



UFR Pharmacie

**THESE**

Présentée pour l'obtention du

**DIPLOME DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE  
REIMS-CHAMPAGNE ARDENNE**

Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

Par

**Emilie BALASSE**

Née le 24 Avril 1982 à Soissons (02)

**Les propriétés adjuvantes des microcapsules  
d'hydroxyéthyl amidon.  
Application en immunothérapie anti-mélanome**

Présentée et soutenue publiquement le 4 Décembre 2007

Membres du Jury :

Rapporteurs :	<b>Pr MAINCENT Philippe</b>	Nancy
	<b>Pr TOUNGOUZ Michel</b>	Bruxelles
Examineurs :	<b>Pr MADOULET Claudie</b>	Reims
	<b>Pr ANDRY Marie Christine</b>	Reims

Directeur de thèse : **Pr MADOULET Claudie**, EA 3796, Reims

## **REMERCIEMENTS**

***Madame le Professeur Claudie Madoulet,***

Je tiens à commencer par vous qui m'avez accueillie et fait confiance depuis mon DEA. Vous m'avez conseillée, soutenue, encouragée, motivée (« booster ») .... . Merci pour votre bonne humeur, votre humour, votre gentillesse, votre générosité....., pour la Tassimo et les restos. Veuillez trouver ici, le témoignage de ma profonde reconnaissance et ma sincère amitié.

D'après votre portrait caractérologique (à titre d'information),

- vous êtes un personnage qui a le sens des valeurs, le goût d'un certain style, une aspiration naturelle au panache. Vous aimez qu'on vous témoigne des égards.
- vous adorez être le point de mire de tous, ne reculant devant rien pour attirer l'attention et l'admiration des autres, pour briller de tous vos feux. Qu'on chante vos éloges ou se scandalise à votre sujet, peu vous importe tant que tout le monde parle de vous.
- vous ne détestez pas l'excentricité, trouvant en elle un bon moyen de vous faire remarquer.
- Tout chez vous tend vers le superlatif, les exploits comme les erreurs. Vous n'acceptez jamais la médiocrité et l'anonymat. D'une énergie inépuisable, vous pouvez facilement devenir une personnalité célèbre, une bienfaitrice de l'humanité si vous avez la chance ou la perspicacité de vous choisir une noble entreprise et de vous engager dans la bonne voie. Mais vous pouvez tout aussi facilement devenir une redoutable ennemie de la société si vous vous orientez dans de mauvaises directions : vous mettrez alors vos formidables forces au service du mal.
- vous êtes douée de grandes qualités de coeur, dont la noblesse et la générosité. Votre fidélité et votre loyauté sont sans faille. Vous ne connaissez ni la rancune ni la vengeance : quelque tort qu'on ait pu vous faire, vous le pardonnez facilement et l'oubliez avec une parfaite aisance. Vous avez en horreur la mesquinerie et l'hypocrisie, et rien ne vous met plus en colère que la médisance et la calomnie. Vous êtes aussi capable d'un grand dévouement et de grands sacrifices pour les êtres qui vous sont chers. Ajoutons à ce palmarès l'honnêteté et la sincérité au-dessus de tout reproche ainsi qu'un courage à toute épreuve.

Madame « Madurebeau », tout cela colle plutôt bien avec votre personnalité, non ?  
Moi, si je devais vous décrire, je vous comparerais à une ***Porsche Cayenne***. Comme elle, vous démarrez au quart de tour et toujours sur les chapeaux de roues, vous avez un moteur inépuisable, une tenue de route parfaite, une superbe panoplie de pneumatiques (je parle bien sûr de vos chaussures), une carrosserie et un look d'enfer.

Autrement, pour rester poétique, votre personnage me rappelle l'unicité d'un soldat de plomb minutieusement façonné et décoré.

Pour ce que vous êtes, MERCI

***Madame le Professeur Marie Christine Andry,***

Pour votre accueil, votre gentillesse, votre disponibilité et vos conseils, MERCI. Le plus important restera toujours pour moi la confiance que vous m'avez témoignée durant ces années.

***Monsieur le Professeur Philippe Maincent,***

Vous me faites l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Je vous remercie d'avoir accepté de la juger et vous exprime ma reconnaissance.

***Monsieur le Professeur Michel Toungouz,***

Vous me faites l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Je vous remercie d'avoir accepté de la juger et vous exprime ma reconnaissance.

Je remercie **Johann Odot** de son amitié, de ses conseils et de son aide. Merci, entre autre, pour les souris, les tests LDH et la cytométrie.

Merci aussi à mon collègue de bureau **Grégory Gatouillat** pour sa discrétion, sa gentillesse et surtout pour ses talents d'anglais.

A mes **souris**, Droite, Gauche, Rien..., merci pour votre coopération. Je sais que Tata Claudie et Tonton Johann n'ont pas toujours été très gentils avec vous, alors pour eux pardon.

Merci à toute **l'équipe du laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire** de l'UFR Sciences de Reims pour leur accueil, leur aide et leur disponibilité.

Une pensée amicale à toute ma promo de DEA, **Nicolas, Franck, Kamel, Jessica, Emilie, Ali...** Ca y est, c'est fini.

A ma **famille**, mes **parents**, mes **sœurs** et mes **amis** pour leur soutien et leur présence.

Merci à **Xavier** pour sa compréhension, son soutien moral, sa patience à toute épreuve et surtout sa présence.

## RESUME

Devant l'augmentation de fréquence du mélanome et la découverte des antigènes associés aux tumeurs suggérant un rôle du système immunitaire dans le traitement du cancer, de nouvelles approches d'immunothérapies actives pour la prévention et le traitement du mélanome ont été développées.

Nous avons testé une stratégie d'immunothérapie anti-mélanome par injection de protéines solubles extraites de cellules de mélanome murin B16 résistantes à la doxorubicine (B16R) encapsulées ou non dans des microcapsules d'hydroxyéthyl amidon (HEA). Cette stratégie a été réalisée dans le but d'améliorer la présentation des protéines aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et ainsi augmenter leur immunogénicité.

Nous avons montré que les microcapsules d'HEA sont, entre autre, biocompatibles, biodégradables, faciles à produire et à utiliser pour le chargement des antigènes. Ces propriétés intéressantes suggèrent leur utilisation *in vivo* en tant que système de libération/présentation de peptides ou protéines.

Nous nous sommes intéressés aux propriétés adjuvantes des microcapsules sur la réponse immunitaire anti-sérum albumine bovine (SAB). Elles sont 1) immunologiquement inertes, 2) capables d'être internalisées par des cellules mononucléées, 3) de potentialiser la réponse immunitaire contre la SAB, et 4) d'induire à la fois une réponse de type Th<sub>1</sub> et Th<sub>2</sub>.

Nous avons montré que les injections prophylactiques sous-cutanées de protéines B16R encapsulées ou non ralentissent le développement tumoral. L'étude des mécanismes immunitaires impliqués dans ces ralentissements montre l'induction d'une réponse humorale anti-cellules B16R avec un nombre de cellules CD8 supérieur chez les animaux prétraités. Les cellules B16R *in vitro* et *in vivo* n'expriment pas de molécule de Classe I, les ralentissements de la progression tumorale ne peuvent donc pas être dus à l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire spécifique. De plus, les activités cytolytiques des cellules spléniques sont supérieures lorsque les cellules cibles expriment des molécules de Classe I. Ces résultats mettent en évidence le rôle important des molécules de classe I dans l'établissement d'une immunité anti-tumorale spécifique efficace.

**MOTS-CLES :** Mélanome, Immunothérapie, Antigènes associés aux tumeurs, Cellules présentatrices d'antigènes, Microcapsules, Hydroxyéthyl amidon.

## ABSTRACT

Malignant melanoma is on the rise in fair-skinned societies. The discovery of melanoma-associated antigens by T cells led to the development of new active approaches of immunotherapy.

We have tested a new strategy of anti-melanoma immunotherapy. To do that, hydroxyethylstarch (HES) microparticles were designed and used to encapsulate proteins extracted from a doxorubicin-resistant B16 murine melanoma cell line (B16R). The aim of this strategy was to improve protein presentation to antigen-presenting cells and therefore increase their immunogenicity.

We have demonstrated that HES microparticles exhibit the required features for peptide or protein delivery systems, such as biocompatibility and biodegradability. Moreover, they are easy to produce and to use for loading of antigens.

We have studied the adjuvant properties of HES microparticles on the immune response against bovine serum albumin (BSA). These particles 1) are not immunogenic, 2) can be internalized by mononuclear cells, 3) enhance the immune response against BSA, and 4) induce both Th1 and Th2-mediated responses.

We have shown that subcutaneous prophylactic injections of free or encapsulated B16R proteins induced a weak slowing down in tumour development. Immunological studies revealed that this impair tumour growth was correlated with high levels of CD8 T cells in the treated animals. Since B16R cells do not express class I molecules both in vitro and in vivo, the reduction of tumour growth was not mediated by a specific cellular immune response. Moreover the cytolytic activity of spleen cells was higher when the target cells expressed MHC class I molecules. These results highlight the significant part of MHC class I molecules in the establishment of an effective anti-tumour immunity.

**KEYWORDS:** Melanoma, Immunotherapy, Tumour-associated antigens, Antigen-presenting cells, Microparticles, Hydroxyethylstarch.

## **SOMMAIRE**

<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>I/ Le cancer : définition et généralités</b>	1
<b>II/ L'immunité antitumorale</b>	2
1. Historique	2
2. La théorie de l'immunosurveillance	3
3. L'immunogénicité des cellules tumorales : Bases moléculaires de la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire	4
3. 1. Identification des antigènes tumoraux	4
3. 2. Classification des antigènes tumoraux	5
3. 2. 1. Les antigènes « cancer testis »	5
3. 2. 2. Les antigènes de différenciation tissulaire	6
3. 2. 3. Les protéines anormales spécifiques de tumeurs	6
3. 2. 4. Les antigènes ubiquitaires surexprimés	7
3. 2. 5. Les antigènes viraux	7
4. Les mécanismes de défense antitumorales	8
4. 1. L'immunité innée	8
4. 2. L'immunité adaptative ou acquise	11
4. 2. 1. Les cellules présentatrices d'antigènes	11
4. 2. 2. Les mécanismes effecteurs de l'immunité adaptative antitumorale	15
4. 2. 2. 1. L'immunité adaptative antitumorale lymphocytes T dépendante	15
4. 2. 2. 2. L'immunité adaptative antitumorale anticorps dépendante	16
<b>III/ Le Mélanome</b>	17
1. Définition	17
2. Epidémiologie	18
3. Les traitements	19
3. 1. La chirurgie	19
3. 2. La chimiothérapie	19
3. 2. 1. Principe	19
3. 2. 2. Les molécules utilisées	20
3. 2. 3. La chimiorésistance	21
3. 2. 4. Les effets secondaires de la chimiothérapie	22
3. 2. 5. Conclusions	22
3. 3. L'immunothérapie	23
3. 3. 1. L'immunothérapie passive	23
3. 3. 1. 1. Les traitements du mélanome par interféron- $\alpha$	23
3. 3. 1. 2. Les traitements du mélanome par interleukine-2/25	25
3. 3. 2. L'immunothérapie active ou vaccination anti-mélanome	26
3. 3. 2. 1. Les vaccins de première génération	26
3. 3. 2. 2. Les vaccins de deuxième génération (antigènes spécifiques)	28
3. 3. 2. 3. Les vaccins de troisième génération	29
3. 3. 2. 4. Les effets secondaires	30
3. 3. 2. 5. Les limites de la vaccination anti-mélanome	31
3. 3. 2. 6. Conclusions	32

