	Vaccins *	Réponse immunitaire		Tumeurs pulmonaires §		Tumeurs sous-cutanées #	
		Locale §	Systemique	Vaccination prophylactique	Vaccination thérapeutique	Vaccination prophylactique	Vaccination thérapeutique
Vaccination respir.	SUV - 1	Oui	Oui	Protection totale (100%)	Protection partielle (77%)	Protection totale (100%)	Vaccination thérapeutique (0%)
	Aucune			Protection partielle (50 à 100%)**	/	Pas de protection significative (20%)	/
Vaccination nasale	SUV - 1	Oui	Non	Protection partielle (55%)	/	/	/
	Aucune			Protection partielle (52%)	/	/	/
	REV - 1	Oui →	/	Protection partielle (20%)	/	/	/
	Diamètre et structure	Oui →	/	Protection partielle (54%)	/	/	/
	MLV - 1	Oui →	/	Pas de protection significative (16 à 26%)**	/	/	/
	Diamètre et structure	Oui →	/	Pas de protection significative (26%)	/	/	/
	SUV / 0,04% Pam ₂ CAG - 1	Oui →	/	Protection partielle (16 à 26%)**	/	/	/
	Adjuvant	Oui →	/	Protection partielle (26%)	/	/	/
	SUV / 0,004% Pam ₂ CAG - 1	Oui →	/	Pas de protection significative (16 à 26%)**	/	/	/
	Adjuvant	Oui →	/	Pas de protection significative (26%)	/	/	/
	SUV - 1/5	Oui →	/	Pas de protection significative (16 à 26%)**	/	/	/
	Dose totale de vaccin	Oui →	/	Pas de protection significative (26%)	/	/	/
	SUV / CMT2 - 1/5	/	/	Pas de protection significative (26%)	/	/	/
	Ciblage des cellules M	/	/	Pas de protection significative (26%)	/	/	/
	SUV - 1	Oui →	/	Pas de protection significative (26%)	/	/	/
	Gel vaccinal	Oui →	/	Pas de protection significative (26%)	/	/	/
	SUV / DPGG - 1	Oui →	/	Pas de protection significative (26%)	/	/	/
	Temps de contact	Oui →	/	Pas de protection significative (26%)	/	/	/
	Transfèresomes - 1	Oui →	/	Pas de protection significative (26%)	/	/	/

* Vaccins : sauf indiqué, la composition du vaccin est celle du vaccin d'origine ; Dose I pour 3,5 µg d'ErbB₂, 4,9 µg d'Ha et 0,5 µg de Pam₂CAG ou dose 1/5 pour 0,7 µg d'ErbB₂, 1 µg d'Ha et 0,1 µg de Pam₂CAG ; Optimisation : selon indication

§ Les flèches précèdent si la réponse était équivalente (→), augmentée (↑) ou diminuée (↘) comparée à celle obtenue avec le vaccin d'origine

Les pourcentages indiquent le % de réduction du nombre de tumeurs

** Ce vaccin a été évalué plusieurs fois dans différentes expériences

2.1. Evaluation du vaccin d'origine

Dans une première partie de notre travail d'évaluation de l'activité biologique de nos vaccins, nous avons cherché à faire la preuve de concept de l'efficacité de la construction d'origine SUV/Ha/ErbB2/Pam₂CAG par voie respiratoire et nasale. Ces travaux nous ont permis de montrer **un intérêt certain de nos constructions, mais également des voies respiratoire et nasale** pour la vaccination antitumorale à visée locale et distale.

Par voie respiratoire, une réponse immunostimulatrice locale et une réponse immunitaire systémique a été observée en réponse au vaccin d'origine. Par cette voie, une protection totale a été obtenue contre des tumeurs pulmonaires, aussi bien après vaccination prophylactique que vaccination thérapeutique. Enfin, une protection totale a également été obtenue contre des tumeurs solides s.c. après vaccination prophylactique, bien qu'en vaccination thérapeutique le vaccin n'ait eu aucun effet (tableau 17). Si l'on compare ces résultats à ceux obtenus au laboratoire avec la même construction, la voie respiratoire, en vaccination prophylactique, est donc aussi efficace que la voie sous-cutanée (Roth et al., 2005; Thomann et al., 2011). Par ailleurs, **ce travail est l'un des premiers** démontrant l'activité antitumorale d'un vaccin peptidique nanoparticulaire administré dans le tractus respiratoire. Le seul vaccin peptidique antitumoral à base de nanoparticules décrit à ce jour pour une vaccination par voie respiratoire est un vaccin composé de nanocapsules lipidiques encapsulant un peptide dérivé de l'antigène OVA. Ce vaccin administré par voie intratrachéale a permis d'induire une réponse antitumorale cytotoxique conduisant au rejet total de tumeurs s.c. suite à une vaccination thérapeutique (Li et al., 2013). Cette étude, en accord avec la nôtre, montre que la vaccination par voie respiratoire à l'aide de vaccins peptidiques est capable de protéger de tumeurs à distance. D'autres études de vaccination antitumorale par voie respiratoire sont rapportées dans la littérature, mais elles concernent des vaccins nanoparticulaires à ADN ou ARN (Phua et al., 2014; Zhou et al., 2010). Dans l'étude de Phua et collaborateurs (2014), des lipoplexes d'ARNm, administrés par instillation nasale à raison de 2 x 15 µL, ont retardé la progression d'une tumeur s.c. dans un modèle d'immunisation prophylactique et thérapeutique. Dans l'étude de Zhou et collaborateurs (2010), le vaccin à ADN, qui se distribuait à la fois dans le nez et les poumons (volume d'injection de 18 µL), inhibait presque totalement le développement de tumeurs pulmonaires chez la souris suite à une vaccination prophylactique. Sans que les modèles animaux et les vaccins soient comparables, nos résultats en terme de protection antitumorale sont similaires

à ceux obtenus par ces équipes.

En vaccination respiratoire thérapeutique, nous avons obtenu une efficacité partielle (77%) contre des tumeurs pulmonaires, mais aucune efficacité contre des tumeurs solides s.c., alors qu'en vaccination prophylactique une protection totale a été obtenue pour les deux types de tumeurs. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'en vaccination thérapeutique, les souris reçoivent deux administrations du vaccin contre trois en vaccination prophylactique. Une explication plus probable est liée à l'existence d'un délai nécessaire à la mise en place de la réponse immunitaire, notamment au niveau systémique. Ainsi, dans le cas d'une vaccination prophylactique, la réponse immunitaire, aussi bien locale que systémique, a eu largement le temps de se mettre en place avant que les cellules tumorales soient injectées aux souris, alors qu'en vaccination thérapeutique, les cellules tumorales Renca-Lac-Z-ErbB2, très invasives et agressives, ont eu le temps de s'organiser et de se développer avant que n'intervienne cette réponse. Cette hypothèse concorde avec les résultats obtenus en vaccination s.c. par l'équipe de David I. Stott dans un modèle de souris transgéniques développant spontanément des tumeurs mammaires surexprimant ErbB2 (Mukhopadhyay et al., 2014). En effet, ces auteurs ont montré que l'immunisation prophylactique de ces souris avec une protéine de fusion préparée à partir de la protéine ErbB2 murine inhibe totalement le développement de tumeurs, alors que la vaccination thérapeutique est totalement inefficace. Ces auteurs ont alors conclu sur la nécessité d'une immunisation précoce pour limiter la progression tumorale.

L'évaluation du vaccin **par administration strictement nasale** a montré qu'atteindre la muqueuse nasale se traduit par une activité inflammatoire locale du vaccin et suffit à l'obtention d'une protection, bien que partielle (50-100%), contre des tumeurs pulmonaires. En revanche, dans les conditions expérimentales utilisées, l'administration nasale du vaccin n'a permis aucune réponse immunitaire systémique ou protection significative contre des tumeurs distales s.c. (tableau 17). L'efficacité contre les tumeurs pulmonaires pourrait s'expliquer par la mise en place d'une réponse mucoale. Les cellules immunitaires activées par le vaccin au niveau de la muqueuse nasale (site inducteur) vont migrer vers le poumon (site effecteur) pour inhiber le développement tumoral. En revanche, l'efficacité contre les tumeurs solides s.c., nécessite probablement la mise en place d'une réponse systémique qui n'a pas été induite par l'immunisation nasale, contrairement à la vaccination respiratoire (tableau 17). Ces résultats semblent en contradiction avec la littérature où l'immunisation

nasale est décrite pour induire à la fois une réponse mucoale et une réponse systémique (Davis, 2001; Pires et al., 2009). Par exemple, l'équipe de Nair (2014) a montré qu'il est possible d'induire une réponse systémique spécifique par l'administration nasale de nanoparticules associant un ARNm codant pour un antigène modèle et un agent de transfection (Phua et al., 2014). De même, les auteurs ont montré qu'il existe une réponse antitumorale partielle contre des tumeurs s.c., aussi bien en prophylactique qu'en thérapeutique, suite à la vaccination « nasale ». Cependant, lorsque l'on s'attarde sur le volume de vaccin administré aux souris, on constate que ce volume était de 30 μL (deux administrations de 15 μL). Dans une autre étude, il est rapporté que l'administration nasale de 50 μL de vaccin liposomique encapsulant l'ovalbumine permet d'obtenir une réponse immunitaire locale et systémique (Wang et al., 2013). Il s'agit là de deux exemples parmi tant d'autres. En effet, la majorité des auteurs utilisent lors des instillations dites « nasales » des volumes d'administration au-delà de 5 μL . Ces auteurs réalisent probablement ainsi une vaccination respiratoire, plutôt qu'une vaccination strictement nasale. En effet, lors de la mise au point de notre méthode d'administration nasale, nous avons constaté qu'un volume de 5 μL (2,5 μL /narine) permettait de cibler uniquement le nez, alors que les volumes de 10 et 25 μL se distribuaient dans la cavité buccale, la trachée et même jusqu'aux poumons (uniquement à 25 μL). Par ailleurs, on sait que la cavité nasale de la souris occupe un volume d'environ 35 μL , *i.e.* 570 fois plus petit que celui de la cavité nasale de l'Homme (15-20 mL) (Gross et al., 1982; Pires et al., 2009). Or, chez l'Homme, les vaccins par voie nasale sont généralement administrés dans un volume de 0,2 mL. Ainsi, si l'on devait respecter les proportions, le volume correspondant pour une vaccination nasale chez la souris devrait être de 0,35 μL , ce qui n'est pas techniquement réalisable. Ainsi, la réponse systémique et la protection contre des tumeurs s.c. observées dans les études précédemment citées pourraient s'expliquer par l'administration d'un volume de vaccin ne ciblant pas que le nez. En faveur de cette hypothèse et de nos données, une étude réalisée chez le mouton a rapporté qu'une vaccination contre le virus de la grippe, à l'aide d'ISCOMATRIX[®], par administration pulmonaire permettait d'obtenir une réponse immune locale et systémique, alors qu'une vaccination nasale conduisait uniquement à une réponse locale. En effet, suite à cette vaccination, aucune réponse n'a été détectée dans les ganglions régionaux et les vaisseaux lymphatiques des animaux. Ces auteurs concluaient leur travail en suggérant que l'induction d'une réponse immunitaire au niveau du poumon devrait être davantage explorée pour la vaccination contre des maladies nécessitant une immunité à la fois locale et systémique (Vujanic et al., 2012b).

2.2. Optimisation du vaccin d'origine dans le cadre d'une administration nasale

Suite à la mise en évidence d'une activité partielle de notre vaccin par voie nasale, nous avons tenté d'optimiser cette activité en faisant varier sa composition, ainsi que différents paramètres physicochimiques. En effet, bien que l'administration nasale ne nous ait pas permis d'obtenir une réponse systémique, dans l'objectif d'une utilisation chez Homme, elle a l'avantage d'être plus facile à mettre en œuvre que l'administration pulmonaire, notamment en termes de dispositifs d'administration et d'accessibilité pour le patient.