<b>IV/ Les adjuvants vaccinaux</b>	33
1. Définition	33
2. Classification des principaux adjuvants	33
3. Le fonctionnement général des adjuvants	34
4. Le fonctionnement individuel des principaux types d'adjuvants	35
<b>V/ Objectifs des travaux</b>	37
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	40
<b>I/ Caractérisation des microcapsules d'Hydroxyéthyl amidon</b>	40
1. Préparation des microcapsules d'hydroxyéthyl amidon (HEA)	40
2. Spectroscopie infrarouge de transformé de Fourier (FT-IR)	40
3. Examen microscopique des microcapsules	41
3. 1. Au microscope optique	41
3. 3. Au microscope électronique à balayage	41
3. 2. Au microscope confocal	41
4. La granulométrie laser	42
5. Chargement des microcapsules d'HEA avec de la SAB	43
6. Relargage <i>in vitro</i> de la SAB chargée dans les microcapsules d'HEA	44
7. La dégradation des microcapsules d'HEA	44
7. 1. La dégradation enzymatique des microcapsules d'HEA <i>in vitro</i>	44
7. 2. La dégradation <i>in vivo</i> des microcapsules d'HEA	44
<b>II/ Activité adjuvante des microcapsules d'HEA sur la réponse immunitaire anti-SAB chez la souris B6D2F1</b>	45
1. Les Souris	45
2. L'internalisation des microcapsules d'HEA par des cellules mononucléées murines	45
2. 1. Récupération des cellules mononucléées	45
2. 2. Test de phagocytose <i>in vitro</i>	45
3. Les traitements <i>in vivo</i>	46
3. 1. Composition des lots injectés	46
3. 2. Protocole d'immunisation	47
4. Prélèvements de sang et récupération du plasma	47
5. Dosage immuno-enzymatique des IgG dirigées contre la matrice des microcapsules d'HEA	48
6. Dosage immuno-enzymatique des IgG totales, IgG1 et IgG2a anti-SAB	48
7. Récupération des cellules spléniques et mise en co-culture <i>in vitro</i> avec de la SAB	49
8. Dosage immuno-enzymatique de l'IL4 et de l'IFN $\gamma$ dans les surnageants de co-culture des cellules spléniques	50
9. Test de prolifération <i>in vitro</i> des cellules spléniques co-cultivées avec de la SAB	50
10. Analyse statistique	51
<b>III/ Mise au point d'une nouvelle stratégie d'immunothérapie anti-mélanome B16R par injection de protéines solubles totales B16R chargées dans des microcapsules d'HEA</b>	51
1. Culture cellulaire	51
1. 1. Les cellules tumorales	51
1. 2. Culture de cellules en monocouche	51
1. 3. Culture de cellules en sphéroïde	52
1. 4. Test au mycoplasme	52
1. 5. Estimation de la viabilité cellulaire par le bleu trypan	53

2. Extraction des protéines solubles totales de mélanocytes tumoraux murins B16R	53
3. Chargement des microcapsules d'HEA avec les protéines solubles totales extraites de mélanocytes tumoraux murins B16R	53
4. Précipitation des protéines à l'acétone	54
5. Electrophorèse des protéines solubles totales B16R	54
6. Cytotoxicité <i>in vitro</i> des microcapsules d'HEA	54
6. 1. Cytotoxicité des microcapsules d'HEA sur les cellules B16R cultivées en monocouche	54
6. 2. Cytotoxicité des microcapsules d'HEA sur les cellules B16R cultivées en sphéroïdes	55
7. Analyse par cytométrie de flux de l'expression de molécules de Classe I à la surface des cellules B16R	55
7. 1. A la surface des cellules B16R cultivées <i>in vitro</i>	55
7. 2. A la surface des cellules B16R récupérées <i>in vivo</i>	56
7. 3. A la surface des cellules B16R stimulées <i>in vitro</i> avec de l'IFN- $\gamma$	56
8. Les traitements prophylactiques	57
8. 1. Les Souris	57
8. 2. Composition des lots injectés	57
8. 3. Protocole d'immunisation	58
8. 4. Evaluation du développement tumoral et de sa progression	58
8. 5. Prélèvement de sang et récupération du plasma	59
8. 6. Dosage immuno-enzymatique des IgG dirigées contre les cellules B16R	59
8. 7. Récupération des cellules spléniques et mise en rééducation	59
8. 8. Analyse par cytométrie en flux des populations lymphocytaires avant et après la mise en rééducation des cellules spléniques	60
8. 9. Test de relargage de la lactate déshydrogénase	61
8. 9. 1. Principe	61
8. 9. 2. Test LDH	61
9. Les traitements curatifs	62
9. 1. Les Souris	62
9. 2. Compositions des lots injectés	62
9. 3. Protocole d'immunisation	63
9. 4. Evaluation du développement tumoral et de sa progression	63

## RESULTATS 64

### I<sup>ERE</sup> PARTIE : CARACTERISATION DES MICROCAPSULES D'HEA 64

1. Faisabilité	65
2. Analyse de la membrane des microcapsules par spectroscopie Infrarouge	65
3. Etude de la morphologie des microcapsules d'HEA par différentes techniques de microscopie	66
3. 1. En microscopie optique	66
3. 2. En microscopie électronique à balayage	67
3. 3. En microscopie confocal	68
4. Evaluation de la taille des microcapsules par granulométrie laser	68
5. Détermination de la capacité et de l'efficacité de chargement des microcapsules d'HEA pour la sérum albumine bovine	69
6. Influence du temps d'imbibition sur l'efficacité de chargement des microcapsules	71

7. La cinétique de relargage <i>in vitro</i> de la SAB chargée dans les microcapsules d'HEA	72
8. Etude de la dégradation des microcapsules d'HEA	73
8. 1. La dégradation <i>in vitro</i> des microcapsules d'HEA	73
8. 2. La dégradation <i>in vivo</i> des microcapsules d'HEA	73
9. Conclusions et Discussion	75
<b>II<sup>EME</sup> PARTIE : ACTIVITE ADJUVANTE DES MICROCAPSULES D'HEA</b>	
<b>SUR LA REPONSE IMMUNITAIRE ANTI-SAB CHEZ LA SOURIS B6D2F1</b>	77
1. L'internalisation des microcapsules d'HEA par des cellules mononucléées murines	78
2. L'immunogénicité des microcapsules d'HEA	79
3. La cinétique de production des IgG totales anti-SAB suite aux différents traitements	79
4. La caractérisation isotypique des IgG anti-SAB produites	82
5. La sécrétion <i>in vitro</i> d'IL4 et d'IFN $\gamma$ par les splénocytes des animaux traités	85
6. Etude de la prolifération des splénocytes <i>in vitro</i>	86
7. Conclusions et Discussion	87
<b>III<sup>EME</sup> PARTIE : MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE STRATEGIE D'IMMUNOTHERAPIE ANTI-MELANOME B16R PAR INJECTION DE PROTEINES SOLUBLES TOTALES B16R CHARGEES DANS DES MICROCAPSULES D'HEA</b>	91
1. Détermination de la capacité et de l'efficacité de chargement des microcapsules d'HEA pour les protéines solubles totales extraites des cellules B16R	93
2. Etude <i>in vitro</i> de la cytotoxicité des microcapsules d'HEA vis à vis des cellules de mélanome B16R	95
3. Etude des effets des traitements prophylactiques à bases de protéines solubles B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA	96
3. 1. Etude du développement tumoral suite aux traitements à bases de protéines solubles B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA	96
3. 1. 1. Etude du développement tumoral suite aux traitements prophylactiques administrés par voie intrapéritonéale	96
3. 1. 2. Etude du développement tumoral suite aux traitements prophylactiques administrés par voie sous-cutanée	98
3. 1. 3. Comparaison des deux voies d'administration utilisées	99
3. 2. Etude des mécanismes immunitaires impliqués dans les ralentissements de la progression tumorale observés suite aux traitements prophylactiques administrés par voie <i>s.c.</i>	100
3. 2. 1. La cinétique de production des IgG totales anti-cellules B16R	100
3. 2. 2. Recherche des molécules de Classe I à la surface des cellules B16R	102
3. 2. 3. Etude de la cytotoxicité des cellules spléniques vis-à-vis des cellules B16R	103
3. 2. 3. 1. Cytotoxicité des cellules effectrices obtenues après rééducation sur cellules B16R « normales »	104
3. 2. 3. 2. Cytotoxicité des cellules effectrices obtenues après rééducation sur cellules B16R exprimant des molécules de Classe I	105

3. 2. 4. Etude quantitative des cellules effectrices obtenues	106
3. 2. 4. 1. Etude quantitative des cellules CD8 <sup>+</sup>	106
3. 2. 4. 2. Etude quantitative des cellules NK 1.1 <sup>+</sup>	107
4. Etude des effets des traitements curatifs à bases de protéines solubles B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA administrés par voie sous-cutanée sur le développement tumoral	108
5. Conclusions et Discussions	110
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	117
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	126
<b>ANNEXES</b>	144
<i>Annexe 1</i> : Hydroxyethylstarch microcapsules : A preliminary study for tumor immunotherapy application	144
<i>Annexe 2</i> : Enhanced immune response induced by BSA loaded in hydroxyethylstarch microparticles	151
<i>Annexe 3</i> : Le nouveau chapitre de Thèse	177

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>AAT :</b>	Antigènes Associés aux Tumeurs
<b>ACF :</b>	Adjuvant Complet de Freund
<b>ADN :</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>AIF :</b>	Adjuvant Incomplet de Freund
<b>ARA :</b>	Arabine
<b>ARN :</b>	Acide Ribonucléique
<b>BCG :</b>	Bacille de Calmette-Guérin
<b>BCR :</b>	Récepteur des Cellules B ( <i>B cell Receptor</i> )
<b>CC :</b>	Capacité de Chargement
<b>CCDA :</b>	Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps (ou ADCC : <i>Antibody Dependant Cell Cytotoxicity</i> )
<b>CD :</b>	Groupe de différenciation ( <i>Cluster of differentiation</i> )
<b>CDC :</b>	Cytotoxicité Dépendante du Complément
<b>Cdk :</b>	Kinase dépendante des cyclines ( <i>Cyclin-Dependent Kinase</i> )
<b>CMH :</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>CPA :</b>	Cellules Présentatrices d'Antigènes
<b>CT :</b>	Toxine Cholérique
<b>CTLA :</b>	Molécule associée aux lymphocytes T cytotoxiques ( <i>Cytotoxic T Lymphocyte Associated molecule</i> )
<b>D.O. :</b>	Densité optique
<b>DC :</b>	Cellule dendritique ( <i>Dendritic cell</i> )
<b>DDA :</b>	Dimethyldioctadecyl ammonim
<b>DMSO :</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>EBV :</b>	Epstein-Barr Virus
<b>EC :</b>	Efficacité de Chargement
<b>EGF-R :</b>	Recepteur du facteur épithélial de croissance ( <i>Epithelial Growth factor-Receptor</i> )
<b>ELISA :</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>FasL :</b>	Ligand de Fas
<b>Fc :</b>	Fragment cristallisable des immunoglobulines
<b>FdUMP :</b>	Fluoro désoxyuridine monophosphate
<b>FSC :</b>	Forward scatter
<b>FT-IR :</b>	Infrarouge de transformé de Fourier
<b>FUTP :</b>	Fluoro uridine triphosphate
<b>GAM :</b>	Anticorps anti-souris fait chez la chèvre ( <i>Goat anti-mouse</i> )
<b>GM-CSF :</b>	Facteur de croissance des granulocytes et des macrophages ( <i>Granulocytes macrophages colony stimulating factor</i> )
<b>Gp :</b>	Glycoprotéine
<b>HEA :</b>	Hydroxyéthylamidon
<b>HEPES :</b>	N <sub>2</sub> Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethano-Eulfonic acid
<b>HER :</b>	Human Epidermal growth factor Receptor
<b>HHV :</b>	Herpes Human Virus
<b>HLA :</b>	Antigène d'histocompatibilité humain ( <i>Human leukocyte antigen</i> )
<b>HPV :</b>	Virus des papillomes humain ( <i>Human Papilloma Virus</i> )
<b>HRP :</b>	Peroxydase du raifort ( <i>Horse Radish Peroxidase</i> )
<b>HSV :</b>	Herpes Simplex Virus
<b>HTLV :</b>	Human T cell Lymphotropic Viruses
<b>ICAM :</b>	Molécule d'adhésion intracellulaire ( <i>Intracellular Cell Adhesion Molecule</i> )

<b>IFN :</b>	Interféron
<b>Ig :</b>	Immunoglobuline
<b>IL :</b>	Interleukine
<b><i>i.p.</i> :</b>	Intrapéritonéal
<b>IR :</b>	Infra-Rouge
<b>kDa :</b>	Kilodaltons
<b>KLH :</b>	Keyhole Limpet Hemocyanin
<b>LAK :</b>	Cellule tueuse active par une lymphokine ( <i>Lymphocyte Activated Killer</i> )
<b>LDH :</b>	Lactate déshydrogénase
<b>LFA :</b>	Lymphocyte Function-associated Antigen
<b>LPS :</b>	Lipopolysaccharide
<b>LT :</b>	Lymphotoxine Thermolabile
<b>MDP :</b>	Muramyl dipeptide
<b>MEB :</b>	Microscopie électronique à balayage
<b>MPLA :</b>	Monophosphoryl lipide A
<b>MTT :</b>	3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltetrazolium
<b>NK :</b>	Cellules tueuse naturelle ( <i>Natural Killer</i> )
<b>NKT :</b>	Cellules tueuse naturelle T ( <i>Natural Killer T</i> )
<b>NO :</b>	Monoxyde d'azote
<b>OMS :</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>PBS :</b>	Solution saline tamponnée au phosphate ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
<b>PCR :</b>	Réaction de polymérisation en chaîne ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
<b>PGE :</b>	Prostaglandine
<b>PLG :</b>	Poly lactide-co-glycolide
<b>POE :</b>	Polyoxyéthylène
<b>POP :</b>	Polyoxypropylène
<b>PT :</b>	Toxine Pertussique
<b>RAM :</b>	Anticorps anti-souris fait chez le rat ( <i>Rat anti-mouse</i> )
<b>RPE :</b>	R-phycoerythrine
<b>RPMI :</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>SAB :</b>	Sérum Albumine Bovine
<b>SAF :</b>	Syntex Adjuvant Formulation
<b><i>s.c.</i> :</b>	Sous-cutané
<b>SDS :</b>	Sodium dodécylsulfate
<b>SEM :</b>	Erreur standard de la moyenne
<b>SSC :</b>	Side scatter
<b>SVF :</b>	Sérum de Veau Foetale
<b>TAP :</b>	Protéine associée au transport ( <i>Transport Associated Protein</i> )
<b>TCR :</b>	Récepteur des cellules T ( <i>T cell receptor</i> )
<b>Tween 20 :</b>	Polyoxyéthylénesorbitan monolaurate
<b>TGF :</b>	Facteur de croissance tumoral ( <i>Tumor Growth Factor</i> )
<b>Th :</b>	Cellule T auxiliaire ( <i>T helper</i> )
<b>TIL :</b>	Lymphocytes infiltrants les tumeurs ( <i>Tumor Infiltrating Lymphocyte</i> )
<b>TMB :</b>	3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine
<b>TNF :</b>	Facteur nécrosant les tumeurs ( <i>Tumor Necrosis Factor</i> )
<b>TRAIL :</b>	Ligand du TNF induisant l'apoptose ( <i>TNF Related Apoptosis Inducing Ligand</i> )
<b>TRP :</b>	Tyrosinase Related Proteins
<b>UI :</b>	Unité internationale
<b>UMP :</b>	Uracile monophosphate
<b>UV :</b>	Ultra-Violet
<b>VII :</b>	Virus de l'Immunodéficience Humain

## **LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1</b> : Les différentes étapes du développement tumoral	2
<b>Figure 2</b> : Les relations entre les cellules cancéreuses et les cellules du système immunitaire durant la progression tumorale.	4
<b>Figure 3</b> : Contrôle des cellules tumorales par le système immunitaire.	8
<b>Figure 4</b> : Reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire inné.	11
<b>Figure 5</b> : La présentation des antigènes par les CPA aux cellules T.	12
<b>Figure 6</b> : Les mécanismes d'adressage des antigènes exogènes ( <b>A</b> ) et endogènes ( <b>B</b> ) pour une présentation membranaire.	13
<b>Figure 7</b> : Initiation de la réponse immune adaptative anti-mélanome par les cellules dendritiques.	14
<b>Figure 8</b> : L'immunité antitumorale anticorps dépendante.	17
<b>Figure 9</b> : Schéma d'une coupe de peau.	18
<b>Figure 10</b> : Différentes voies d'action de l'IFN- $\alpha$ .	24
<b>Figure 11</b> : Principe de la microscopie confocale.	42
<b>Figure 12</b> : Diffraction de la lumière par une particule.	43
<b>Figure 13</b> : Principe de la théorie de Fraunhofer.	43
<b>Figure 14</b> : Protocole d'immunisation <i>i.p.</i> et <i>s.c.</i> des souris avec de la SAB, SAB/Alum ou de la SAB-microcapsules.	47
<b>Figure 15</b> : Protocole d'immunisation des souris traitées prophylactiquement par voie <i>i.p.</i> et <i>s.c.</i> avec des protéines B16R ou des protéines B16R-microcapsules.	58
<b>Figure 16</b> : Principe enzymatique du test LDH.	61
<b>Figure 17</b> : Protocole d'immunisation des souris traitées curativement par voie <i>s.c.</i> avec des protéines B16R ou des protéines B16R-microcapsules.	63
<b>Figure 18</b> : Spectres FT-IR de l'hydroxyéthyl amidon ( <b>A</b> ) et des microcapsules ( <b>B</b> ).	66
<b>Figure 19</b> : Microcapsules d'HEA colorées au bleu de méthylène observées en microscopie photonique ( <b>A</b> ) grossissement 20 x et ( <b>B</b> ) 40 x.	67

<b>Figure 20</b> : Etude d'une microcapsule d'HEA par microscopie électronique à balayage.	67
<b>Figure 21</b> : Etude d'une microcapsule d'HEA par microscopie confocale après marquage à la fluoresceine.	68
<b>Figure 22</b> : Détermination de la taille des microcapsules par un granulomètre laser.	69
<b>Figure 23</b> : Capacité (CC) et Efficacité (EC) de chargement des microcapsules d'HEA pour la SAB.	70
<b>Figure 24</b> : Microcapsules d'HEA chargées avec 2,5 % de sérum albumine bovine marquée au Texas Red observée en microscopie confocale.	71
<b>Figure 25</b> : Efficacité de chargement (EC) des microcapsules d'HEA en fonction du temps d'imbibition.	71
<b>Figure 26</b> : Relargage de la SAB par les microcapsules en fonction du temps.	72
<b>Figure 27</b> : Etude de la dégradation <i>in vivo</i> des microparticules d'HEA injectées à des souris femelles B6D2F1. Observation du liquide intrapéritonéal après le premier jour d'injection (A), 3 jours après (B), au jour 5 (C) et au jour 7 (D).	74
<b>Figure 28</b> : Observation au microscope à fluorescence de microcapsules d'HEA marquées à la fluoresceine internalisées dans des cellules mononucléées murines intrapéritonéales.	78
<b>Figure 29</b> : Cinétiques des titres en IgG totales suite à l'immunisation des souris avec 100 µg de SAB (—), 100 µg de SAB combinée à de l'Alum (—) ou 100 µg de SAB chargée dans des microcapsules (—) par voie <i>i.p.</i> (A) ou <i>s.c.</i> (B). Les flèches indiquent les immunisations (jours 1 et 21).	81
<b>Figure 30</b> : Titres en IgG1 et IgG2a chez les souris immunisées par voie <i>i.p.</i> avec 100 µg de SAB, 100 µg de SAB/Alum ou 100 µg de SAB-microcapsules	83
<b>Figure 31</b> : Titres en IgG1 et IgG2a chez les souris immunisées par voie <i>s.c.</i> avec 100 µg de SAB, 100 µg de SAB/Alum ou 100 µg de SAB-microcapsules	84
<b>Figure 32</b> : La prolifération des splénocytes spécifiques de la SAB chez les souris immunisées avec 100 µg de SAB, 100 µg de SAB/Alum ou 100 µg de SAB-microcapsules par voie <i>i.p.</i> ou <i>s.c.</i> .	86
<b>Figure 33</b> : Capacité (CC) et Efficacité (EC) de chargement des microcapsules d'HEA pour les protéines solubles totales extraites des cellules B16R.	93

<b>Figures 34 :</b> Profil électrophorétique des protéines solubles totales B16R avant et après chargement dans les microcapsules d'HEA.	94
<b>Figure 35 :</b> Développement tumoral après inoculation de $1.10^6$ cellules B16R viables en <i>s.c.</i> chez les souris B6D2F1 prétraitées avec des protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA administrées par voie <i>i.p.</i> .	97
<b>Figure 36 :</b> Surfaces tumorales 21 jours après inoculation de $1.10^6$ cellules B16R viables en <i>s.c.</i> chez les souris B6D2F1 prétraitées avec des protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA administrées par voie <i>i.p.</i> .	97
<b>Figure 37 :</b> Développement tumoral après inoculation de $1.10^6$ cellules B16R viables en <i>s.c.</i> chez les souris B6D2F1 prétraitées avec des protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA administrées par voie <i>s.c.</i> .	98
<b>Figure 38 :</b> Surfaces tumorales 21 jours après inoculation de $1.10^6$ cellules B16R viables en <i>s.c.</i> chez les souris B6D2F1 prétraitées avec des protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA administrées par voie <i>s.c.</i> .	99
<b>Figure 39 :</b> Comparaison des surfaces tumorales 21 jours après l'inoculation des $1.10^6$ cellules B16R viables en <i>s.c.</i> chez les souris B6D2F1 prétraitées par voie <i>i.p.</i> et <i>s.c.</i> .	100
<b>Figure 40 :</b> Comparaison des cinétiques de production des IgG totales anti-cellules B16R chez les animaux immunisés avec des protéines B16R et des protéines B16R chargées dans des microcapsules d'HEA.	101
<b>Figure 41 :</b> Recherche de molécules de Classe I à la surface des cellules B16R incubées avec de l'IFN- $\gamma$ .	103
<b>Figure 42 :</b> Activité cytolytique des splénocytes des souris prétraitées rééduquées sur cellules B16R « normales » contre des cellules B16R « normales » ou exprimant des molécules de Classe I.	105
<b>Figure 43 :</b> Activité cytolytique des splénocytes des souris prétraitées rééduquées sur cellules B16R exprimant des molécules de Classe I contre des cellules B16R « normales » ou exprimant ces mêmes molécules.	106
<b>Figure 44 :</b> Nombre de cellules CD8 <sup>+</sup> dans les cellules spléniques récupérées chez les animaux prétraités.	107

<b>Figure 45 :</b> Nombre de cellules NK 1.1 <sup>+</sup> dans les cellules spléniques récupérées chez les animaux prétraités.	108
<b>Figure 46 :</b> Développement tumoral après l'inoculation de 1.10 <sup>6</sup> cellules B16R viables en <i>s.c.</i> chez les souris B6D2F1 traitées curativement avec des protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA administrées par voie <i>s.c.</i> .	109
<b>Figure 47 :</b> Séquence de la protéine Melan-A/MART-1.	121
<b>Figure 48 :</b> Développement tumoral après inoculation de 1.10 <sup>6</sup> cellules B16R viables en <i>s.c.</i> chez les souris B6D2F1 prétraitées avec le peptide Melan-A/MART-1 <sub>101-115</sub> (PPAYKLSAEQSPPP) administré par voie <i>s.c.</i> .	123