Une première étape dans ce travail a été d'étudier **l'influence du diamètre et de la structure** des liposomes sur les réponses obtenues. Quels que soient leur diamètre et leur structure, toutes les constructions ont permis d'obtenir une activité immunostimulatrice locale et une efficacité antitumorale prophylactique significative, bien que partielle, contre des tumeurs pulmonaires, sans toutefois qu'un type de liposome ne se démarque des autres (tableau 17). Dans la littérature, l'impact du **diamètre** et de la **structure** des particules sur la réponse immunitaire est largement documenté. Ces paramètres peuvent effectivement influencer la capture des particules par les cellules, et en particulier les CD (Altin and Parish, 2006; Foged et al., 2005; Joshi et al., 2012; Manolova et al., 2008). On peut imaginer qu'ils impactent également la distribution des particules au niveau de la muqueuse nasale. Dans le cas des liposomes, la structure (unilamellaire ou multilamellaire) et la taille ($<$ ou >100 nm) sont des paramètres ayant montré un impact important dans le cadre de la vaccination (Watson et al., 2012). Toutefois, ces travaux ont concerné essentiellement des vaccins protéiques modèles (OVA) ou antibactériens, et des voies d'administration autres que la voie respiratoire. Dans leur ensemble, ces travaux ont montré que des diamètres compris entre 250 et 700 nm favorisent la persistance des particules au niveau du site d'injection et orientent la réponse immunitaire vers un profil Th1 (Watson et al., 2012). Selon l'étude de Bhowmick et collaborateurs (2010), non seulement le diamètre, mais également la structure des liposomes vaccinaux impacteraient la production d'IFN- γ en réponse à une vaccination protéique par voie intrapéritonéale, et dans ce domaine, les MLV permettraient d'obtenir une réponse Th1 et une protection plus intense et durable que des REV (Bhowmick et al., 2010). A l'heure actuelle, seule une étude s'est intéressée à l'impact de la taille des liposomes en vaccination respiratoire (volume d'administration de 50 μ L) (Patel et al., 2010). Mais, il s'agissait là aussi d'une vaccination antibactérienne. La différence entre ces études et nos travaux pourrait s'expliquer par le fait que ces études ont évalué le potentiel adjuvant des liposomes vis-à-vis

de protéines, et non pas leur capacité à présenter des épitopes. Dans notre cas, l'adjuvant présent dans nos formulations pourrait être assez puissant pour niveler les différences entre les constructions de différentes tailles.

Une deuxième étape d'optimisation a été de travailler sur la **dose vaccinale**. L'objectif était de déterminer la plus petite dose d'adjuvant et/ou de peptides permettant de conserver l'activité immunostimulatrice et l'efficacité antitumorale du vaccin d'origine, en diminuant uniquement la dose d'adjuvant ou en diminuant l'ensemble du vaccin. Nos données ont montré, comme on pouvait s'y attendre, l'existence d'une relation entre la proportion en adjuvant ou la dose totale de vaccin, et la réponse immunostimulatrice et l'efficacité antitumorale du vaccin (tableau 17). Cependant, à notre surprise, aucune corrélation entre les changements de réponse immunostimulatrice et d'efficacité antitumorale n'a été observée. En effet, la proportion la plus faible en adjuvant a bien conduit à une faible réponse immunostimulatrice, mais s'est traduite par une efficacité antitumorale équivalente au vaccin d'origine. Par ailleurs, la diminution de la dose totale de vaccin a bien conduit à une baisse d'efficacité antitumorale, mais sans baisse de la réponse immunostimulatrice locale. Outre le fait d'étudier l'influence de la dose vaccinale sur l'efficacité du vaccin, ce travail a donc été pour nous l'occasion d'évaluer le lien entre la réponse immunostimulatrice locale immédiate et la protection antitumorale contre des tumeurs pulmonaires. L'idée de mesurer cette réponse immune immédiate était d'identifier une réponse prédictive de l'efficacité du vaccin, qui puisse être utilisée comme marqueur de « screening » de nouvelles constructions vaccinales, afin d'éviter d'engager systématiquement des études d'efficacité antitumorale longues et lourdes à mettre en œuvre. Les données dont nous disposons à ce jour ne nous permettent pas d'envisager cela.

Une des stratégies d'optimisation de notre vaccin a consisté à **cibler les cellules M** de l'épithélium nasal par le couplage sur nos liposomes du peptide MT2, ligand de la claudine-4, supposée agir, dans ces cellules, comme un récepteur d'endocytose qui pourrait favoriser la capture des antigènes particuliers (Ling et al., 2008; Lo et al., 2012). Le couplage de ce peptide aux liposomes nécessitait l'incorporation d'une cystéine, conduisant au peptide CMT2. Avant de coupler ce peptide à notre vaccin, nous avons souhaité vérifier sa capacité de ciblage *in vitro*. Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence une activité du peptide CMT2, exprimé par une diminution de TEER de monocouches de cellules Calu-3 ou Caco-2 cultivées sur inserts. Toutefois, l'ajout du peptide aux liposomes n'a pas permis

d'améliorer l'efficacité antitumorale du vaccin d'origine (dilué au 1/5^{ème}) contre des tumeurs pulmonaires après vaccination prophylactique. Trois hypothèses pourraient expliquer ces résultats. La première hypothèse est que le peptide CMT2 ne soit pas capable d'interagir avec la claudine-4, après couplage aux liposomes en raison d'un encombrement stérique. Cette hypothèse est suggérée par le fait que les constructions liposomales contenant le peptide n'ont eu aucun effet sur la TEER des monocouches de cellules Calu-3, alors que le CMT2 libre a induit une baisse significative de cette résistance. La deuxième hypothèse est que la dose de vaccin utilisée pour tester l'apport du CMT2 (1/5^{ème} de la dose du vaccin d'origine) soit trop faible. En effet, en cherchant à baisser l'activité du vaccin d'origine afin de mieux mettre en évidence l'apport du peptide, nous avons baissé la dose totale de vaccin, et donc la dose de l'ensemble des constituants de ce vaccin, et notamment des peptides Ha et ErbB2. La troisième hypothèse est que le peptide CMT2 de 13 aa ne soit pas suffisant pour obtenir une activité de ciblage des cellules *M in vivo*, même si d'après les travaux de Ling, cette séquence serait suffisante à une reconnaissance et une interaction avec la claudine-4 (Ling et al., 2008). En effet, il est important de préciser que les travaux ayant montré l'intérêt d'utiliser la reconnaissance CPE-claudine-4 en vaccination nasale ont tous été réalisés avec un fragment plus long (généralement entre 16 et 30 aa) de la CPE, et non pas avec le fragment MT2 (Kakutani et al., 2010; Rajapaksa et al., 2010; Suzuki et al., 2010; Suzuki et al., 2012; Takahashi et al., 2011). Au cours de nos travaux, nous avons tenté de fixer un peptide de 30 aa sur nos constructions, sans succès (données non présentées).

Dans ce projet, afin d'augmenter le temps de résidence de la préparation vaccinale au niveau nasal, nous avons incorporé **les liposomes vaccinaux dans un gel** à base de dérivé cellulosique. On retrouve différents travaux sur des gels liposomiques dans la littérature, en général pour des applications topiques, vaginales, oculaires ou nasales, dans le but de prolonger la libération des principes actifs encapsulés dans les liposomes (Alinaghi et al., 2013; Fetih et al., 2014; Gupta et al., 2012). En effet, le gel joue alors le rôle d'un second rempart à la libération des molécules, après la membrane phospholipidique. Dans la vaccination par voie nasale, nous voulions prolonger le temps de contact du vaccin avec la muqueuse. Comme dans ces diverses études, nous avons montré que dans les conditions utilisées, les liposomes vaccinaux conservent leurs diamètres, en présence des plus faibles proportions de gélifiant cellulosique. De plus, le gel ne modifie pas les taux de couplage des peptides aux liposomes. Toutefois, la formulation d'un gel vaccinal à base d'HPMC n'a pas permis de modifier la réponse immunostimulatrice locale induite par le vaccin, aussi bien en

intensité que dans le temps, ce qui pouvait laisser présager une absence d'amélioration d'efficacité antitumorale. Dans la littérature, il n'y a pas actuellement d'étude équivalente en vaccination nasale. En revanche, des gels liposomaux préparés à partir d'un dérivé polysaccharidique (xanthane) ont été étudiés chez la poule dans le cas d'une immunisation intranasale contre la grippe aviaire. Cette étude a montré que les gels liposomaux induisent une meilleure réponse immunitaire par rapport aux liposomes seuls, et qu'une proportion de gélifiant de 0,2 % (P/V) permet une meilleure production d'anticorps spécifiques au niveau local et systémique que la proportion de 0,3 % (P/V) (Chiou et al., 2009). Ces résultats montrent qu'une augmentation de la viscosité des préparations vaccinales peut permettre d'optimiser la réponse d'un vaccin destiné à la voie nasale, mais suggèrent aussi qu'une viscosité élevée pourrait limiter la libération des liposomes à partir du gel.

Une seconde stratégie envisagée pour favoriser le contact du vaccin avec la muqueuse nasale a été **l'incorporation du lipide DPGG** dans les préparations vaccinales. Le DPGG est un lipide diacylé (Pollastri et al., 2000). L'étude physique de son comportement à l'interface air/eau a conclu à la formation d'une monocouche particulièrement cohésive (Schmidt and DeWolf, 2004). Selon les travaux de Pollastri et collaborateurs, le DPGG posséderait des propriétés adhésives particulières pour les lipides et les protéines, en favorisant les liaisons hydrogène d'une part, et les interactions hydrophobes de l'autre (Pollastri et al., 2000). Du fait de son amphiphilie, en présence d'eau, il s'organise en bicouches relativement résistantes (Pollastri et al., 2000). Ainsi, l'équipe de Kang (2014) a montré qu'il pouvait être incorporé dans des liposomes obtenus par la méthode d'injection d'éthanol. Ces liposomes ont ensuite été exploités comme outil de détection et d'élimination du plomb (II) de l'environnement (Kang et al., 2014). En nous basant sur la littérature concernant le DPGG, qui, à notre connaissance, reste limitée à ces 3 publications, nous avons incorporé ce lipide dans des liposomes formulés par la technique d'hydratation d'un film lipidique. Malgré ses propriétés cohésives, l'incorporation de DPGG n'a pas modifié les caractéristiques physicochimiques de nos liposomes. Ces travaux nous ont donc permis d'évaluer pour la première fois, *in vivo*, l'apport de ce lipide dans le cadre de la vaccination par voie muqueuse à l'aide d'un vaccin peptidique liposomique. Malheureusement, nous n'avons pas mis en évidence d'apport particulier de cette molécule à nos constructions en terme de réponse immunitaire locale, à la concentration étudiée.

Du fait de leur capacité à se déformer et à passer les barrières épithéliales, les **transfersomes** sont classiquement utilisés pour la délivrance de médicaments par voie transdermique (Kumavat et al., 2013). Ils ont également été utilisés en vaccination épicutanée (Gupta et al., 2005b). Dans ce domaine, une étude comparative a notamment montré qu'ils étaient plus efficaces que des liposomes pour induire une réponse anticorps contre la toxine tétanique (Gupta et al., 2005a). Grâce à leur flexibilité, on pourrait imaginer que les transfersomes accèdent plus facilement, que les liposomes, aux NALT sous-jacents à l'épithélium nasal. Nous avons tenté de mettre à profit cette propriété dans le cas d'une administration nasale de vaccins à activité antitumorale. Ainsi, nous avons comparé l'activité immunostimulatrice locale du vaccin transfersomique à celle du vaccin liposomique d'origine. Une activité immunostimulatrice locale plus importante des transfersomes comparés aux liposomes a alors été observée, suggérant que les transfersomes pourraient présenter une efficacité antitumorale plus élevée que les liposomes.

En conclusion, les travaux d'évaluation biologique de nos constructions ont montré que la construction originale, développée au laboratoire dans le cadre d'une vaccination par voie sous-cutanée, possède une activité antitumorale prophylactique et thérapeutique contre des tumeurs locales après administration par voie respiratoire chez la souris, ainsi qu'une activité prophylactique contre des tumeurs solides distales. Par voie nasale, cette même construction a également une efficacité antitumorale locale après vaccination prophylactique, mais qui reste partielle. Cette activité dépend de la dose de vaccin ou de la proportion d'adjuvant. L'impact d'un certain nombre de paramètres physicochimiques susceptibles d'influencer l'efficacité de cette construction a été évalué dans le cadre d'une vaccination prophylactique par voie nasale contre des tumeurs locales. Les résultats de ces travaux n'ont pas montré d'influence du diamètre et de la structure des liposomes sur l'efficacité antitumorale du vaccin. Les deux stratégies visant à favoriser le contact du vaccin avec la muqueuse nasale n'ont pas apporté, à ce stade, de résultats probants, tout comme la stratégie de ciblage des cellules M. En revanche, la fluidité membranaire des vaccins pourrait être un facteur favorisant cette efficacité

Conclusion et perspectives

Avec l'identification des antigènes tumoraux et la compréhension de la réponse immunitaire mucoale, la vaccination par voie respiratoire est devenue un champ d'investigation prometteur pour le traitement du cancer. L'objectif de cette thèse était de concevoir des vaccins peptidiques nanoparticulaires à base de liposomes, destinés à la vaccination antitumorale par voie respiratoire ou nasale. Ainsi, nous avons formulé des liposomes vectorisant un épitope peptidique TCD8⁺ dérivé de l'oncogène ErbB2, un épitope TCD4⁺ et une molécule adjuvante. Cette construction a ensuite été optimisée en faisant varier les caractéristiques physicochimiques du vecteur liposomique (taille, structure, composition) ou de la formulation (viscosité). La réponse immunostimulatrice et, dans certains cas, l'efficacité antitumorale des différents vaccins ainsi obtenus ont été évaluées après administration respiratoire et/ou nasale, prophylactique et/ou thérapeutique, dans un modèle de tumeurs pulmonaires ou de tumeurs sous-cutanées chez la souris. L'ensemble de ces travaux a montré un intérêt indéniable des vaccins peptidiques à base de liposomes dans la vaccination antitumorale par voie respiratoire et nasale.

Ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives de recherche, en particulier en vaccination nasale. Nous souhaitons mettre ici l'accent sur certaines de ces perspectives à court et long terme, qui selon nous, sont des priorités.

1. Perspectives à court terme

1.1. Rôle des NALT dans l'activité des vaccins après vaccination nasale

Les NALT jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire mucoale au niveau nasal (Cesta, 2006). Au cours de notre étude, l'activité immunostimulatrice des vaccins après vaccination nasale a été évaluée par le dosage de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans les liquides de lavages nasaux. Toutefois, nous n'avons jamais étudié l'implication des NALT dans la réponse induite par nos vaccins. Ceci pourrait être fait de plusieurs façons. Nous pourrions tout d'abord étudier les conséquences de l'ablation chirurgicale des NALT sur l'efficacité antitumorale de nos vaccins chez la souris (Cisney et al., 2012). Une autre possibilité serait de rechercher et/ou quantifier la réponse immunitaire adaptative dans les NALT de souris vaccinées. Plusieurs approches seraient alors envisageables. Nous pourrions rechercher la présence de lymphocytes TCD8⁺ producteurs d'IFN- γ infiltrés dans les NALT par marquage immunohistochimique de coupes

histologiques de palais de souris vaccinées, selon une approche similaire à celle développée par Zuercher et collaborateurs (Zuercher et al., 2002). Une deuxième approche serait de prélever les NALT chez des souris vaccinées, d'en isoler les cellules et de caractériser ces cellules par cytométrie en flux, dans l'objectif de quantifier les lymphocytes TCD8⁺ producteurs d'IFN- γ (Kaufman et al., 2010; Rodriguez-Monroy and Moreno-Fierros, 2010). Alternativement, les cellules isolées des NALT pourraient être mises en culture et restimulées avec les peptides d'intérêt avant de réaliser un ELISpot IFN- γ , comme cela été fait dans notre travail à partir de la rate (Rodriguez-Monroy and Moreno-Fierros, 2010; Zuercher et al., 2002).

1.2. Ciblage des cellules M

Le **peptide CMT2** couplé aux liposomes n'a pas permis d'améliorer l'efficacité antitumorale de notre vaccin d'origine. Nous avons alors supposé qu'une fois couplé aux liposomes, un encombrement stérique empêchait l'interaction de ce peptide avec la claudine-4. Cette hypothèse a été suggérée par le fait que les constructions liposomales contenant le peptide n'ont eu aucun effet sur la TEER des monocouches de cellules Calu-3, alors que le CMT2 libre a induit une baisse significative de cette résistance. Pour étudier cette hypothèse, nous envisageons d'utiliser pour le couplage du peptide un bras espaceur de longue chaîne permettant d'éloigner le site de couplage du peptide du liposome. L'ancre DPGMal que nous avons utilisée contient 4 unités de polyéthylène glycol (PEG) qui ne suffisent peut-être pas à assurer une distance satisfaisante entre le peptide et le liposome. Pratiquement, nous comptons utiliser une ancre maléimide commerciale contenant 45 unités de PEG, le DSPE-PEG2000-maléimide, à la place du DPGMal.

Une deuxième hypothèse pour expliquer l'absence d'apport du CMT2 dans notre travail est que le peptide MT2 de 13 aa ne soit pas suffisant pour obtenir une activité de ciblage des cellules M *in vivo*, même si d'après les travaux de Ling cette séquence est suffisante à une reconnaissance et une interaction avec la claudine-4 (Ling et al., 2008). Pour étudier cette hypothèse, nous proposons de nous inspirer des travaux de Suzuki et collaborateurs. Ces auteurs ont montré qu'une substitution des acides aminés asparagine en position 309 et sérine en position 313 du fragment C-terminal du CPE (p194-319), par l'alanine, augmentait l'affinité de ce fragment pour la claudine-4. Cette affinité considérablement améliorée s'est traduite par une plus forte réponse immunitaire muco-

systémique après une vaccination respiratoire à l'aide d'une protéine de fusion OVA-peptide C-CPE muté (Suzuki et al., 2012). Dans notre travail, nous pouvons envisager, soit d'utiliser ce peptide muté à la place du MT2, soit de substituer les acides aminés (asparagine et sérine) en position 310 et 313 du MT2 par l'alanine. Enfin, les deux stratégies citées ci-dessus (bras espaceur et modification du peptide) pourraient être combinées.

1.3. Temps de résidence des vaccins au niveau de la muqueuse nasale

Au cours de notre travail, deux stratégies d'augmentation du temps de résidence des vaccins au niveau de la muqueuse nasale ont été étudiées, afin de favoriser la capture des épitopes peptidiques par les CPA ou les cellules M : incorporation de DPGG et augmentation de la viscosité des formulations vaccinales. Aucune de ces stratégies n'ayant permis d'augmenter la réponse immunostimulatrice locale, nous n'avons pas jugé opportun d'étudier l'efficacité antitumorale de ces constructions. Cependant, bien que nous n'ayons pas toujours vu de corrélation entre réponse immunostimulatrice locale et efficacité antitumorale (tableau 17), il serait malgré tout judicieux d'étudier l'efficacité antitumorale de ces constructions. Si nous constatons alors l'absence d'apport de ces stratégies à l'efficacité de notre vaccin, il serait intéressant d'étudier le temps de résidence des constructions vaccinales dans la cavité nasale chez la souris *in vivo*, afin de vérifier s'il est, comme nous le supposons, augmenté. Pour ce faire, nous pourrions encapsuler dans le cœur de nos vaccins une molécule fluorescente telle que la 5,6-carboxyfluorescéine, qui pourrait être ensuite utilisée comme marqueur pour visualiser la présence de notre vaccin sur des coupes histologiques de palais de souris (Fernandez et al., 2011; Hagenars et al., 2010). Les résultats de ces études nous permettraient alors d'orienter notre choix soit vers l'abandon de ces stratégies, soit vers leur optimisation.

1.4. Transfersomes vaccinaux

Les résultats préliminaires obtenus avec les **transfersomes** sont encourageants, mais se limitent à la réponse immunostimulatrice locale. De ce fait, il serait important de déterminer si une augmentation de l'activité locale immédiate apportée par ce vaccin s'accompagne d'une augmentation de l'efficacité antitumorale. Donc, dans la suite de cette étude, nous évaluerons l'efficacité antitumorale du vaccin transfersomique en comparaison avec le vaccin

liposomique d'origine. De la même manière que précédemment, nous pourrions, selon les résultats obtenus, étudier le devenir de ces vaccins dans la cavité nasale.

2. Perspectives à long terme

2.1. Combiner la vaccination à d'autres formes d'immunothérapie

L'IT, utilisée seule, reste à ce jour modérément efficace dans le traitement du cancer. Les chercheurs réfléchissent donc à combiner des approches thérapeutiques pouvant avoir une activité synergique, notamment en utilisant l'environnement tumoral, afin de rendre les cellules tumorales plus vulnérables à l'attaque du système immunitaire (figure 78). Dans la littérature, des résultats encourageants ont été rapportés chez l'Homme et l'animal grâce à **l'association de la vaccination avec la chimiothérapie ou bien avec d'autres traitements d'IT** (Andersen et al., 2010; Drake, 2012; Slovin, 2012).

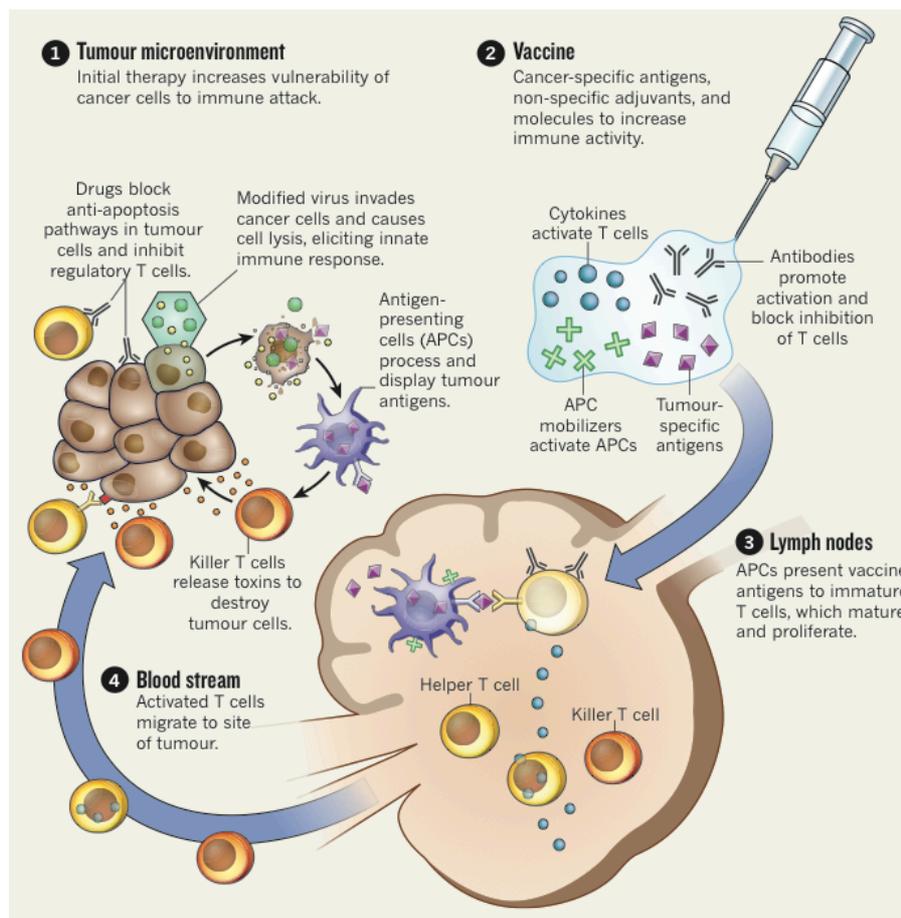


Figure 78 : Possibilités de combiner l'immunothérapie à d'autres approches pour vaincre le cancer (Elert, 2013).

Cette stratégie pourrait tout à fait être appliquée à nos vaccins liposomiques. Il s'agirait d'exploiter leur capacité d'encapsulation, en particulier de molécules hydrophiles dans leur cœur, notamment pour améliorer leur efficacité thérapeutique qui est restée dans notre étude limitée. Une première approche, associant à nos vaccins de l'immunothérapie passive non spécifique, serait d'encapsuler de l'IL-2 et/ou du GM-CSF dans nos constructions. En effet, l'IL-2 est une cytokine indispensable pour la prolifération et l'expansion clonale des cellules T, tandis que le GM-CSF favorise la maturation et la migration des DC. L'encapsulation de ces cytokines dans le cœur de nos constructions vaccinales permettrait de favoriser la présentation des antigènes peptidiques et la neutralisation de la tumeur par les CTL. Ainsi, des résultats encourageants ont été obtenus chez la souris dans le cas du cancer de la prostate suite à la co-administration de ces cytokines avec un vaccin à base d'ADN (Roos et al., 2005). Une autre approche, qui a notre préférence en raison de sa spécificité, consisterait à encapsuler des anticorps à activité antitumorale. Ainsi, une étude clinique réalisée par Disis et collaborateurs (2009) a montré des résultats encourageants suite à l'association d'un vaccin peptidique anti-ErbB2 et du trastuzumab (Herceptine[®]), anticorps monoclonal dirigé contre la protéine ErbB2. Les auteurs ont montré que le traitement combiné permet d'induire une réponse antitumorale plus forte comparée au vaccin seul (Disis et al., 2009).