## ***LISTE DES TABLEAUX***

<b><i>Tableau I</i></b> : Classification des principaux adjuvants.	34
<b><i>Tableau II</i></b> : Composition des lots de souris immunisées par voie <i>i.p.</i> avec de la SAB, SAB/Alum ou de la SAB-microcapsules.	46
<b><i>Tableau III</i></b> : Composition des lots de souris immunisées par voie <i>s.c.</i> avec de la SAB, SAB/Alum ou de la SAB-microcapsules.	47
<b><i>Tableau IV</i></b> : Anticorps utilisés pour la recherche des molécules de classe I à la surface des cellules B16R.	56
<b><i>Tableau V</i></b> : Composition des lots de souris traitées prophylactiquement par voie <i>i.p.</i> avec des protéines B16R ou des protéines B16R-microcapsules.	57
<b><i>Tableau VI</i></b> : Composition des lots de souris traitées prophylactiquement par voie <i>s.c.</i> avec des protéines B16R ou des protéines B16R-microcapsules.	58
<b><i>Tableau VII</i></b> : Les anticorps utilisés pour l'analyse des populations lymphocytaires	61
<b><i>Tableau VIII</i></b> : Composition des lots de souris traitées curativement par voie <i>s.c.</i> avec des protéines B16R ou des protéines B16R-microcapsules.	62
<b><i>Tableau IX</i></b> : Dégradation <sup>a</sup> des microparticules en présence ou non d'amylase, d'estérase en fonction du temps d'incubation.	73
<b><i>Tableau X</i></b> : Récapitulatif des résultats obtenus lors de la recherche d'IgG anti-microcapsules en fonction des plasmas et cibles utilisés.	79
<b><i>Tableau XI</i></b> : Taux d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$ secrétés par les splénocytes des souris immunisées avec 100 $\mu\text{g}$ de SAB, 100 $\mu\text{g}$ de SAB/Alum ou 100 $\mu\text{g}$ de SAB-microcapsules par voie <i>i.p.</i> ou <i>s.c.</i> .	85
<b><i>Tableau XII</i></b> : Estimation de l'inhibition de croissance des cellules B16R cultivées en monocouche ou en sphéroïde en présence de microcapsules d'HEA (mg/ml) pendant 72 h.	95

## ***PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS***

### **Publications internationales**

**PI-1- Balasse E**, Odot J, Gatouillat G, Andry MC, Madoulet C. Mixed Th1/Th2 immune response induced by BSA loaded in hydroxyethylstarch microparticles. *Int J Pharm*, 2007, IJP-D-07-00692, Submitted Article.

**PI-2-** Gatouillat G, Odot J, **Balasse E**, Nicolau C, Tosi PF, Madoulet C. Immunization with liposome-anchored pegylated peptides modulates doxorubicin sensitivity in P-glycoprotein-expressing P388 cells. *Cancer Letters*, 2007, Novembre, Article in Press.

**PI-3-** Perrin L, Gatouillat G, **Balasse E**, Odot J, Nicolau C, Tosi PF, Madoulet C. Induction of autoantibodies to murine P-glycoprotein : Consequences on drug sensitivity in MDR cancer cells and on the expression of *mdr* genes in organs. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358(1):325-30.

**PI-4-** Devy J, **Balasse E**, Kaplan H, Madoulet C, Andry MC. Hydroxyethylstarch microcapsules: a preliminary study for tumor immunotherapy application. *Int J Pharm*, 2006, 307:194-200.

### **Communications orales**

**Balasse E**. Les propriétés adjuvantes des microcapsules d'HEA sur l'activation des cellules T helper. Application en immunothérapie anti-mélanome. *Journée jeunes Chercheurs IFR 53 de Reims*, Octobre 2006.

### **Communications affichées**

**1-** Gatouillat G, Odot J, **Balasse E**, Madoulet C. Induction d'anticorps anti-P glycoprotéine après immunisation de souris avec des peptides PEGylés : Rôle sur la réversion de la multidrogue résistance et la survie des animaux. *Société de Biologie de Reims*, 25 Octobre 2006 (1<sup>er</sup> prix).

**2-** **Balasse E**, Gatouillat G, Odot J, Andry MC, Madoulet C. A preliminary study of the adjuvant capacity of hydroxyethylstarch microcapsules in the induction of anti-

melanoma immune responses. *Skin and formulation 2<sup>nd</sup> Symposium*, Versailles, Paris, 9-10 Octobre 2006, réf PS015.

**3- Balasse E**, Gatouillat G, Odot J, Andry MC, Madoulet C. Les propriétés adjuvantes des microcapsules d'hydroxyéthyl amidon sur l'activation des cellules T helper. Application en immunothérapie anti-mélanome. *XXVI Forum de Cancérologie Paris*, 27-29 Juin 2006, publié dans : Bull. Cancer, 93, 6, 591. Abstr 118.

**4- Balasse E**, Gatouillat G, Roullin G, Andry MC, Madoulet C. Stratégies de lutte contre le mélanome par injection de protéines solubles vectorisées par des microcapsules d'hydroxyéthyl amidon. *XXV Forum de Cancérologie Paris*, 21-23 Juin 2005, publié dans : Bull. Cancer, 92, 6, 541. Abstr 57.

**5- Devy J, Balasse E**, Thevenard J, Madoulet C, Andry MC. Microcapsules d'HEA : Caractérisation et application en immunothérapie anticancéreuse. *XIX journées Scientifiques du GTRV Paris*, 16-17 Décembre 2004.

**6- Devy J, Balasse E**, Thevenard J, Madoulet C, Andry MC. Préparation et caractérisation des microcapsules d'HEA en vue d'une application en immunothérapie anti-cancéreuse. *Journée jeunes Chercheurs IFR 53*, Juin 2004, Reims.

## **I/ Le cancer : définition et généralités**

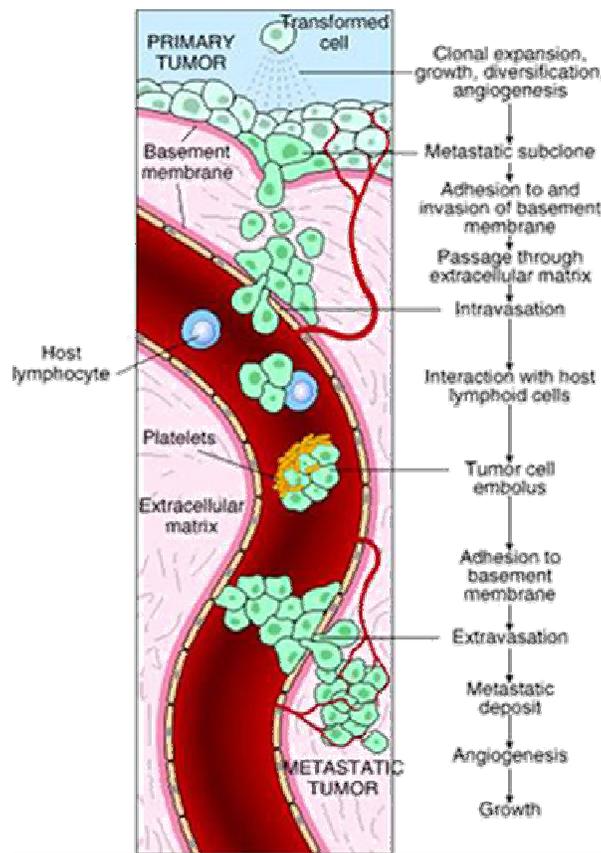
Le cancer est un ensemble varié de maladies à risque mortel liées à une prolifération de cellules anormales et envahissantes. Il est responsable d'environ 20% des décès dans les pays industrialisés. Dans ces mêmes pays, l'augmentation de l'espérance de vie et de l'âge moyen de la population accroît considérablement le risque de développement de pathologies tumorales (Parham, 2003).

Chez l'homme, l'homéostasie tissulaire résulte de divisions cellulaires successives afin de remplacer les cellules épuisées, réparer les tissus lésés et assurer une protection vis-à-vis des pathogènes. Ces phénomènes sont conditionnés par des processus complexes de régulation de la prolifération, la différenciation et la mort cellulaires. Une phase essentielle avant toutes divisions cellulaires est la réplication de l'ADN (acide désoxyribonucléique), et malgré l'activité précise des enzymes et les mécanismes de correction immédiate, il peut se glisser des erreurs. Parfois, l'altération ou le changement de l'ADN peut avoir une origine chimique qui échappe à la machinerie de réparation de L'ADN. Les mutations somatiques passent le plus souvent inaperçues car elles se font dans une seule cellule, à l'exception des mutations qui inhibent les mécanismes de contrôle de la division et de la survie des cellules. Dans ces cas, la cellule mutante prolifère pour former une population croissante de cellules mutantes qui dérèglent les fonctions physiologiques conduisant au développement de cancers. Les termes « tumeur » (« gonflement ») et « néoplasme » (« nouvelle croissance ») sont utilisés pour décrire un tissu dans lequel les cellules se multiplient anormalement. Ces cellules donnent naissance à des clones cellulaires ayant la capacité de se diviser indéfiniment et qui vont progressivement devenir invasifs. En effet, isolée à proximité d'un vaisseau sanguin, la tumeur attire à elle de nouveaux vaisseaux (angiogenèse), et ainsi nourrie en oxygène et en nutriments, elle va pouvoir grossir. Ces vaisseaux vont permettre la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme où certaines créeront des tumeurs secondaires, encore appelées métastases, qui à leur tour mobiliseront leurs propres vaisseaux pour grossir et «s'exporter» (Fig. 1).

Les cancers peuvent être classés en fonction de l'origine embryonnaire du tissu dont dérive la tumeur maligne. Nous distinguons généralement trois types de tumeurs malignes :

- **Les Carcinomes** : Ces tumeurs dérivent des tissus endodermiques ou ectodermiques. Leur point de départ est un épithélium. Ce sont les cancers les plus fréquents (environ 90%).
- **Les Lymphomes et les leucémies** qui correspondent aux tumeurs malignes des cellules souches hématopoïétiques. Ils représentent environ 9% des cancers.

- **Les Sarcomes** qui dérivent des tissus conjonctifs mésodermiques. Ce sont les cancers les plus rares (environ 1%).



*Figure 1* : Les différentes étapes du développement tumoral

## II/ L'immunité antitumorale

### 1. Historique

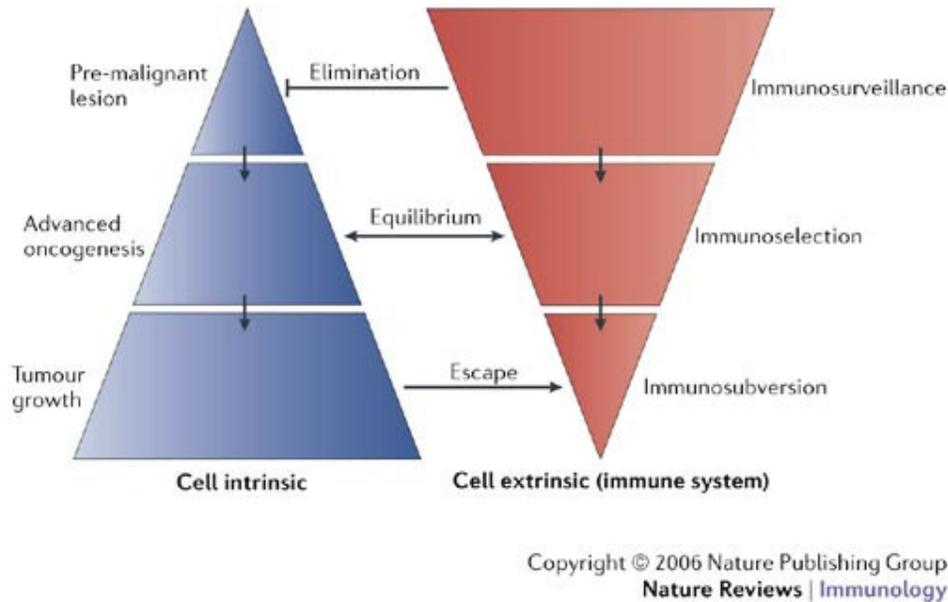
La notion d'immunité antitumorale a été introduite dès le XIX<sup>ème</sup> siècle par les fragiles observations du Dr William Coley qui constatait des régressions de tumeur chez des patients développant parallèlement un épisode infectieux (Coley, 1893). Ces données furent confortées au début du XX<sup>ème</sup> siècle lorsque l'autopsie de patients atteints de tuberculose révéla une fréquence réduite de cancer, suggérant que la stimulation du système immunitaire par le bacille de Koch protégeait contre le développement de tumeurs. Plusieurs études confirmèrent ensuite que l'injection d'extraits bactériens à des souris entraînait la nécrose hémorragique de leur tumeur. D'où, l'hypothèse que des substances antigéniques peuvent stimuler les défenses immunitaires de l'organisme et, par voie de conséquence, limiter la prolifération tumorale.