2.2. Utiliser des modèles murins plus réalistes

Le modèle de tumeurs surexprimant ErbB2 utilisé dans nos travaux est basé sur des cellules d'adénocarcinome rénal transfectées, implantées chez des souris immunocompétentes. Ce modèle très utile pour un screening reste cependant loin de la réalité. Le deuxième axe de nos perspectives à long terme est donc d'évaluer nos constructions vaccinales dans des **modèles murins plus réalistes**. Pour cela, deux modèles nous intéressent plus particulièrement.

Le premier est un modèle de souris prédisposées au développement de tumeurs mammaires. Deux lignées sont disponibles commercialement : MMTV-neu-N et MMTV-neu-T (Reilly et al., 2000; Siegel et al., 1994). Ces souris développent spontanément des tumeurs mammaires exprimant l'épitope ErbB2 p63-71. Elles constituent donc des modèles de choix pour valider nos constructions.

Le deuxième est un modèle de souris « humanisées » qui repose sur l'utilisation de souris SCID reconstituées avec des cellules de rate humaine, le modèle Hu-SPL-SCID. En effet, dans le cas des vaccins anti-tumoraux, il n'est pas possible d'évaluer la capacité des vaccins à réduire les tumeurs humaines dans des animaux, car celles-ci sont rejetées d'emblée par la réponse immunitaire anti-xénogreffes. Le modèle Hu-SPL-SCID est utilisé actuellement pour obtenir des réponses immunitaires humaines à des vaccins usuels, comme la toxine tétanique, lesquelles s'avèrent comparables à celles observées chez l'homme vacciné (Souleima Chamat, Université Libanaise, Beyrouth, résultats non publiés).

Bibliographie

- Agassandian, M., and Mallampalli, R.K. (2013). Surfactant phospholipid metabolism. *Biochimica et biophysica acta* 1831, 612-625.
- Akagi, T., Masanori Baba, and Akashi, M. (2011). Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems: Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine. *Advances in Polymer Science* 247, 31-64.
- Alinaghi, A., Rouini, M.R., Johari Daha, F., and Moghimi, H.R. (2013). Hydrogel-embedded vesicles, as a novel approach for prolonged release and delivery of liposome, in vitro and in vivo. *Journal of liposome research* 23, 235-243.
- Alpar, H.O., Somavarapu, S., Atuah, K.N., and Bramwell, V.W. (2005). Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery. *Advanced drug delivery reviews* 57, 411-430.
- Altin, J.G., and Parish, C.R. (2006). Liposomal vaccines--targeting the delivery of antigen. *Methods* 40, 39-52.
- Amin, M., Jaafari, M.R., and Tafaghodi, M. (2009). Impact of chitosan coating of anionic liposomes on clearance rate, mucosal and systemic immune responses following nasal administration in rabbits. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 74, 225-229.
- Andersen, M.H., Junker, N., Ellebaek, E., Svane, I.M., and Thor Straten, P. (2010). Therapeutic cancer vaccines in combination with conventional therapy. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 237623.
- Asanuma, H., Thompson, A.H., Iwasaki, T., Sato, Y., Inaba, Y., Aizawa, C., Kurata, T., and Tamura, S. (1997). Isolation and characterization of mouse nasal-associated lymphoid tissue. *Journal of immunological methods* 202, 123-131.
- Baigude, H., Katsuraya, K., Okuyama, K., and Uryu, T. (2004). Synthesis of Structurally-Controlled AIDS Vaccine Model with Glyco-Peptide Dendrimer Scaffolds. *Macromolecular Chemistry and Physics* 205, 684-691.
- Ballester, M., Nembrini, C., Dhar, N., de Titta, A., de Piano, C., Pasquier, M., Simeoni, E., van der Vlies, A.J., McKinney, J.D., Hubbell, J.A., *et al.* (2011). Nanoparticle conjugation and pulmonary delivery enhance the protective efficacy of Ag85B and CpG against tuberculosis. *Vaccine* 29, 6959-6966.
- Bangham, A.D., Standish, M.M., and Watkins, J.C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology* 13, 238-252.
- Benoît, J.P., Briançon, S., Fattal, E., Fessi, H., Legrand, P., and Passirani, C. (2007). Sphéroïdes et formes vectorisées. In *Pharmacie Galénique : formulation et technologie pharmaceutique* P. Wehrlé, ed., pp. pp 221- 250.
- Berube, K., Prytherch, Z., Job, C., and Hughes, T. (2010). Human primary bronchial lung cell constructs: the new respiratory models. *Toxicology* 278, 311-318.
- Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2008). Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453, 1051-1057.

- Bhowmick, S., Mazumdar, T., Sinha, R., and Ali, N. (2010). Comparison of liposome based antigen delivery systems for protection against *Leishmania donovani*. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* *141*, 199-207.
- Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology* *11*, 889-896.
- Bivas-Benita, M., Gillard, G.O., Bar, L., White, K.A., Webby, R.J., Hovav, A.H., and Letvin, N.L. (2013). Airway CD8(+) T cells induced by pulmonary DNA immunization mediate protective anti-viral immunity. *Mucosal immunology* *6*, 156-166.
- Bivas-Benita, M., van Meijgaarden, K.E., Franken, K.L., Junginger, H.E., Borchard, G., Ottenhoff, T.H., and Geluk, A. (2004). Pulmonary delivery of chitosan-DNA nanoparticles enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding HLA-A*0201-restricted T-cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* *22*, 1609-1615.
- Bohlen, P., Stein, S., Dairman, W., and Udenfriend, S. (1973). Fluorometric assay of proteins in the nanogram range. *Archives of biochemistry and biophysics* *155*, 213-220.
- Bomsel, M., Tudor, D., Drillet, A.S., Alfsen, A., Ganor, Y., Roger, M.G., Mouz, N., Amacker, M., Chalifour, A., Diomede, L., *et al.* (2011). Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. *Immunity* *34*, 269-280.
- Boon, T., Cerottini, J.C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., and Van Pel, A. (1994). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annual review of immunology* *12*, 337-365.
- Boon, T., and Eynde, V.G.B.B.t.V.d. (1995). Antigènes de rejet des tumeurs et immunothérapie spécifique du cancer. *médecine/sciences* *11*, 1279-1287.
- Bouet, F., and Catros, V. (2003). Réponse immunitaire antitumorale : nouvelles perspectives dans le traitement du carcinome à cellules rénales. *Annales de Biologie Clinique* *62*, 257-268.
- Brandtzaeg, P. (2003). Immunology of tonsils and adenoids: everything the ENT surgeon needs to know. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* *67 Suppl 1*, S69-76.
- Brandtzaeg, P. (2009). Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scandinavian Journal of Immunology* *70*, 505-515.
- Brandtzaeg, P., Kiyono, H., Pabst, R., and Russell, M.W. (2008). Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal immunology* *1*, 31-37.
- Buer, J., and Balling, R. (2003). Mice, microbes and models of infection. *Nature reviews Genetics* *4*, 195-205.
- Buonaguro, L., Petrizzo, A., Tornesello, M.L., and Buonaguro, F.M. (2011). Translating tumor antigens into cancer vaccines. *Clinical and vaccine immunology : CVI* *18*, 23-34.

- Butts, C., Socinski, M.A., Mitchell, P.L., Thatcher, N., Havel, L., Krzakowski, M., Nawrocki, S., Ciuleanu, T.E., Bosquee, L., Trigo, J.M., *et al.* (2014). Tecemotide (L-BLP25) versus placebo after chemoradiotherapy for stage III non-small-cell lung cancer (START): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The lancet oncology* 15, 59-68.
- Carrillo-Conde, B., Song, E.H., Chavez-Santoscoy, A., Phanse, Y., Ramer-Tait, A.E., Pohl, N.L., Wannemuehler, M.J., Bellaire, B.H., and Narasimhan, B. (2011). Mannose-functionalized "pathogen-like" polyanhydride nanoparticles target C-type lectin receptors on dendritic cells. *Molecular pharmaceutics* 8, 1877-1886.
- Catros-Quemener, V., Bouet, F., and Genetet, N. (2003). Immunité anti-tumorale et thérapies cellulaires du cancer. *M/S : médecine sciences* 19, 43-52.
- Cesta, M.F. (2006). Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicologic pathology* 34, 599-608.
- Cevc, G., and Blume, G. (1992). Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochimica et biophysica acta* 1104, 226-232.
- Cevc, G., Gebauer, D., Stieber, J., Schatzlein, A., and Blume, G. (1998). Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochimica et biophysica acta* 1368, 201-215.
- Chen, J., Li, Z., Huang, H., Yang, Y., Ding, Q., Mai, J., Guo, W., and Xu, Y. (2011). Improved antigen cross-presentation by polyethyleneimine-based nanoparticles. *International journal of nanomedicine* 6, 77-84.
- Chen, X., and Jensen, P.E. (2008). The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 56, 77-83.
- Cheng, M., Chen, Y., Xiao, W., Sun, R., and Tian, Z. (2013). NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cellular & molecular immunology* 10, 230-252.
- Chiavolini, D., Rangel-Moreno, J., Berg, G., Christian, K., Oliveira-Nascimento, L., Weir, S., Alroy, J., Randall, T.D., and Wetzler, L.M. (2010). Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) and survival in a vaccine mouse model of tularemia. *PloS one* 5, e11156.
- Chiou, C.J., Tseng, L.P., Deng, M.C., Jiang, P.R., Tasi, S.L., Chung, T.W., Huang, Y.Y., and Liu, D.Z. (2009). Mucoadhesive liposomes for intranasal immunization with an avian influenza virus vaccine in chickens. *Biomaterials* 30, 5862-5868.
- Chotirmall, S.H., Harvey, B.J., McElvaney, N.G., and Greene, C.M. (2011). Pulmonary Inflammation in Cystic Fibrosis: Impact of Innate Immunity and Estrogen. *CML – Cystic Fibrosis* 1, 37-48.
- Christian, D.A., and Hunter, C.A. (2012). Particle-mediated delivery of cytokines for immunotherapy. *Immunotherapy* 4, 425-441.

- Christoforidis, J.B., Chang, S., Jiang, A., Wang, J., and Cebulla, C.M. (2012). Intravitreal devices for the treatment of vitreous inflammation. *Mediators of inflammation* 2012, 126463.
- Chroneos, Z.C., Sever-Chroneos, Z., and Shepherd, V.L. (2010). Pulmonary surfactant: an immunological perspective. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 25, 13-26.
- Ciabattini, A., Pettini, E., Arsenijevic, S., Pozzi, G., and Medaglini, D. (2010). Intranasal immunization with vaccine vector *Streptococcus gordonii* elicits primed CD4+ and CD8+ T cells in the genital and intestinal tracts. *Vaccine* 28, 1226-1233.
- Cisney, E.D., Fernandez, S., Hall, S.I., Krietz, G.A., and Ulrich, R.G. (2012). Examining the role of nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue (NALT) in mouse responses to vaccines. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 3960.
- Coucke, D., Schotsaert, M., Libert, C., Pringels, E., Vervaet, C., Foreman, P., Saelens, X., and Remon, J.P. (2009). Spray-dried powders of starch and crosslinked poly(acrylic acid) as carriers for nasal delivery of inactivated influenza vaccine. *Vaccine* 27, 1279-1286.
- Cruz, L.J., Tacke, P.J., Rueda, F., Domingo, J.C., Albericio, F., and Figdor, C.G. (2012). Targeting nanoparticles to dendritic cells for immunotherapy. *Methods in enzymology* 509, 143-163.
- Csaba, N., Garcia-Fuentes, M., and Alonso, M.J. (2009). Nanoparticles for nasal vaccination. *Advanced drug delivery reviews* 61, 140-157.
- Cui, L., Cohen, J.A., Broaders, K.E., Beaudette, T.T., and Fréchet, J.M.J. (2011). Mannosylated dextran nanoparticles: a pH-sensitive system engineered for immunomodulation through mannose targeting. *Bioconjugate Chemistry* 22, 949-957.
- Daftarian, P., Kaifer, A.E., Li, W., Blomberg, B.B., Frasca, D., Roth, F., Chowdhury, R., Berg, E.A., Fishman, J.B., Al Sayegh, H.A., *et al.* (2011). Peptide-conjugated PAMAM dendrimer as a universal DNA vaccine platform to target antigen-presenting cells. *Cancer research* 71, 7452-7462.
- Davis, S.S. (2001). Nasal vaccines. *Advanced drug delivery reviews* 51, 21-42.
- De Bernardis, F., Boccanera, M., Adriani, D., Girolamo, A., and Cassone, A. (2002). Intravaginal and intranasal immunizations are equally effective in inducing vaginal antibodies and conferring protection against vaginal candidiasis. *Infection and immunity* 70, 2725-2729.
- De Haan, A., Renegar, K., Small, P.J., and Wilschut, J. (1995). Induction of a secretory IgA response in the murine female urogenital tract by immunization of the lungs with liposome-supplemented viral subunit antigen. *Vaccine* 13(7):613-6., 613-616.
- Degli-Esposti, M.A., and Smyth, M.J. (2005). Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nature reviews Immunology* 5, 112-124.

- Deliyannis, G., Kedzierska, K., Lau, Y.F., Zeng, W., Turner, S.J., Jackson, D.C., and Brown, L.E. (2006). Intranasal lipopeptide primes lung-resident memory CD8+ T cells for long-term pulmonary protection against influenza. *European journal of immunology* 36, 770-778.
- Dermime, S., Armstrong, A., Hawkins, R.E., and Stern, P.L. (2002). Cancer vaccines and immunotherapy. *British medical bulletin* 62, 149-162.
- Disis, M.L., Wallace, D.R., Gooley, T.A., Dang, Y., Slota, M., Lu, H., Coveler, A.L., Childs, J.S., Higgins, D.M., Fintak, P.A., *et al.* (2009). Concurrent trastuzumab and HER2/neu-specific vaccination in patients with metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 4685-4692.
- Doroud, D., Zahedifard, F., Vatanara, A., Najafabadi, A.R., Taslimi, Y., Vahabpour, R., Torkashvand, F., Vaziri, B., and Rafati, S. (2011). Delivery of a cocktail DNA vaccine encoding cysteine proteinases type I, II and III with solid lipid nanoparticles potentiate protective immunity against *Leishmania major* infection. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 153, 154-162.
- Drake, C.G. (2012). Combination immunotherapy approaches. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 23 *Suppl* 8, viii41-46.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* 3, 991-998.
- Durrer, P., Gluck, U., Spyr, C., Lang, A.B., Zurbriggen, R., Herzog, C., and Gluck, R. (2003). Mucosal antibody response induced with a nasal virosome-based influenza vaccine. *Vaccine* 21, 4328-4334.
- El Hage, F., Abouzahr-Rifai, S., Meslin, F., Mami-Chouaib, F., and Chouaib, S. (2008). [Immune response and cancer]. *Bulletin du cancer* 95, 57-67.
- Elamanchili, P., Lutsiak, C.M., Hamdy, S., Diwan, M., and Samuel, J. (2007). "Pathogen-mimicking" nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cells. *Journal of immunotherapy* 30, 378-395.
- Elert, E. (2013). Calling cells to arms. *Nature* 504, S2-3.
- Engler, O.B., Schwendener, R.A., Dai, W.J., Wolk, B., Pichler, W., Moradpour, D., Brunner, T., and Cerny, A. (2004). A liposomal peptide vaccine inducing CD8+ T cells in HLA-A2.1 transgenic mice, which recognise human cells encoding hepatitis C virus (HCV) proteins. *Vaccine* 23, 58-68.
- Ertl, H.C. (2011). The ideal vaccine: until death do us part. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19, 820-822.

- Espuelas, S., Thumann, C., Heurtault, B., Schuber, F., and Frisch, B. (2008). Influence of ligand valency on the targeting of immature human dendritic cells by mannosylated liposomes. *Bioconjugate Chemistry* 19, 2385-2393.
- Fahy, J.V., and Dickey, B.F. (2010). Airway mucus function and dysfunction. *The New England journal of medicine* 363, 2233-2247.
- Fernandez, S., Cisney, E.D., Hall, S.I., and Ulrich, R.G. (2011). Nasal immunity to staphylococcal toxic shock is controlled by the nasopharynx-associated lymphoid tissue. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 18, 667-675.
- Fetih, G., Fathalla, D., and El-Badry, M. (2014). Liposomal gels for site-specific, sustained delivery of celecoxib: in vitro and in vivo evaluation. *Drug development research* 75, 257-266.
- Foged, C., Brodin, B., Frokjaer, S., and Sundblad, A. (2005). Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *International journal of pharmaceutics* 298, 315-322.
- French, A.R., and Yokoyama, W.M. (2004). Natural killer cells and autoimmunity. *Arthritis research & therapy* 6, 8-14.
- Frisch, B., Hassane, F.S., and Schuber, F. (2010). Conjugation of ligands to the surface of preformed liposomes by click chemistry. *Methods in molecular biology* 605, 267-277.
- Fujita, Y., and Taguchi, H. (2011). Current status of multiple antigen-presenting peptide vaccine systems: Application of organic and inorganic nanoparticles. *Chemistry Central journal* 5, 48.
- Fukata, M., Vamadevan, A.S., and Abreu, M.T. (2009). Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Seminars in immunology* 21, 242-253.
- Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature reviews Immunology* 4, 941-952.
- Gachlin, G., Michelin, O., Luescher, I.F., and Cambiaggi (2001). Antigen Recognition by Lymphocytes. *Encyclopedia of life sciences*.
- Ganesan, S., Comstock, A.T., and Sajjan, U.S. (2013). Barrier function of airway tract epithelium. *Tissue barriers* 1, e24997.
- Garmise, R.J., Staats, H.F., and Hickey, A.J. (2007). Novel dry powder preparations of whole inactivated influenza virus for nasal vaccination. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech* 8, E81.
- Ge, W., Li, Y., Li, Z.S., Zhang, S.H., Sun, Y.J., Hu, P.Z., Wang, X.M., Huang, Y., Si, S.Y., Zhang, X.M., *et al.* (2009). The antitumor immune responses induced by nanoemulsion-encapsulated MAGE1-HSP70/SEA complex protein vaccine following peroral administration route. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 58, 201-208.

- Gentine, P., Bourel-Bonnet, L., and Frisch, B. (2013). Modified and derived ethanol injection toward liposomes: development of the process. *Journal of liposome research* 23, 11-19.
- Gentine, P., Bubel, A., Crucifix, C., Bourel-Bonnet, L., and Frisch, B. (2012). Manufacture of liposomes by isopropanol injection: characterization of the method. *Journal of liposome research* 22, 18-30.
- Glasser, J.R., and Mallampalli, R.K. (2012). Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 14, 17-25.
- Go, M., Kojima, T., Takano, K., Murata, M., Koizumi, J., Kurose, M., Kamekura, R., Osanai, M., Chiba, H., Spray, D.C., *et al.* (2006). Connexin 26 expression prevents down-regulation of barrier and fence functions of tight junctions by Na⁺/K⁺-ATPase inhibitor ouabain in human airway epithelial cell line Calu-3. *Experimental cell research* 312, 3847-3856.
- Gordon, S.B., and Read, R.C. (2002). Macrophage defences against respiratory tract infections. *British medical bulletin* 61, 45-61.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.
- Gregory, A.E., Titball, R., and Williamson, D. (2013). Vaccine delivery using nanoparticles. *Cellular and infection microbiology* 3, 1-13.
- Gross, E.A., Swenberg, J.A., Fields, S., and Popp, J.A. (1982). Comparative morphometry of the nasal cavity in rats and mice. *Journal of anatomy* 135, 83-88.
- Gupta, P.N., Mishra, V., Rawat, A., Dubey, P., Mahor, S., Jain, S., Chatterji, D.P., and Vyas, S.P. (2005a). Non-invasive vaccine delivery in transfersomes, niosomes and liposomes: a comparative study. *International journal of pharmaceutics* 293, 73-82.
- Gupta, P.N., Mishra, V., Singh, P., Rawat, A., Dubey, P., Mahor, S., and Vyas, S.P. (2005b). Tetanus toxoid-loaded transfersomes for topical immunization. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 57, 295-301.
- Gupta, P.N., Pattani, A., Curran, R.M., Kett, V.L., Andrews, G.P., Morrow, R.J., Woolfson, A.D., and Malcolm, R.K. (2012). Development of liposome gel based formulations for intravaginal delivery of the recombinant HIV-1 envelope protein CN54gp140. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 46, 315-322.
- Hafner, A.M., Corthésy, B., and Merkle, H.P. (2013). Particulate formulations for the delivery of poly(I:C) as vaccine adjuvant. *Advanced drug delivery reviews* 65, 1386-1399.

- Hagenaars, N., Mania, M., de Jong, P., Que, I., Nieuwland, R., Slutter, B., Glansbeek, H., Heldens, J., van den Bosch, H., Lowik, C., *et al.* (2010). Role of trimethylated chitosan (TMC) in nasal residence time, local distribution and toxicity of an intranasal influenza vaccine. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 144, 17-24.
- Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2011). Dendritic cells and airway epithelial cells at the interface between innate and adaptive immune responses. *Allergy* 66, 579-587.
- Hansen, J., Lindenstrøm, T., Lindberg-Levin, J., Aagaard, C., Andersen, P., and Agger, E.M. (2012). CAF05: cationic liposomes that incorporate synthetic cord factor and poly(I:C) induce CTL immunity and reduce tumor burden in mice. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 61, 893-903.
- Harding, C.V., and Song, R. (1994). Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *Journal of immunology* 153, 4925-4933.
- Heurtault, B., Frisch, B., and Pons, F. (2010). Liposomes as delivery systems for nasal vaccination: strategies and outcomes. *Expert opinion on drug delivery* 7, 829-844.
- Heurtault, B., Gentine, P., Thomann, J.S., Baehr, C., Frisch, B., and Pons, F. (2009). Design of a liposomal candidate vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* and its evaluation in triggering systemic and lung mucosal immunity. *Pharmaceutical research* 26, 276-285.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., and Benoit, J.P. (2002). A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharmaceutical research* 19, 875-880.
- Honeywell-Nguyen, P.L., and Bouwstra, J.A. (2005). Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug discovery today Technologies* 2, 67-74.
- Hovden, A.O., and Appel, S. (2010). The first dendritic cell-based therapeutic cancer vaccine is approved by the FDA. *Scandinavian Journal of Immunology* 72, 554-554.
- Hsiao-Wen Wang, Ping-Lun Jiang, Shen-Fu Lin, Hung-Jun Lin, Ou, K.-L., Deng, W.-P., Lee, L.-W., Huang, Y.-Y., Liang, P.-H., and Liu, D.-Z. (2013). Application of galactose-modified liposomes as a potent antigen presenting cell targeted carrier for intranasal immunization. *Acta biomaterialia* 9, 5681-5688.
- Huang, Y., Yu, F., Park, Y.S., Wang, J., Shin, M.C., Chung, H.S., and Yang, V.C. (2010). Co-administration of protein drugs with gold nanoparticles to enable percutaneous delivery. *Biomaterials* 31, 9086-9091.
- Huchon, G. (2001). *Pneumologie pour le praticien* (Paris, France: Masson).
- Hussell, T., and Bell, T.J. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nature reviews Immunology* 14, 81-93.

- Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A.N., and Davis, S.S. (2001). Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Advanced drug delivery reviews* 51, 81-96.
- Jain, S., Khomane, K., Jain, A.K., and Dani, P. (2011). Nanocarriers for Transmucosal Vaccine Delivery. *Current Nanoscience*, 7, 160-170.
- Jalali, S.A., Sankian, M., Tavakkol-Afshari, J., and Jaafari, M.R. (2012). Induction of tumor-specific immunity by multi-epitope rat HER2/neu-derived peptides encapsulated in LPD Nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 8, 692-701.
- Jiang, H.L., Kang, M.L., Quan, J.S., Kang, S.G., Akaike, T., Yoo, H.S., and Cho, C.S. (2008). The potential of mannosylated chitosan microspheres to target macrophage mannose receptors in an adjuvant-delivery system for intranasal immunization. *Biomaterials* 29, 1931-1939.
- Joshi, M.D., Unger, W.J., Storm, G., van Kooyk, Y., and Mastrobattista, E. (2012). Targeting tumor antigens to dendritic cells using particulate carriers. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 161, 25-37.
- Kakutani, H., Kondoh, M., Fukasaka, M., Suzuki, H., Hamakubo, T., and Yagi, K. (2010). Mucosal vaccination using claudin-4-targeting. *Biomaterials* 31, 5463-5471.
- Kang, D.H., Jung, H.-S., Ahn, N., Yang, S.M., Seo, S., Suh, K.-Y., Chang, P.-S., Jeon, N.L., Kim, J., and Kim, K. (2014). Janus-Compartmental Alginate Microbeads Having Polydiacetylene Liposomes and Magnetic Nanoparticles for Visual Lead(II) Detection. *American Chemical Society* 6, 10631-10637.
- Kato, A., and Schleimer, R.P. (2007). Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Current opinion in immunology* 19, 711-720.
- Kaufman, D.R., Bivas-Benita, M., Simmons, N.L., Miller, D., and Barouch, D.H. (2010). Route of adenovirus-based HIV-1 vaccine delivery impacts the phenotype and trafficking of vaccine-elicited CD8+ T lymphocytes. *Journal of virology* 84, 5986-5996.
- Kawamura, Kadowaki, Suzuki, Udagawa, Kasaoka, Utoguchi, Kitawaki, Sugimoto, Okada, Maruyama, *et al.* (2006). Dendritic cells that endocytosed antigen-containing IgG-liposomes elicit effective antitumor immunity. *Journal of immunotherapy* 29, 165-174.
- Kawana, K., Yasugi, T., Kanda, T., Kino, N., Oda, K., Okada, S., Kawana, Y., Nei, T., Takada, T., Toyoshima, S., *et al.* (2003). Safety and immunogenicity of a peptide containing the cross-neutralization epitope of HPV16 L2 administered nasally in healthy volunteers. *Vaccine* 21, 4256-4260.
- Kerdiles, Y., Ugolini, S., and Vivier, E. (2013). T cell regulation of natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* 210, 1065-1068.