## **2. La théorie de l'immunosurveillance**

Le concept d'immunosurveillance a été d'abord énoncé par Ehrlich au début du XX<sup>ème</sup> siècle, puis repris par Franck Macfarlane Burnet (Burnet, 1970). Ce dernier postula que le système immunitaire joue naturellement un rôle de surveillance, en déclanchant et en éliminant, à des stades précoces, les cellules devenues anormales et donc étrangères à l'organisme.

Selon ce concept, les cancers sont consécutifs à un déficit immunitaire qui conduit à l'échappement de cellules néoplasiques. L'augmentation de la fréquence de certains cancers chez des malades ayant un déficit immunitaire [malades porteurs du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) ou transplantés] (Tirelli *et coll.*, 2002) confortent cette hypothèse. Cependant, les cancers observés chez les malades immunodéprimés sont particuliers (sarcome de Kaposi, hémopathies malignes, tumeurs cutanées) et le plus souvent associés à des virus [EBV (Epstein-Barr Virus), HSV (Herpes Simplex Virus), HPV (Human Papilloma Virus)], ce qui suggère plutôt une défaillance du système de surveillance antivirale. De plus, d'autres études menées chez l'homme montrent qu'un état d'immunodépression ne serait pas un facteur de risque pour le développement de tumeurs solides périphériques (Kelly *et coll.*, 1998).

Ce n'est qu'au cours de la dernière décennie du XX<sup>ème</sup> siècle que des arguments moléculaires ont permis d'affirmer que les tumeurs sont reconnues par le système immunitaire et que celui-ci, de façon spontanée ou après manipulation, peut contrôler le développement de tumeurs. En effet, en 1994, des travaux de chercheurs allemands ont mis en évidence le rôle d'une immunosurveillance s'exerçant contre des néoantigènes d'origine tumorale (Kruger *et coll.*, 1994). Ces travaux démontrent que la croissance tumorale évolue en 3 phases : une phase initiale de croissance, une seconde phase plateau, puis une dernière phase d'expansion. En revanche, chez les animaux immunodéprimés, la croissance tumorale est progressive, sans phase plateau. Cette donnée suggère que la réponse immunitaire s'exerce normalement lors de cette deuxième phase, permettant de limiter la croissance tumorale. La troisième phase, d'expansion tumorale, pourrait correspondre à l'apparition de mécanismes d'échappement à la réponse immune (Fig. 2). Ainsi, l'apparition de tumeurs, leur développement et leur dissémination métastatique sont probablement limités par le système immunitaire de l'hôte.



**Figure 2 :** Les relations entre les cellules cancéreuses et les cellules du système immunitaire durant la progression tumorale (d'après Zitvogel *et coll.*, 2006)

### 3. L'immunogénicité des cellules tumorales : Bases moléculaires de la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire

#### 3. 1. Identification des antigènes tumoraux

L'immunogénicité des tumeurs repose sur le concept que les cellules tumorales sont antigéniques, c'est-à-dire qu'elles expriment à leur surface des antigènes reconnus spécifiquement par des lymphocytes T. L'immunogénicité des tumeurs n'a été mise en évidence qu'à la fin des années 1950, par l'immunisation de souris avec des cellules tumorales irradiées qui les protégeait efficacement contre une greffe tumorale ultérieure (Prehn, 1993). La démonstration de la reconnaissance par le système immunitaire des tumeurs humaines a été établie au début des années 1980 par les travaux pionniers de Thierry Boon. Il en résulte que la faible immunogénicité des tumeurs humaines n'est pas liée à l'absence de structures antigéniques mais repose plutôt sur leur incapacité à induire une réponse immune suffisamment efficace pour entraîner leur rejet (Angevin *et coll.*, 2000). Un autre argument en faveur de l'immunogénicité des tumeurs a été apporté par l'équipe de Kuppner qui pour la première fois a montré que la plupart des tumeurs malignes sont infiltrées de leucocytes divers et en particulier de lymphocytes T spécifiques de la tumeur, dénommés « tumor infiltrating lymphocytes » (TIL) (Kuppner *et coll.*, 1988). Ces lymphocytes présentent des caractéristiques phénotypiques et/ou fonctionnelles d'activation (expression des récepteurs à

l'IL-2, engagement dans le cycle cellulaire). L'antigénicité des cellules tumorales est maintenant largement démontrée dans de nombreux modèles de cancers humains et plusieurs catégories d'antigènes de tumeurs ont été identifiées (Parmiani *et coll.*, 2002).

### **3. 2. Classification des antigènes tumoraux**

L'élaboration d'une immunothérapie antitumorale dépend en premier lieu de l'identification d'antigènes cibles susceptibles d'induire des réponses lymphocytaires T antitumorales puissantes, dans le respect des tissus sains.

Les premiers antigènes associés aux tumeurs (AAT) ont été définis par l'existence, chez les patients atteints de cancers, d'anticorps ou de lymphocytes T les reconnaissant. La nature moléculaire des antigènes reconnus a révélé que certains d'entre eux étaient spécifiques du tissu tumoral mais, dans la majorité des cas, ces antigènes pouvaient également être exprimés par des tissus sains. Ils ont été classés en cinq catégories.

#### **3. 2. 1. Les antigènes « cancer testis »**

Il s'agit de produits de gènes normalement silencieux dans tous les tissus adultes à l'exception possible des cellules germinales et trophoblastiques. Dans ce cas, ils échappent au contrôle des lymphocytes T puisque ces cellules n'expriment pas de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) classiques. L'activation génique résulte d'une déméthylation anormale des promoteurs de ces gènes, liée au processus cancéreux.

Lorsqu'un produit de gène normalement non synthétisé par les tissus adultes subit une dérégulation quantitative, il est possible que certains des peptides issus de ce produit deviennent « visibles » pour le système immunitaire.

Le premier de ces gènes a été appelé MAGE-1 (Van der Bruggen *et coll.*, 1991; De Plaen *et coll.*, 1994). Il code pour une protéine de 20 KDa qui n'est exprimée dans aucune cellule de l'organisme sauf les cellules germinales testiculaires, HLA (Human Leucocyte Antigen) classe I et II négatives, c'est-à-dire un antigène qui n'est jamais vu par le système immunitaire et qui se comporte donc comme un vrai antigène spécifique de tumeur.

MAGE-1 est en fait retrouvé dans de nombreuses tumeurs solides : 37% des mélanomes, 17% des cancers du sein, 35% des cancers bronchiques, ...etc....

Aujourd'hui, d'autres antigènes spécifiques des tissus tumoraux ont été identifiés : MAGE-3 et 6, BAGE, GAGE 1, 2, 3, 4, 5 et 6, RAGE-1, NY-ESO-1 (Chen *et coll.*, 1997 ; De Bakker *et coll.*, 1999). Pour chacune de ces protéines, des peptides capables de se lier à des molécules HLA fréquentes ont été identifiés. Soixante à soixante-dix pour cent des

mélanomes malins possèdent au moins un de ces antigènes pouvant constituer des cibles potentielles pour des lymphocytes T CD8 induits par vaccination.

### **3. 2. 2. Les antigènes de différenciation tissulaire**

Ces antigènes ont été mis en évidence dans les mélanomes et les mélanocytes. Ils sont reconnus par des lymphocytes T CD8 spécifiques d'antigènes normalement présents dans les mélanocytes mais plus fortement exprimés dans les cellules malignes de mélanome. C'est le cas par exemple de la tyrosinase, gp 100, gp 75/TRP-1, TRP-2, Mélan-A/Mart-1 (Wolfel *et coll.*, 1994 ; Bakker *et coll.*, 1994). Tous sont impliqués dans la biosynthèse de la mélanine et sont donc plus des antigènes mélanocytes spécifiques que mélanome spécifique.

L'idée s'est ainsi développée qu'une immunothérapie anticancéreuse efficace pouvait être développée contre des autoantigènes. La rupture d'un état de tolérance à l'égard d'un antigène du soi est plus ou moins aisée en fonction de la signalisation qu'il a générée au niveau du système immunitaire (indifférence, anergie, délétion). Au total, les thérapies anticancéreuses devront sélectionner les autoantigènes, dont la tolérance est la plus facilement surmontée, grâce à un adjuvant approprié.

Il existe bien sûr des risques potentiels à utiliser des effecteurs lymphocytaires pouvant aggraver des tissus normaux. En effet, certaines réactions auto-immunes à type vitiligo observées chez des patients atteints de mélanome traités par immunothérapie, pourraient être secondaires à l'induction d'une réponse antitumorale dirigée contre ce groupe d'antigènes.

### **3. 2. 3. Les protéines anormales spécifiques de tumeurs**

Ces antigènes incluent des protéines mutées ou des protéines issues d'un changement de cadre de lecture d'un gène normal (Van Den Eynde *et coll.*, 1991). Ces antigènes ne sont pas exprimés par les cellules normales. De nombreuses protéines impliquées dans les voies de signalisation (Ras, caspase...) ou dans le cycle cellulaire (p53, Cdk4) présentent des mutations dans les tumeurs. Ces protéines mutées peuvent participer au processus d'oncogenèse et conférer un avantage sélectif pour la prolifération ou la survie des cellules tumorales. De même, des translocations chromosomiques (Bcr-Abl, Eza-prl...) peuvent générer des néoprotéines non présentes dans le tissu sain. Les régions variables des gènes des immunoglobulines (idiotypes) exprimés par certains lymphomes B constituent un autre type d'antigène spécifique de tumeurs.

Ces antigènes très spécifiques de la tumeur concernée, rendent peu probable l'établissement d'un état de tolérance à l'égard des antigènes correspondants, et les effecteurs lymphocytaires déployés contre eux ne risquent pas de causer des dommages aux tissus normaux. Inversement, s'agissant de variations au hasard, propres à chaque individu, la stratégie vaccinale antitumorale devient alors très lourde à mener.

### **3. 2. 4. Les antigènes ubiquitaires surexprimés**

Ces antigènes sont surexprimés dans différentes tumeurs mais sont néanmoins présents dans de nombreux tissus normaux. Ainsi, l'utilisation de ces antigènes dans des protocoles de vaccination antitumorale expose au risque de maladies auto-immunes.

La molécule la plus extensivement étudiée est un récepteur de facteurs de croissance, homologue à l'EGF-R (famille erb, à activité tyrosine kinase), HER-2/*neu* (Jasinska *et coll.*, 2003 ; Johnston *et coll.*, 2006). Fortement exprimé en surface, cet antigène se prête bien en théorie aux effets de l'immunothérapie passive par anticorps. Outre l'effet éradicateur des anticorps, leurs effets agonistes peuvent être utilisés, puisque la sollicitation du récepteur HER-2/*neu* inhibe la croissance des cellules tumorales.

### **3. 2. 5. Les antigènes viraux**

Des virus sont associés à certains cancers et des antigènes dérivés de ces agents pathogènes peuvent être considérés comme des antigènes associés aux tumeurs. Ainsi, le papillomavirus est retrouvé dans plus de 90% des cas de cancer du col de l'utérus et dans 25% des cancers des voies aérodigestives supérieures. L'expression de certains antigènes dérivés de papillomavirus comme E6 et E7 semble indispensable au maintien du phénotype tumoral de la cellule et ils constituent donc de bonnes cibles d'immunothérapie. Les virus de l'hépatite B et C sont également retrouvés dans une majorité d'hépatocarcinomes primitifs du foie. D'autres virus comme EBV, HHV8 (Herpes Human Virus) et HTLV1 (Human T cell Lymphotropic Viruses) sont associés respectivement avec certains lymphomes ou cancers du rhinopharynx, des sarcomes de Kaposi et certaines leucémies T (Gottschalt *et coll.*, 2005 ; Yin *et coll.*, 2006).