- Kim, W.D. (1997). Lung mucus: a clinician's view. *The European respiratory journal* 10, 1914-1917.
- Kimura, J., Abe, H., Kamitani, S., Toshima, H., Fukui, A., Miyake, M., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Yamamoto, S., and Horiguchi, Y. (2010). Clostridium perfringens enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. *The Journal of biological chemistry* 285, 401-408.
- Kindt, T.J., Goldsby, R.A., and Osborne, B.A. (2008). *Immunologie*, Vol 1, 6 edn (DUNOD).
- Kirby, C., and Gregoriadis, G. (1980). The effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on the fate of their lipid components in vitro. *Life sciences* 27, 2223-2230.
- Kiyono, H., and Fukuyama, S. (2004). NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nature reviews Immunology* 4, 699-710.
- Kodama, S., Hirano, T., Noda, K., Umemoto, S., and Suzuki, M. (2011). Nasal immunization with plasmid DNA encoding P6 protein and immunostimulatory complexes elicits nontypeable Haemophilus influenzae-specific long-term mucosal immune responses in the nasopharynx. *Vaccine* 29, 1881-1890.
- Korsholm, K.S., Hansen, J., Karlsen, K., Filskov, J., Mikkelsen, M., Lindenstrom, T., Schmidt, S.T., Andersen, P., and Christensen, D. (2014). Induction of CD8+ T-cell responses against subunit antigens by the novel cationic liposomal CAF09 adjuvant. *Vaccine* 32, 3927-3935.
- Krishnamachari, Y., Geary, S.M., Lemke, C.D., and Salem, A.K. (2011). Nanoparticle delivery systems in cancer vaccines. *Pharmaceutical research* 28, 215-236.
- Kumar, S., Sharma, P.K., Bansal, M., and Malviya, R. (2011). Liposome – a novel colloidal drug delivery system. *Journal of Chronotherapy and Drug Delivery* 2, 7-13.
- Kumavat, S.D., Chaudhari, Y.S., Borole, P., Duvvuri, P., Bubera, N., Shenghani, K., Shah, P., and mishra, P. (2013). Transfersomes: a promising approach for transdermal drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 3, 1-17.
- Kunda, N.K., Somavarapu, S., Gordon, S.B., Hutcheon, G.A., and Saleem, I.Y. (2013). Nanocarriers targeting dendritic cells for pulmonary vaccine delivery. *Pharmaceutical research* 30, 325-341.
- Kwon, S., Kim, D., Park, B.K., Cho, S., Kim, K.D., Kim, Y.-E., Park, C.-S., Ahn, H.-J., Seo, J.-N., Choi, K.-C., *et al.* (2012). Prevention and therapy of hepatocellular carcinoma by vaccination with TM4SF5 epitope-CpG-DNA-liposome complex without carriers. *PloS one* 7, 1-13.
- Kwon, S., Kim, Y.E., Kim, D., Park, B.K., Wu, G., Kim, T.H., Choi, S.H., Kim, D.S., Kwon, H.J., and Lee, Y. (2013). Prophylactic effect of a peptide vaccine targeting TM4SF5 against colon cancer in a mouse model. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 435, 134-139.

- Lacave, R., Larsen, C.-J., and Robert, J. (2005). *Cancérologie fondamentale* (Montrouge (Hauts-de-Seine): John Libbey Eurotext).
- Lan, K.-H., Liu, Y.-C., Shih, Y.-S., Tsaid, C.-L., Yen, S.-H., and Lan, K.-L. (2013). A DNA vaccine against cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) prevents tumor growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 440, 222–228.
- Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., and Fessi, H. (2012). Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology* 1, 147-168.
- Leroux-Roels, G., Maes, C., Clement, F., van Engelenburg, F., van den Dobbelsteen, M., Adler, M., Amacker, M., Lopalco, L., Bomsel, M., Chalifour, A., *et al.* (2013). Randomized Phase I: Safety, Immunogenicity and Mucosal Antiviral Activity in Young Healthy Women Vaccinated with HIV-1 Gp41 P1 Peptide on Virosomes. *PloS one* 8, e55438.
- Li, A.V., Moon, J.J., Abraham, W., Suh, H., Elkhader, J., Seidman, M.A., Yen, M., Im, E.J., Foley, M.H., Barouch, D.H., *et al.* (2013). Generation of effector memory T cell-based mucosal and systemic immunity with pulmonary nanoparticle vaccination. *Science translational medicine* 5, 204ra130.
- Ling, J., Liao, H., Clark, R., Wong, M.S., and Lo, D.D. (2008). Structural constraints for the binding of short peptides to claudin-4 revealed by surface plasmon resonance. *The Journal of biological chemistry* 283, 30585-30595.
- Liu, T.Y., Hussein, W.M., Jia, Z., Ziora, Z.M., McMillan, N.A., Monteiro, M.J., Toth, I., and Skwarczynski, M. (2013). Self-adjuvanting polymer-peptide conjugates as therapeutic vaccine candidates against cervical cancer. *Biomacromolecules* 14, 2798-2806.
- Lo, D.D., Ling, J., and Eckelhoefer, A.H. (2012). M cell targeting by a Claudin 4 targeting peptide can enhance mucosal IgA responses. *BMC biotechnology* 12, 7.
- Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., and Xia, B. (2012). CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology* 2012, 925135.
- Lycke, N. (2012). Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nature reviews Immunology* 12, 592-605.
- Makidon, P.E., Bielinska, A.U., Nigavekar, S.S., Janczak, K.W., Knowlton, J., Scott, A.J., Mank, N., Cao, Z., Rathinavelu, S., Beer, M.R., *et al.* (2008). Pre-clinical evaluation of a novel nanoemulsion-based hepatitis B mucosal vaccine. *PloS One* 3, e2954.
- Mamo, T., and Poland, G.A. (2012). Nanovaccinology: the next generation of vaccines meets 21st century materials science and engineering. *Vaccine* 30, 6609-6611.

- Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P., and Bachmann, M.F. (2008). Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European journal of immunology* 38, 1404-1413.
- Markov, O.O., Mironova, N.L., Maslov, M.A., Petukhov, I.A., Morozova, N.G., Vlassov, V.V., and Zenkova, M.A. (2012). Novel cationic liposomes provide highly efficient delivery of DNA and RNA into dendritic cell progenitors and their immature offsets. *Journal of Controlled Release* 160, 200-210.
- Matsuo, K., Koizumi, H., Akashi, M., Nakagawa, S., Fujita, T., Yamamoto, A., and Okada, N. (2011). Intranasal immunization with poly(gamma-glutamic acid) nanoparticles entrapping antigenic proteins can induce potent tumor immunity. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 152, 310-316.
- Maurer-Gebhard, M., Schmidt, M., Azemar, M., Stocklin, E., Wels, W., and Groner, B. (1999). A novel animal model for the evaluation of the efficacy of drugs directed against the ErbB2 receptor on metastasis formation. *Hybridoma* 18, 69-75.
- McCarthy, E.F. (2006). The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *The Iowa orthopaedic journal* 26, 154-158.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews Immunology* 1, 135-145.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current opinion in immunology* 9, 4-9.
- Michallet, M.C., Rota, G., Maslowski, K., and Guarda, G. (2013). Innate receptors for adaptive immunity. *Current opinion in microbiology* 16, 296-302.
- Mills, K.H. (2008). Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *European journal of immunology* 38, 2636-2649.
- Mishra, H., Mishra, D., Mishra, P.K., Nahar, M., Dubey, V., and Jain, N.K. (2010). Evaluation of solid lipid nanoparticles as carriers for delivery of hepatitis B surface antigen for vaccination using subcutaneous route. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* 13, 495-509.
- Mocan, T., and Iancu, C. (2011). Effective colon cancer prophylaxis in mice using embryonic stem cells and carbon nanotubes. *International journal of nanomedicine* 6, 1945-1954.
- Moon, J.J., Suh, H., Li, A.V., Ockenhouse, C.F., Yadava, A., and Irvine, D.J. (2012). Enhancing humoral responses to a malaria antigen with nanoparticle vaccines that expand Tfh cells and promote germinal center induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 1080-1085.

- Mukhopadhyay, A., Dyring, C., and Stott, D.I. (2014). Comparison of prophylactic and therapeutic immunisation with an ErbB-2 (HER2) fusion protein and immunoglobulin V-gene repertoire analysis in a transgenic mouse model of spontaneous breast cancer. *Vaccine* 32, 1012-1018.
- Muller, R.H., Mader, K., and Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50, 161-177.
- Nacer, A., Carapau, D., Mitchell, R., Meltzer, A., Shaw, A., Frevert, U., and Nardin, E.H. (2014). Imaging murine NALT following intranasal immunization with flagellin-modified circumsporozoite protein malaria vaccines. *Mucosal immunology* 7, 304-314.
- Nagata, Y., Furugen, R., Hiasa, A., Ikeda, H., Ohta, N., Furukawa, K., Nakamura, H., Furukawa, K., Kanematsu, T., and Shiku, H. (1997). Peptides derived from a wild-type murine proto-oncogene c-erbB-2/HER2/neu can induce CTL and tumor suppression in syngeneic hosts. *Journal of immunology* 159, 1336-1343.
- Nakamura, T., Moriguchi, R., Kogure, K., and Harashima, H. (2013a). Incorporation of polyinosine-polycytidylic acid enhances cytotoxic T cell activity and antitumor effects by octaarginine-modified liposomes encapsulating antigen, but not by octaarginine-modified antigen complex. *International journal of pharmaceutics* 441, 476-481.
- Nakamura, T., Moriguchi, R., Kogure, K., Shastri, N., and Harashima, H. (2008). Efficient MHC class I presentation by controlled intracellular trafficking of antigens in octaarginine-modified liposomes. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16, 1507-1514.
- Nakamura, T., Yamazaki, D., Yamauchi, J., and Harashima, H. (2013b). The nanoparticulation by octaarginine-modified liposome improves alpha-galactosylceramide-mediated antitumor therapy via systemic administration. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 171, 216-224.
- Nardelli-Haeffliger, D., Lurati, F., Wirthner, D., Spertini, F., Schiller, J.T., Lowy, D.R., Ponci, F., and De Grandi, P. (2005). Immune responses induced by lower airway mucosal immunisation with a human papillomavirus type 16 virus-like particle vaccine. *Vaccine* 23, 3634-3641.
- Nayak, A., Dodagatta-Marri, E., Tsolaki, A.G., and Kishore, U. (2012). An Insight into the Diverse Roles of Surfactant Proteins, SP-A and SP-D in Innate and Adaptive Immunity. *Frontiers in immunology* 3, 131.
- Nembrini, C., Stano, A., Dane, K.Y., Ballester, M., van der Vlies, A.J., Marsland, B.J., Swartz, M.A., and Hubbell, J.A. (2011). Nanoparticle conjugation of antigen enhances cytotoxic T-cell responses in pulmonary vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, E989-997.

- Niikura, K., Matsunaga, T., Suzuki, T., Kobayashi, S., Yamaguchi, H., Orba, Y., Kawaguchi, A., Hasegawa, H., Kajino, K., Ninomiya, T., *et al.* (2013). Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS nano* 7, 3926-3938.
- Nordly, P., Korsholmb, K.S., Pedersena, E.A., Khiljia, T.S., Franzykc, H., Jorgensena, L., Nielsena, H.M., Aggerb, E.M., and Foged, C. (2011). Incorporation of a synthetic mycobacterial monomycoloyl glycerol analogue stabilizes dimethyldioctadecylammonium liposomes and potentiates their adjuvant effect in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 77, 89–98.
- Oda, Y., Suzuki, R., Otake, S., Nishiie, N., Hirata, K., Koshima, R., Nomura, T., Utoguchi, N., Kudo, N., Tachibana, K., *et al.* (2012). Prophylactic immunization with Bubble liposomes and ultrasound-treated dendritic cells provided a four-fold decrease in the frequency of melanoma lung metastasis. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 160, 362-366.
- Ostrand-Rosenberg, S. (2008). Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Current opinion in genetics & development* 18, 11-18.
- Pantarotto, D., Partidos, C.D., Hoebeke, J., Brown, F., Kramer, E., Briand, J.P., Muller, S., Prato, M., and Bianco, A. (2003). Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chemistry & biology* 10, 961-966.
- Pastva, A.M., Wright, J.R., and Williams, K.L. (2007). Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 4, 252-257.
- Patel, G.B., Zhou, H., Ponce, A., Harris, G., and Chen, W. (2010). Intranasal immunization with an archaeal lipid mucosal vaccine adjuvant and delivery formulation protects against a respiratory pathogen challenge. *PloS one* 5, e15574.
- Pavot, V., Rochereau, N., Genin, C., Verrier, B., and Paul, S. (2012). New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine* 30, 142-154.
- Pawar, D., Mangal, S., Goswami, R., and Jaganathan, K.S. (2013). Development and characterization of surface modified PLGA nanoparticles for nasal vaccine delivery: effect of mucoadhesive coating on antigen uptake and immune adjuvant activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 85, 550-559.
- Peek, L.J., Middaugh, C.R., and Berkland, C. (2008). Nanotechnology in vaccine delivery. *Advanced drug delivery reviews* 60, 915-928.
- Phua, K.K., Staats, H.F., Leong, K.W., and Nair, S.K. (2014). Intranasal mRNA nanoparticle vaccination induces prophylactic and therapeutic anti-tumor immunity. *Scientific reports* 4, 5128.
- Pichon, C., and Midoux, P. (2013). Mannosylated and histidylated LPR technology for vaccination with tumor antigen mRNA. *Methods in molecular biology* 969, 247-274.

- Pires, A., Fortuna, A., Alves, G., and Falcao, A. (2009). Intranasal drug delivery: how, why and what for? *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* 12, 288-311.
- Plum, S.M., Holaday, J.W., Ruiz, A., Madsen, J.W., Fogler, W.E., and Fortier, A.H. (2000). Administration of a liposomal FGF-2 peptide vaccine leads to abrogation of FGF-2-mediated angiogenesis and tumor development. *Vaccine* 19, 1294-1303.
- Pollastri, M.P., Porter, N.A., McIntosh, T.J., and Simon, S.A. (2000). Synthesis, structure, and thermal properties of 1,2-dipalmitoylgalloylglycerol (DPGG), a novel self-adhering lipid. *Chemistry and physics of lipids* 104, 67-74.
- Prasanthi, D., and Lakshmi, P.K. (2012). Vesicles – Mechanism of transdermal permeation: areview *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 5, 18-25.
- Prathyusha, K., Muthukumar, M., and Krishnamoorthy, B. (2013). Liposomes as targeted drug delivery systems present and future prospectives: a review. *Journal of drug delivery and therapeutics* 3, 195-201.
- Rackley, C.R., and Stripp, B.R. (2012). Building and maintaining the epithelium of the lung. *The Journal of clinical investigation* 122, 2724-2730.
- Rajapaksa, T.E., Stover-Hamer, M., Fernandez, X., Eckelhoefer, H.A., and Lo, D.D. (2010). Claudin 4-targeted protein incorporated into PLGA nanoparticles can mediate M cell targeted delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 142, 196-205.
- Randell, S.H., Boucher, R.C., and University of North Carolina Virtual Lung, G. (2006). Effective mucus clearance is essential for respiratory health. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 35, 20-28.
- Reilly, R.T., Gottlieb, M.B., Ercolini, A.M., Machiels, J.P., Kane, C.E., Okoye, F.I., Muller, W.J., Dixon, K.H., and Jaffee, E.M. (2000). HER-2/neu is a tumor rejection target in tolerized HER-2/neu transgenic mice. *Cancer research* 60, 3569-3576.
- Rodriguez-Monroy, M.A., and Moreno-Fierros, L. (2010). Striking activation of NALT and nasal passages lymphocytes induced by intranasal immunization with Cry1Ac protoxin. *Scandinavian Journal of Immunology* 71, 159-168.
- Roos, A.K., Pavlenko, M., Charo, J., Egevad, L., and Pisa, P. (2005). Induction of PSA-specific CTLs and anti-tumor immunity by a genetic prostate cancer vaccine. *The Prostate* 62, 217-223.
- Rosada, R.S., de la Torre, L.G., Frantz, F.G., Trombone, A.P., Zarate-Blades, C.R., Fonseca, D.M., Souza, P.R., Brandao, I.T., Masson, A.P., Soares, E.G., *et al.* (2008). Protection against tuberculosis by a single intranasal administration of DNA-hsp65 vaccine complexed with cationic liposomes. *BMC immunology* 9, 38.
- Roth, A., Rohrbach, F., Weth, R., Frisch, B., Schuber, F., and Wels, W.S. (2005). Induction of effective and antigen-specific antitumour immunity by a liposomal

- ErbB2/HER2 p.ptide-based vaccination construct. *British Journal Cancer* 92, 1421–1429.
- Rouser, G., Fkeischer, S., and Yamamoto, A. (1970). Two dimensional then layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5, 494-496.
- Sahdev, P., Ochyl, L.J., and Moon, J.J. (2014). Biomaterials for Nanoparticle Vaccine Delivery Systems. *Pharmaceutical research* 31, 2563-2582.
- Said Hassane, F., Phalipon, A., Tanguy, M., Guerreiro, C., Belot, F., Frisch, B., Mulard, L.A., and Schuber, F. (2009). Rational design and immunogenicity of liposome-based diepitope constructs: application to synthetic oligosaccharides mimicking the *Shigella flexneri* 2a O-antigen. *Vaccine* 27, 5419-5426.
- Sakaue, G., Hiroi, T., Nakagawa, Y., Someya, K., Iwatani, K., Sawa, Y., Takahashi, H., Honda, M., Kunisawa, J., and Kiyono, H. (2003). HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160-encapsulated hemagglutinating virus of Japan-liposome induces antigen-specific CTLs and neutralizing antibody responses. *Journal of immunology* 170, 495-502.
- Samad, A., Sultana, Y., and Aqil, M. (2007). Liposomal drug delivery systems: an update review. *Current drug delivery* 4, 297-305.
- Samet, J.M., and Cheng, P.W. (1994). The role of airway mucus in pulmonary toxicology. *Environmental health perspectives* 102 Suppl 2, 89-103.
- Sanders, M.T., Brown, L.E., Deliyannis, G., and Pearse, M.J. (2005). ISCOM-based vaccines: the second decade. *Immunology and cell biology* 83, 119-128.
- Sandoval, F., Terme, M., Nizard, M., Badoual, C., Bureau, M.F., Freyburger, L., Clement, O., Marcheteau, E., Gey, A., Fraisse, G., *et al.* (2013). Mucosal imprinting of vaccine-induced CD8(+) T cells is crucial to inhibit the growth of mucosal tumors. *Science translational medicine* 5, 172ra120.
- Santosuosso, M., Zhang, X., McCormick, S., Wang, J., Hitt, M., and Xing, Z. (2005). Mechanisms of mucosal and parenteral tuberculosis vaccinations: adenoviral-based mucosal immunization preferentially elicits sustained accumulation of immune protective CD4 and CD8 T cells within the airway lumen. *Journal of immunology* 174, 7986-7994.
- Sarei, F., Dounighi, N.M., Zolfagharian, H., Khaki, P., and Bidhendi, S.M. (2013). Alginate nanoparticles as a promising adjuvant and vaccine delivery system. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 75, 442-449.
- Sawaengsak, C., Mori, Y., Yamanishi, K., Mitrevej, A., and Sinchaipanid, N. (2014). Chitosan nanoparticle encapsulated hemagglutinin-split influenza virus mucosal vaccine. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech* 15, 317-325.

- Schelte, P., Boeckler, C., Frisch, B., and Schuber, F. (2000). Differential reactivity of maleimide and bromoacetyl functions with thiols: application to the preparation of liposomal diepitope constructs. *Bioconjugate Chemistry* *11*, 118-123.
- Schmidt, R., and DeWolf, C.E. (2004). Monolayer behavior of 1,2-dipalmitoylgalloylglycerol, a synthetic lipid with strong cohesive properties. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* *20*, 3284-3288.
- Serra, L., Domenech, J., and Peppas, N.A. (2009). Engineering design and molecular dynamics of mucoadhesive drug delivery systems as targeting agents. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* *71*, 519-528.
- Shafique, M., Meijerhof, T., Wilschut, J., and de Haan, A. (2013). Evaluation of an intranasal virosomal vaccine against respiratory syncytial virus in mice: effect of TLR2 and NOD2 ligands on induction of systemic and mucosal immune responses. *PLoS one* *8*, e61287.
- Shariat, S., Badiee, A., Jaafari, M.R., and Mortazavi, S.A. (2014). Optimization of a Method to Prepare Liposomes Containing HER2/Neu- Derived Peptide as a Vaccine Delivery System for Breast Cancer. *Iranian journal of pharmaceutical research* *13*, 15-25.
- Shen, H., Ackerman, A.L., Cody, V., Giodini, A., Hinson, E.R., Cresswell, P., Edelson, R.L., Saltzman, W.M., and Hanlon, D.J. (2006). Enhanced and prolonged cross-presentation following endosomal escape of exogenous antigens encapsulated in biodegradable nanoparticles. *Immunology* *117*, 78-88.
- Sheng, W.Y., and Huang, L. (2011). Cancer immunotherapy and nanomedicine. *Pharmaceutical research* *28*, 200-214.
- Shima, F., Uto, T., Akagi, T., Baba, M., and Akashi, M. (2013). Size effect of amphiphilic poly(γ -glutamic acid) nanoparticles on cellular uptake and maturation of dendritic cells in vivo. *Acta biomaterialia* *9*, 8894-8901.
- Siegel, P.M., Dankort, D.L., Hardy, W.R., and Muller, W.J. (1994). Novel activating mutations in the neu proto-oncogene involved in induction of mammary tumors. *Molecular and cellular biology* *14*, 7068-7077.
- Singh, M., Briones, M., and O'Hagan, D.T. (2001). A novel bioadhesive intranasal delivery system for inactivated influenza vaccines. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* *70*, 267-276.
- Skwarczynski, M., and Toth, I. (2011). Peptide-based subunit nanovaccines. *Current drug delivery* *8*, 282-289.
- Slovin, S. (2012). Chemotherapy and immunotherapy combination in advanced prostate cancer. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O* *10*, 90-100.
- Slutter, B., Bal, S., Keijzer, C., Mallants, R., Hagenaars, N., Que, I., Kaijzel, E., van Eden, W., Augustijns, P., Lowik, C., *et al.* (2010). Nasal vaccination with N-trimethyl chitosan and PLGA based nanoparticles: nanoparticle characteristics determine

- quality and strength of the antibody response in mice against the encapsulated antigen. *Vaccine* 28, 6282-6291.
- Smith, D.J., Gaffney, E.A., and Blake, J.R. (2008). Modelling mucociliary clearance. *Respiratory physiology & neurobiology* 163, 178-188.
- Smith, D.M., Simon, J.K., and Baker, J.R., Jr. (2013). Applications of nanotechnology for immunology. *Nature reviews Immunology* 13, 592-605.
- Soane, R.J., Frier, M., Perkins, A.C., Jones, N.S., Davis, S.S., and Illum, L. (1999). Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans. *International journal of pharmaceutics* 178, 55-65.
- Sogias, I.A., Williams, A.C., and Khutoryanskiy, V.V. (2008). Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules* 9, 1837-1842.
- Sou, T., Meeusen, E.N., de Veer, M., Morton, D.A., Kaminskas, L.M., and McIntosh, M.P. (2011). New developments in dry powder pulmonary vaccine delivery. *Trends in biotechnology* 29, 191-198.
- Southam, D.S., Dolovich, M., O'Byrne, P.M., and Inman, M.D. (2002). Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 282, L833-839.
- Spit, B.J., Hendriksen, E.G., Bruijntjes, J.P., and Kuper, C.F. (1989). Nasal lymphoid tissue in the rat. *Cell and tissue research* 255, 193-198.
- Suzuki, H., Kakutani, H., Kondoh, M., Watari, A., and Yagi, K. (2010). The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Die Pharmazie* 65, 766-769.
- Suzuki, H., Kondoh, M., Kakutani, H., Yamane, S., Uchida, H., Hamakubo, T., and Yagi, K. (2012). The application of an alanine-substituted mutant of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin as a mucosal vaccine in mice. *Biomaterials* 33, 317-324.
- Tacken, P.J., Torensma, R., and Figdor, C.G. (2006). Targeting antigens to dendritic cells in vivo. *Immunobiology* 211, 599-608.
- Tafaghodi, M., Jaafari, M.R., and Sajadi Tabassi, S.A. (2006). Nasal immunization studies using liposomes loaded with tetanus toxoid and CpG-ODN. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 64, 138-145.
- Takahashi, A., Kondoh, M., Uchida, H., Kakamu, Y., Hamakubo, T., and Yagi, K. (2011). Mutated C-terminal fragments of *Clostridium perfringens* enterotoxin have increased affinity to claudin-4 and reversibly modulate tight junctions in vitro. *Biochemical Biophysical Research Communications* 410, 466-470.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-820.