Des sites Internet tel que <http://www.licr.org/SEREX.html> sont accessibles pour une mise à jour régulière des antigènes tumoraux disponibles.



**Les cellules natural killers (NK)** représentent l'une des composantes effectrices majeurs du système immunitaire inné. Ces cellules, identifiées par leurs capacités cytotoxiques, sont caractérisées également par leur aptitude à sécréter de nombreuses cytokines et chimiokines (Trinchieri, 1989 ; Bancroft, 1993). *In vivo*, ces cellules reconnaissent et lysent de nombreux types de cellules tumorales (Bancroft, 1993). Des observations cliniques chez l'homme ont permis de mettre en évidence, dans des modèles murins, la capacité des cellules NK à détruire sans mécanisme spécifique, des cellules tumorales injectées ou viro-induites (Wustrow et coll., 1985). En effet, elles réalisent une **immunité non spécifique** (elles n'expriment pas de récepteur des lymphocytes T (TCR) à leur surface) **et non HLA restreinte** (elles n'ont pas besoin qu'on leur présente le peptide antigénique associé à une molécule de Classe I ou II).

Leur mode d'action est proche des lymphocytes T cytotoxiques (intervention des perforines et granzymes). Elles peuvent détruire des cibles tumorales recouvertes d'anticorps car elles expriment à leur surface un récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines G (IgG) : la molécule CD16. L'action des cellules NK est potentialisée par certaines cytokines comme le TNF (Tumor Necrosis Factor), l'interleukine 2 (IL-2) (libérée par les lymphocytes T CD4) et l'interleukine 12 (IL-12) (sécritée par les macrophages). Cela nécessite l'activation concomitante des lymphocytes T helper CD4 (Th) et des macrophages. Le rôle des cellules NK est surtout **potentialisé par IL-2** : lorsque les cellules NK sont en présence d'IL-2, elles sont appelées cellules LAK (Lymphokine Activated Killer). Ces LAK sont dérivés des TIL lorsque ceux-ci sont cultivés *in vitro* en présence de fortes doses d'IL-2.

Chez l'animal, il existe une corrélation inverse entre le développement des tumeurs et le niveau fonctionnel des cellules NK. Plus les cellules NK sont fonctionnelles et moins les tumeurs se développent.

**Les lymphocytes natural killers T (NKT)** se caractérisent par une reconnaissance antigénique de façon restreinte par la molécule apparentée aux molécules de CMH de classe I, CD1d chez l'homme et CD1.1 chez la souris. Ces molécules CD1 lieraient des glycolipides, contrairement aux molécules de CMH de classe I qui s'associent à des peptides et dont le complexe est reconnu par les lymphocytes T conventionnels.

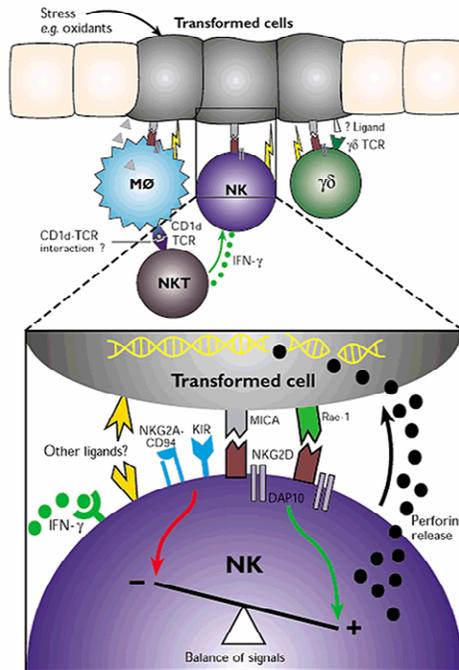
Une lyse directe des cellules tumorales par ces cellules NKT et l'activation secondaire des cellules NK seraient les deux principaux mécanismes à l'origine de l'effet antitumoral de ces cellules NKT.

**Les  $T\gamma\delta$**  sont des lymphocytes exprimant le complexe TCR  $\gamma\delta$ -CD3. Ce sont des effecteurs capables de détruire spontanément les cellules tumorales (Street *et coll.*, 2004) *i*) via une reconnaissance impliquant le TCR, ce qui leur confère un rôle dans l'immunité spécifique, ou *ii*) via des récepteurs activateurs de la lyse, indépendamment du CMH ; ils fonctionnent alors comme les cellules NK.

**Les macrophages** activés peuvent exercer une certaine activité antitumorale. Des cytokines (TNF) ou d'autres agents produits par les macrophages (NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) seraient responsables de cette cytotoxicité. Les macrophages comme les cellules NK expriment des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines et peuvent, après fixation d'anticorps reconnaissant une cible tumorale, exercer une cytotoxicité vis-à-vis de la tumeur par des mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (CCDA).

Le rôle d'**autres effecteurs cellulaires** (polynucléaires, éosinophiles, neutrophiles...) a pu être démontré dans des situations expérimentales très particulières ; néanmoins, ces cellules ne semblent participer que faiblement au contrôle antitumoral.

Cependant, il est maintenant clairement établi que pour rejeter une tumeur, l'organisme doit faire appel à tous ses moyens de défense. Des travaux effectués chez la souris ont en effet montré que, bien qu'indispensable au rejet tumoral, l'immunité naturelle ne peut à elle seule conduire à une éradication complète des tumeurs. L'immunité naturelle est une réponse précoce qui précède et prépare le développement de l'immunité adaptative, via la mise en place d'un réseau cytokinique impliqué dans l'activation de nombreuses cellules immunitaires (Palucka *et coll.*, 1999).



**Figure 4 :** Reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire inné (d'après Smyth *et coll.*, 2001).

## 4. 2. L'immunité adaptative ou acquise

La réponse immunitaire acquise implique la reconnaissance spécifique d'antigènes tumoraux.

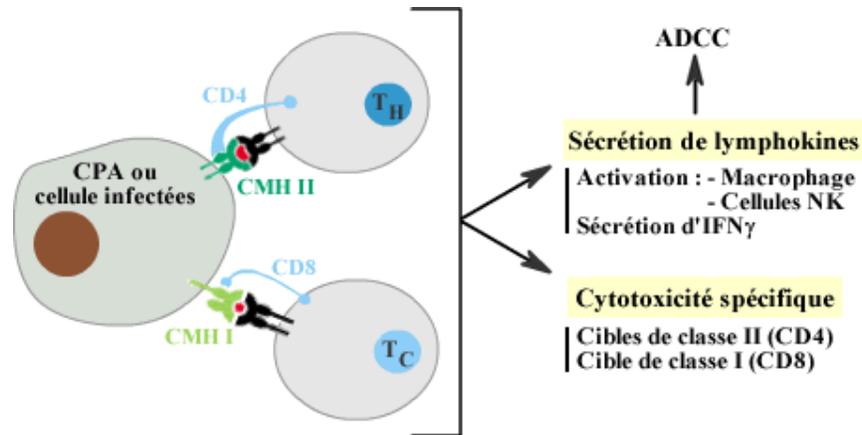
### 4. 2. 1. Les cellules présentatrices d'antigènes

Les acteurs principaux de l'immunité antitumorale sont les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui capturent l'antigène afin de le présenter aux effecteurs cytolytiques (principalement les lymphocytes T CD8) dont le rôle est de reconnaître et de tuer toute cellule exprimant l'antigène cible (Fig. 5).

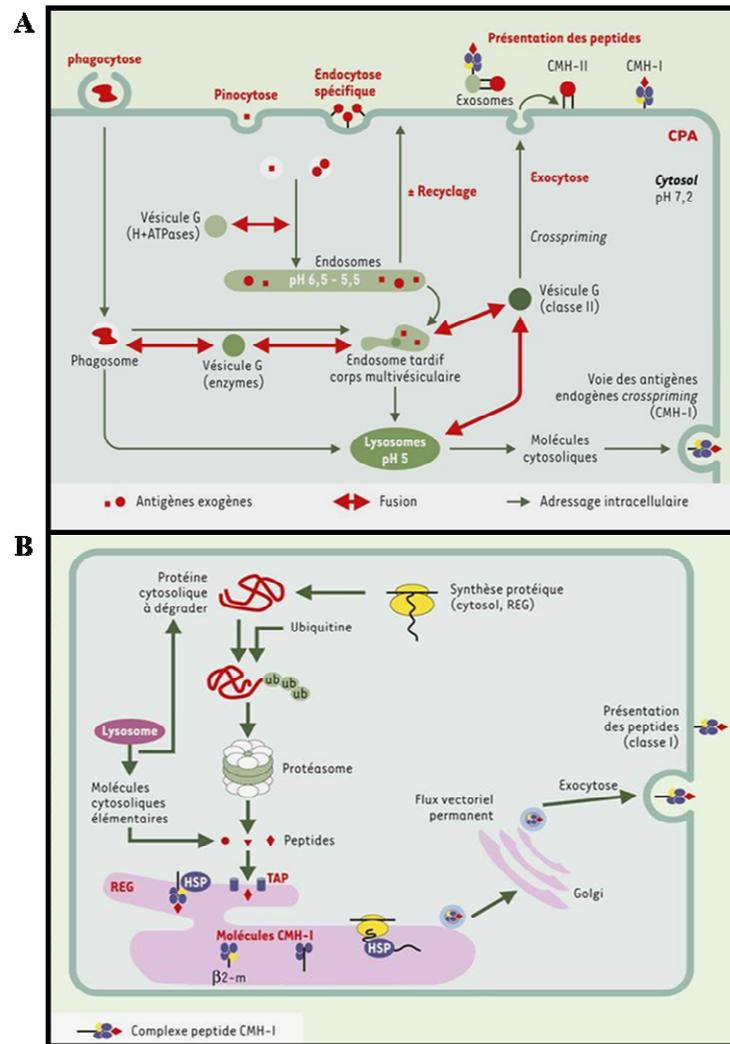
Ces cellules, de types très divers, ont plusieurs propriétés en commun : la capacité d'englober et fragmenter des protéines complexes, d'associer les fragments produits aux molécules de classe I et II du CMH qu'elles portent à leur surface, et produire des facteurs de croissance des lymphocytes (Rock *et coll.*, 1993).

Leur capacité à présenter les antigènes associés à des molécules du CMH aux cellules effectrices, résulte d'un mécanisme d'adressage intracellulaire (Fig. 6). Ainsi, les molécules CMH-I présentent plutôt des peptides originaires de la dégradation des protéines

endogènes, et les CMH-II de la dégradation des protéines exogènes. Pour cela, ces peptides issus du protéasome, ainsi que certains peptides cytosoliques d'origine lysosomale sont transportés dans la lumière du réticulum endoplasmique granuleux où ils se lient aux molécules du CMH. Les peptides associés aux molécules de CMH sont ensuite véhiculés jusqu'à la surface cellulaire.



**Figure 5 :** La présentation des antigènes par les CPA aux cellules T (d'après <http://virologie.free.fr>)

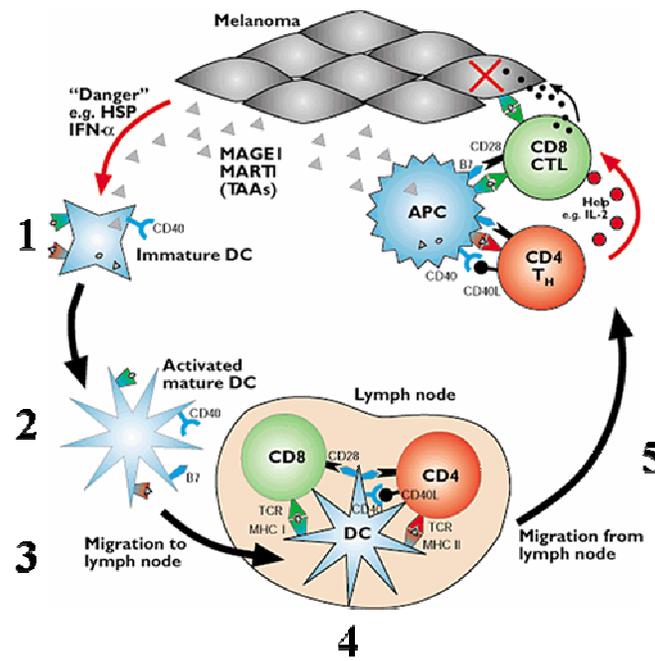


**Figure 6 :** Les mécanismes d'adressage des antigènes exogènes (A) et endogènes (B) pour une présentation membranaire (d'après Catros-Quemer *et coll.*, 2003).