- Tao, W., Ziemer, K.S., and Gill, H.S. (2014). Gold nanoparticle-M2e conjugate coformulated with CpG induces protective immunity against influenza A virus. *Nanomedicine (Lond)* 9, 237-251.
- Terabe, M., and Berzofsky, J.A. (2008). The role of NKT cells in tumor immunity. *Advances in cancer research* 101, 277-348.
- Thomann, J.S., Heurtault, B., Weidner, S., Braye, M., Beyrath, J., Fournel, S., Schuber, F., and Frisch, B. (2011). Antitumor activity of liposomal ErbB2/HER2 epitope peptide-based vaccine constructs incorporating TLR agonists and mannose receptor targeting. *Biomaterials* 32, 4574-4583.
- Thomas, C., Rawat, A., Hope-Weeks, L., and Ahsan, F. (2011). Aerosolized PLA and PLGA nanoparticles enhance humoral, mucosal and cytokine responses to hepatitis B vaccine. *Molecular pharmaceutics* 8, 405-415.
- Tonnis, W.F., Kersten, G.F., Frijlink, H.W., Hinrichs, W.L., de Boer, A.H., and Amorij, J.P. (2012). Pulmonary vaccine delivery: a realistic approach? *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* 25, 249-260.
- Toraskar, M.P., Pande, V.G., and Kadam, V.J. (2011). Dendrimer: a new approach in pharmacy. *International journal of research in pharmacy and chemistry* 1, 1100-1107.
- Torchilin, V.P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews Drug discovery* 4, 145-160.
- Tran, K.K., and Shen, H. (2009). The role of phagosomal pH on the size-dependent efficiency of cross-presentation by dendritic cells. *Biomaterials* 30, 1356-1362.
- Trauer, S., Richter, H., Kuntsche, J., Buttemeyer, R., Liebsch, M., Linscheid, M., Fahr, A., Schafer-Korting, M., Lademann, J., and Patzelt, A. (2014). Influence of massage and occlusion on the ex vivo skin penetration of rigid liposomes and invasomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 86, 301-306.
- Tschernig, T., and Pabst, R. (2000). Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is not present in the normal adult lung but in different diseases. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 68, 1-8.
- Uchida, H., Kondoh, M., Hanada, T., Takahashi, A., Hamakubo, T., and Yagi, K. (2010). A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide. *Biochemical pharmacology* 79, 1437-1444.
- Ugwoke, M.I., Agu, R.U., Verbeke, N., and Kinget, R. (2005). Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives. *Advanced drug delivery reviews* 57, 1640-1665.
- Van den Eynde, B.J., and van der Bruggen, P. (1997). T cell defined tumor antigens. *Current opinion in immunology* 9, 684-693.

- Vareille, M., Kieninger, E., Edwards, M.R., and Regamey, N. (2011). The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clinical microbiology reviews* 24, 210-229.
- Vignali, D.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature reviews Immunology* 8, 523-532.
- Vila, A., Sanchez, A., Janes, K., Behrens, I., Kissel, T., Vila Jato, J.L., and Alonso, M.J. (2004). Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57, 123-131.
- Villa, C.H., Dao, T., Ahearn, I., Fehrenbacher, N., Casey, E., Rey, D.A., Korontsvit, T., Zakhaleva, V., Batt, C.A., Philips, M.R., *et al.* (2011). Single-walled carbon nanotubes deliver peptide antigen into dendritic cells and enhance IgG responses to tumor-associated antigens. *ACS nano* 5, 5300–5311.
- Voynow, J.A., and Rubin, B.K. (2009). Mucins, mucus, and sputum. *Chest* 135, 505-512.
- Vujanic, A., Snibson, K.J., Wee, J.L., Edwards, S.J., Pearse, M.J., Scheerlinck, J.P., and Sutton, P. (2012a). Long-term antibody and immune memory response induced by pulmonary delivery of the influenza Iscomatrix vaccine. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 19, 79-83.
- Vujanic, A., Sutton, P., Snibson, K.J., Yen, H.H., and Scheerlinck, J.P. (2012b). Mucosal vaccination: lung versus nose. *Veterinary immunology and immunopathology* 148, 172-177.
- Wadhwa, S., Jain, A., Woodward, J.G., and Mumper, R.J. (2012). Lipid nanocapsule as vaccine carriers for his-tagged proteins: evaluation of antigen-specific immune responses to HIV I His-Gag p41 and systemic inflammatory responses. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 80, 315-322.
- Wang, H.W., Jiang, P.L., Lin, S.F., Lin, H.J., Ou, K.L., Deng, W.P., Lee, L.W., Huang, Y.Y., Liang, P.H., and Liu, D.Z. (2013). Application of galactose-modified liposomes as a potent antigen presenting cell targeted carrier for intranasal immunization. *Acta biomaterialia* 9, 5681-5688.
- Wang, X., Dai, Y., Zhao, S., Tang, J., Li, H., Xing, Y., Qu, G., Li, X., Dai, J., Zhu, Y., *et al.* (2014). PAMAM-Lys, a novel vaccine delivery vector, enhances the protective effects of the SjC23 DNA vaccine against *Schistosoma japonicum* infection. *PloS one* 9, e86578.
- Wang, X.G., Revskaya, E., Bryan, R.A., Strickler, H.D., Burk, R.D., Casadevall, A., and Dadachova, E. (2007). Treating cancer as an infectious disease--viral antigens as novel targets for treatment and potential prevention of tumors of viral etiology. *PloS one* 2, e1114.
- Watson, D.S., Endsley, A.N., and Huang, L. (2012). Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine* 30, 2256-2272.

- Weiner, L.M., Surana, R., and Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature reviews Immunology* *10*, 317-327.
- Wiedermann, U., Wiltschke, C., Jasinska, J., Kundi, M., Zurbriggen, R., Garner-Spitzer, E., Bartsch, R., Steger, G., Pehamberger, H., Scheiner, O., *et al.* (2010). A virosomal formulated Her-2/neu multi-peptide vaccine induces Her-2/neu-specific immune responses in patients with metastatic breast cancer: a phase I study. *Breast cancer research and treatment* *119*, 673-683.
- Xu, Z., Ramishetti, S., Tseng, Y.C., Guo, S., Wang, Y., and Huang, L. (2013). Multifunctional nanoparticles co-delivering Trp2 peptide and CpG adjuvant induce potent cytotoxic T-lymphocyte response against melanoma and its lung metastasis. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* *172*, 259-265.
- Yao, W., Peng, Y., Du, M., Luo, J., and Zong, L. (2013). Preventative vaccine-loaded mannosylated chitosan nanoparticles intended for nasal mucosal delivery enhance immune responses and potent tumor immunity. *Molecular pharmaceutics* *10*, 2904-2914.
- Ye, Q., Chen, B., Tong, Z., Nakamura, S., Sarria, R., Costabel, U., and Guzman, J. (2006). Thalidomide reduces IL-18, IL-8 and TNF-alpha release from alveolar macrophages in interstitial lung disease. *The European respiratory journal* *28*, 824-831.
- Zhang, J., Tian, H., Li, C., Cheng, L., Zhang, S., Zhang, X., Wanga, R., Xu, F., Dai, L., Shi, G., *et al.* (2013). Antitumor effects obtained by autologous Lewis lung cancer cell vaccine engineered to secrete mouse interleukin 27 by means of cationic liposome. *Molecular Immunology* *55*, 264-274.
- Zhao, K., Zhang, Y., Zhang, X., Li, W., Shi, C., Guo, C., Dai, C., Chen, Q., Jin, Z., Zhao, Y., *et al.* (2014a). Preparation and efficacy of Newcastle disease virus DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. *International journal of nanomedicine* *9*, 389-402.
- Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C.X., Mitter, N., Yu, C., and Middelberg, A.P. (2014b). Nanoparticle vaccines. *Vaccine* *32*, 327-337.
- Zhou, S., Kawakami, S., Yamashita, F., and Hashida, M. (2010). Intranasal administration of CpG DNA lipoplex prevents pulmonary metastasis in mice. *Cancer letters* *287*, 75-81.
- Zuercher, A.W., Coffin, S.E., Thurnheer, M.C., Fundova, P., and Cebra, J.J. (2002). Nasal-associated lymphoid tissue is a mucosal inductive site for virus-specific humoral and cellular immune responses. *Journal of immunology* *168*, 1796-1803.

Autres sources bibliographiques :

www.bioscience.org

www.brianlischer.com

www.cancerimmunity.org

www.ihest.fr/focus-mediatheque/

www.leem.org

www.tecfaetu.unige.ch

www.thelifeofapremed.tumblr.com

Conception de constructions liposomiques destinées à la vaccination antitumorale par voie respiratoire

Avec l'identification des antigènes tumoraux et la compréhension de la réponse immunitaire mucosale, la vaccination par voie respiratoire est devenue un champ d'investigation prometteur pour le traitement du cancer. L'objectif de cette thèse était de concevoir des vaccins peptidiques nanoparticulaires à base de liposomes, destinés à la vaccination antitumorale par voie respiratoire ou nasale. Ainsi, nous avons formulé des liposomes vectorisant un épitope peptidique TCD8⁺ dérivé de l'oncogène ErbB2, un épitope TCD4⁺ et une molécule adjuvante. Cette construction a ensuite été optimisée en faisant varier les caractéristiques physicochimiques du vecteur liposomique (taille, structure, composition) ou de la formulation (viscosité). L'efficacité antitumorale des différents vaccins ainsi obtenus a été évaluée après administration respiratoire ou nasale, prophylactique ou thérapeutique, dans un modèle de tumeurs pulmonaires ou de tumeurs sous-cutanées chez la souris. L'ensemble de ces travaux a montré un intérêt indéniable des vaccins peptidiques à base de liposomes dans la vaccination antitumorale par voie respiratoire et nasale, ouvrant de nouvelles perspectives pour le traitement du cancer.

Mots clés : vaccin peptidique, liposome, nanovecteur, formulation, voie respiratoire, voie nasale, cancer

With the identification of tumor antigens and the better understanding of the mucosal immune response, the vaccination by the respiratory route has become a promising field of investigation for cancer treatment. The purpose of this study was to develop nanoparticulate peptide-based liposomal vaccines for antitumor vaccination by respiratory or nasal route. Thus, we have prepared liposomes associating ErbB2 TCD8⁺ and HA TCD4⁺ peptide epitopes with an adjuvant molecule. This construct was then optimized by varying its physicochemical characteristics (size, structure, composition) or its formulation (viscosity). The antitumor efficacy of the various vaccines obtained thereby was evaluated in a model of pulmonary or subcutaneous tumors in mice after prophylactic or therapeutic, nasal or respiratory immunization. All our data showed an undeniable interest of peptide vaccines based on liposomes in the antitumor vaccination by the respiratory and nasal routes, opening new perspectives for cancer treatment.

Keywords: peptide vaccine, liposome, nanoparticle, formulation, respiratory route, nasal route, cancer