Les cellules dotées de ces capacités sont les macrophages et les DC.

**Les macrophages** dérivent des monocytes circulants. Ils se localisent dans la quasi-totalité des tissus, notamment dans le foie (cellules de Kupffer), le système nerveux central (microglie), le poumon (macrophages alvéolaires), les follicules lymphoïdes (macrophages à corps tingibles),...etc. Les macrophages ont pour principale fonction la phagocytose. Ils jouent également un rôle accessoire dans l'immunité spécifique en présentant les déterminants antigéniques aux lymphocytes T préalablement activés.

*Les cellules dendritiques (DC)* initient la réponse immune en présentant les antigènes aux lymphocytes T. D'autres cellules, tels les lymphocytes B et les macrophages, sont capables d'assurer cette tâche, mais moins efficacement. De plus, les DC sont les seules capables d'activer les lymphocytes T dits "naïfs". Elles sont situées en périphérie, dans les épithéliums (ex : cellules de Langerhans des épithéliums malpighiens et respiratoires) ou dans l'interstitium des viscères. Elles captent les antigènes, les internalisent et les apprêtent. Pendant ce temps, elles migrent dans les zones T des organes lymphoïdes secondaires, où elles présentent les déterminants antigéniques aux lymphocytes T grâce aux molécules du CMH (Fig. 7).



**Figure 7 :** Initiation de la réponse immune adaptative anti-mélanome par les cellules dendritiques (d'après Smyth *et coll.*, 2001).

(1. Internalisation ; 2. Apprêtement ; 3. Migration dans les organes lymphoïdes secondaires ; 4. Présentation des antigènes aux lymphocytes T naïfs ; 5. Migration des lymphocytes T spécifiques activés au niveau de la tumeur)

## 4. 2. 2. Les mécanismes effecteurs de l'immunité adaptative antitumorale

### 4. 2. 2. 1. L'immunité adaptative antitumorale lymphocytes T dépendante

**Les lymphocytes T CD8 ou CTL :** Les CTL sont les effecteurs centraux de l'immunité à médiation cellulaire. Ils sont activés après contact de leur TCR avec un peptide antigénique présenté par une molécule du CMH. Ces lymphocytes achèvent leur maturation grâce à des signaux de costimulation et cytokiniques, puis lysent les cellules néoplasiques exprimant le complexe CMH/peptide contre lequel ils ont été activés. Les CTL tuent leurs cibles par deux mécanismes de lyse indépendants. Le premier implique la voie perforine/granzyme. Cette voie dépend de la sécrétion polarisée de protéines stockées dans des granules, dont la perforine et les granzymes, qui entraînent la mort des cellules cibles par rupture de la membrane et cassure de l'ADN (Smyth *et coll.*, 1996). Le second système cytolytique implique la voie des récepteurs dits « de mort » appartenant à la famille des récepteurs du TNF, et fait appel à l'interaction de Fas-Ligand, sur la cellule effectrice, avec son récepteur Fas sur la cellule cible, entraînant la mort de la cellule cible par apoptose (Bossi *et coll.*, 1999). L'expression de Fas-Ligand et de la perforine semble essentielle à l'activité cytolytique et les activités de ces deux voies sont dépendantes du calcium extracellulaire.

De nombreux antigènes de tumeurs ont été mis en évidence grâce à des CTL spécifiques de tumeur (Boon *et coll.*, 1994). Ces expériences montrent le rôle essentiel des lymphocytes T, et en particulier les lymphocytes cytolytiques CD8, dans le développement de la réponse immunitaire antitumorale. Initialement controversé, le rôle des lymphocytes Th (CD4) dans la réponse immunitaire antitumorale est maintenant avéré (Toes *et coll.*, 1999). L'identification des épitopes reconnus par les lymphocytes T CD4 étant très délicate le nombre d'épitopes connu est faible (Chaux *et coll.*, 1999 ; Manici *et coll.*, 1999 ; Zarour *et coll.*, 2000 ; Zeng *et coll.*, 2000 ; Maccalli *et coll.*, 2003).

**Les lymphocytes T CD4 ou T helper (Th) :** L'action des lymphocytes T CD8 ne permet pas à elle seule l'élimination de la tumeur. Il faut aussi tenir compte du rôle des lymphocytes T CD4 qui donnent l'effet *helper* aux lymphocytes T CD8 et aux lymphocytes B.

Les lymphocytes T CD4 **orchestrent** l'induction de la réponse immunitaire spécifique par les cytokines qu'ils sécrètent suite à l'activation antigénique. Leur activation et leur

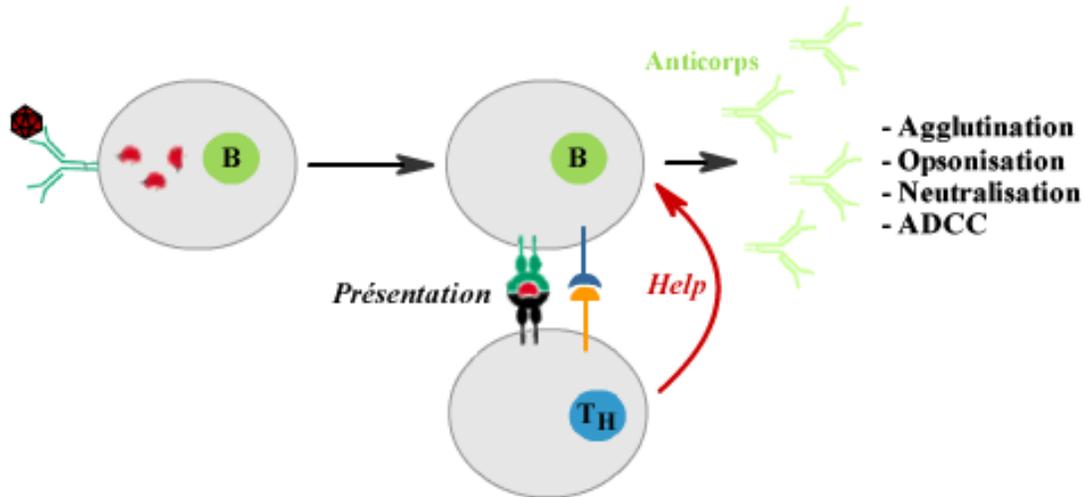
prolifération nécessitent deux signaux distincts : *i*) le signal initial créé par l'interaction d'un peptide antigénique lié à une molécule de classe II du CMH avec le complexe TCR-CD3-CD4; *ii*) le signal de co-stimulation, non spécifique de l'antigène, fourni par les interactions entre CD28 à la surface de la cellule T et les membres de la famille B7 de la surface des CPA. En fonction du profil des cytokines ( $Th_1$  ou  $Th_2$ ) qu'ils sécrètent, les lymphocytes Th favorisent respectivement le développement d'une réponse cellulaire ou humorale (Abbas *et coll.*, 1996). Les cellules  $Th_1$  sécrètent de l'IL-2, du TNF- $\beta$  et de l'IFN- $\gamma$  qui jouent un rôle clé dans la différenciation des CTL. Les cellules  $Th_2$  sécrètent l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 qui stimulent l'immunité humorale.

Les cellules Th participent également à la maturation des DC à travers la voie CD40. Ils sont aussi capables d'exercer une activité cytotoxique par une interaction entre les molécules TRAIL ou FasL et leurs récepteurs à la surface de la cellule cible (Stalder *et coll.*, 1994; Shresta *et coll.*, 1998). Enfin, les cellules Th sont nécessaires à l'établissement d'une mémoire immunitaire.

#### **4. 2. 2. 2. L'immunité adaptative antitumorale anticorps dépendante**

*Les lymphocytes B* interagissent avec les antigènes à l'aide d'immunoglobulines qu'ils expriment à leur surface sous la forme d'un complexe : le récepteur des cellules B (BCR). Lorsqu'ils sont stimulés, ils peuvent se différencier en plasmocytes qui sécrètent les immunoglobulines. Les immunoglobulines comportent une partie variable porteuse du site récepteur de l'antigène, ou site anticorps, et une partie constante responsable de diverses activités biologiques comme la fixation du complément (molécules impliquées dans, par exemple, la lyse des bactéries). Il s'agit alors de l'*immunité humorale*.

L'activation des cellules B conduit à la production d'anticorps spécifiques qui peuvent se lier aux AAT à la surface de la cellule tumorale, et ainsi, soit initier la lyse médiée par le complément (CDC : Complément Dependent Cytotoxicity), soit faciliter la CCDA par les cellules NK ou les macrophages. Enfin, les anticorps spécifiques peuvent également favoriser l'immunogénicité des antigènes tumoraux en facilitant leur capture et leur présentation par les CPA (Fig. 8).



**Figure 8** : L'immunité antitumorale anticorps dépendante (d'après <http://virologie.free.fr>)

### III/ Le Mélanome

#### 1. Définition

La peau est un des organes les plus importants du corps humain. Elle est constituée de trois couches, chacune ayant sa structure et son rôle propre : l'hypoderme, le derme et l'épiderme (Fig. 9).

L'hypoderme est la couche la plus profonde, l'assise même de la peau. Comme un matelas protecteur, elle est composée essentiellement de cellules très riches en graisse, les adipocytes. Elle joue un rôle protecteur en isolant le corps des chocs et de la température extérieur.

Le derme est un tissu de soutien qui joue un rôle très important dans le vieillissement de la peau. Il est composé de cellules appelées fibroblastes, qui produisent des fibres très solides de collagène et d'élastine et donnent à la peau sa résistance. C'est aussi dans cette couche que se trouvent les nerfs et les vaisseaux sanguins qui vont donner les sens du toucher.

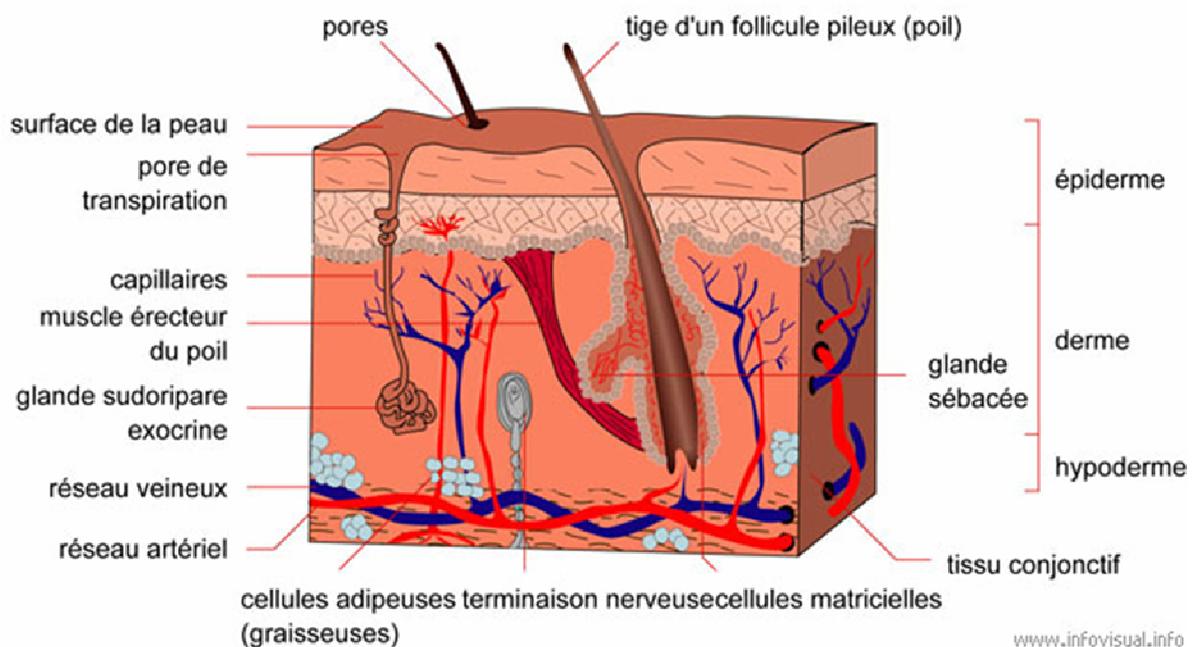
L'épiderme est constitué à 95% de kératinocytes. Les cellules se forment au plus profond de l'épiderme et remontent progressivement à la surface, où elles vont mourir. Ces cellules mortes forment une couche dite « cornée » véritable bouclier contre les agressions extérieures. Egalement présents, les mélanocytes producteurs de la mélanine responsable de la pigmentation.

Les cancers de la peau sont des cancers fréquents. Les deux principaux types de cancer de la peau sont les carcinomes cutanés (ou cancers épithéliaux) et les mélanomes.

**Les carcinomes cutanés** sont des cancers de la couche superficielle de la peau, soit de l'épiderme. Il existe des carcinomes basocellulaires, à évolution purement locale dérivant des cellules basales de l'épiderme, et des carcinomes spinocellulaires, plus rares dérivant des kératinocytes de l'épiderme. Ces derniers peuvent être invasifs et métastatiques.

**Les mélanomes** se développent suite à une modification génétique d'un mélanocyte qui entraîne aussitôt une multiplication anarchique de la cellule. Les mélanocytes se trouvent majoritairement dans la peau mais aussi dans les muqueuses, les yeux, et le système nerveux central donnant lieu à des formes cliniques particulières.

Ils démarrent souvent d'un grain de beauté qui s'étend en noircissant. La tumeur peut émerger à n'importe quel endroit du corps (dans le dos, sur les jambes, les fesses, ou sur le cuir chevelu) et à tout âge à partir de 20 ans.



**Figure 9** : Schéma d'une coupe de peau

## 2. Epidémiologie

L'incidence du mélanome est en augmentation constante. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime à 132 000 le nombre annuel de mélanome malin et à 66 000 le nombre de décès imputables à ce dernier et aux autres cancers cutanés. Ces chiffres sont en progression constante, par exemple, en Norvège et en Suisse, le taux d'incidence annuel du mélanome a plus que triplé au cours des 45 dernières années alors qu'il a doublé au cours des

30 dernières années aux Etats-Unis. L'incidence du mélanome peut varier d'un facteur allant jusqu'à 150, selon les régions du monde. Les taux les plus élevés se trouvent principalement dans les pays où les gens ont la peau la plus claire et où la culture du bronzage est la plus enracinée. Soit l'Amérique du Nord, l'Australie, l'Europe du Nord et la Nouvelle Zélande. Un cancer sur trois dans le monde est un cancer cutané.

En France en 1995, le nombre de cas recensés a été estimé entre 1 750 et 2 250 chez les hommes, et entre 2 500 et 3 300 chez les femmes. La population féminine présente donc un risque légèrement supérieur. Au total, un peu plus de 1 000 personnes en meurent chaque année dans notre pays.

Bien que la moitié des mélanomes apparaissent chez les personnes de plus de 50 ans, il n'en demeure pas moins l'un des cancers les plus fréquents chez les jeunes, à tel point qu'il est devenu depuis peu la première cause de mortalité par cancer chez les jeunes adultes.

Le mélanome malin est une des tumeurs les plus agressives de l'organisme, les plus envahissantes et les plus métastasantes. Le traitement doit être entrepris le plus rapidement possible.

### **3. Les traitements**

#### **3. 1. La chirurgie**

A l'heure actuelle, la chirurgie reste le premier traitement du mélanome. L'épaisseur du mélanome au moment de la prise en charge est l'un des facteurs déterminant pour la réussite du traitement. En effet, si le diagnostic est fait très précocement et si la tumeur est superficielle, alors l'ablation chirurgicale permet de guérir plus de 90 % des patients. Malheureusement, dans le cas où la lésion s'étend et que la chirurgie devient impossible, les patients sont exposés au risque d'évolution métastatique et un traitement complémentaire à la chirurgie s'avère souvent nécessaire.

#### **3. 2. La chimiothérapie**

##### **3. 2. 1. Principe**

La chirurgie et la radiothérapie (émission de radiations qui vont altérer la composition de l'information génétique des cellules cancéreuses) sont des traitements particulièrement efficaces lorsqu'un cancer est limité à une seule région de l'organisme. Mais, lorsque les cellules cancéreuses se sont dispersées, l'usage de la chimiothérapie devient indispensable. Ainsi, contrairement à la chirurgie ou la radiothérapie, la chimiothérapie est

un traitement général et non local qui doit s'intégrer dans une approche globale de la maladie. Elle s'utilise dans le cas de métastases ou de cancers non localisés, comme ceux qui atteignent les globules blancs.

Les traitements par chimiothérapie consistent à injecter, le plus souvent par voie intraveineuse, des substances chimiques. L'objectif étant d'enrayer, ou de ralentir l'évolution de la prolifération des cellules cancéreuses, en les détruisant et en empêchant leur reproduction anarchique au sein de l'organisme. Les médicaments employés tuent les cellules en agissant sur l'ADN, sur l'ARN (acide ribonucléique) ou sur les protéines des cellules, pour bloquer certaines étapes de la division cellulaire. Ceux qui agissent sur l'ADN peuvent, se coupler à ses bases, s'intercaler entre elles, et ainsi ouvrir la double hélice ou provoquer la formation de dérivés oxygénés qui cassent le filament d'ADN. Certains médicaments interviennent dans la synthèse des macromolécules protéiques, d'autres bloquent l'action d'enzymes chargés de réparer les cassures de l'ADN.

### **3. 2. 2. Les molécules utilisées**

Les médicaments antimétabolites sont regroupés en familles selon leur mode d'action biochimique.

- ***Les alkylants***

Les principaux agents de cette famille sont le Cyclophosphamide, le Melphalan, le Chloraminophène, le Nitroso-urée, le Busulfan. Ils possèdent un ou plusieurs radicaux électrophiles qui se lient aux régions riches en électrons des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN : création de cassures, de mutations ou de liaisons anormales entre les brins d'ADN.

- ***Les antimétabolites***

Les principaux agents sont le Méthotrexate (qui inhibe la synthèse de la thymidine), le 5-fluorouracile (précurseur du 5-FdUMP qui inhibe la Thymidilate synthétase et précurseur du FUTP qui s'incorpore dans l'ARN et inhibe ses fonctions) et le Cytosine arabinoside (précurseur de l'ARA-CTP qui inhibe l'ADN polymérase).

- ***Les poisons du fuseau mitotique***

Les principaux agents sont la Vincristine, la Vinblastine, la Vindésine et la Navelbine. Ils inhibent la polymérisation de la tubuline principale protéine du fuseau mitotique.

- ***Les inhibiteurs de la topoisomérase 2***

Les principaux agents sont le Vépéside et le Téniposide. La topoisomérase 2 assure la relaxation de l'hélice d'ADN au cours de sa synthèse, de sa traduction en ARN ou de sa réparation.

- ***Les intercalants***

Les principaux agents sont la Doxorubicine, la Mitoxantrone et l'Actinomycine D. Ils s'intercalent dans la molécule d'ADN en perturbant sa structure, sa réplication et sa traduction en ARN. Ils inhibent l'ADN polymérase et la topoisomérase 2.

- ***Les agents divers***

La Bléomycine provoque des cassures de l'ADN. La Mitomycine C est un alkylant et un intercalant. Le Cisplatine est un alkylant bifonctionnel créant des liaisons entre les brins d'ADN. L'Asparaginase détruit l'asparagine, qui est nécessaire au métabolisme des lymphoblastes.

Le mélanome est généralement peu sensible aux agents de chimiothérapie et seuls les agents alkylants ont montré une relative activité antitumorale (taux de réponse de 10 à 25%). Dans cette famille, 4 grandes classes de produits cytotoxiques utilisées contre le mélanome peuvent être distinguées :

- La molécule de référence est la Dacarbazine avec un taux de réponse globale de 14 à 25% (Wagner *et coll.*, 1972).
- La classe des Nitroso-urées : Contrairement à la Dacarbazine, ces produits passent la barrière hémato-encéphalique et ont donc une potentialité d'efficacité sur les métastases cérébrales. Parmi ces produits, seule la Fotémustine a été bien exploitée avec des taux de réponse dans 25% des cas de métastases cérébrales (Avril *et coll.*, 1990 ; Avril *et coll.*, 1992).
- Les alcaloïdes de la pervenche avec la Vindésine (Qualiana *et coll.*, 1984) et la Vinblastine (15 à 20% de réponses objectives).
- Le quatrième groupe est représenté par le Cisplatine qui donne des résultats légèrement inférieurs à ceux de la dacarbazine (Mechl *et coll.*, 1983).

### **3. 2. 3. La chimiorésistance**

Les cellules cancéreuses peuvent développer des mécanismes de défense à la chimiothérapie et devenir résistantes au médicament utilisé. Ces phénomènes commencent à

être bien connus. Ils sont dus à la production par les cellules cancéreuses de protéines particulières dont le rôle serait soit d'accélérer la sortie des médicaments de la cellule, soit d'empêcher leur action.

### **3. 2. 4. Les effets secondaires de la chimiothérapie**

La chimiothérapie s'attaque à toutes les cellules de l'organisme en cours de division. Le traitement agit en particulier sur les cellules cancéreuses qui se divisent plus vite que les cellules normales. Cependant, celles-ci ne sont pas épargnées et cela provoque des effets secondaires dans un délai moyen de sept à quatorze jours : la chute des cheveux quand le traitement détruit des cellules du cuir chevelu, des diarrhées et des vomissements quand il détruit certaines cellules de l'appareil digestif. Tous ces effets disparaissent à l'arrêt du traitement. Des complications hématologiques (leucopénie, thrombopénie, anémie), infectieuses (fièvre), rénales, métaboliques ainsi que des complications à moyen ou long terme (cardiaque, pulmonaire, neurologique, auditive) peuvent être observés et imposer l'arrêt des produits responsables. La fréquence des complications est variable selon les produits.

Lorsque certaines tumeurs résistent à la chimiothérapie, les médecins sont obligés d'augmenter les doses de médicaments. Les produits s'attaquent aux cellules de la moelle osseuse, cellules mères des globules rouges, qui assurent le transport de l'oxygène dans les tissus, et des globules blancs, responsables des défenses de l'organisme contre les infections. La destruction des cellules de la moelle est donc particulièrement dangereuse pour l'organisme.

### **3. 2. 5. Conclusions**

La chimiothérapie du mélanome n'a sa place que dans le traitement des formes métastatiques de la maladie (Li *et coll.*, 2002). Dans les situations où il n'est pas possible de proposer un traitement chirurgical de la maladie métastatique (Lejeune, 2002), un recours à la chimiothérapie systémique est souvent envisagée (Bajetta *et coll.*, 2002). Il faut cependant souligner que les résultats sont souvent décevants (Ichihashi *et coll.*, 2001 ; Helmbach *et coll.*, 2003). Aussi la chimiothérapie doit être, dans cette indication, considérée comme plus palliative que curative (Ahmann *et coll.*, 1989). La chimiothérapie reste, néanmoins, le traitement standard du mélanome au stade disséminé.

Les résultats décevants des traitements classiques ont amené à multiplier les voies de recherches thérapeutiques dans ce type de tumeur :

- études de nouvelles molécules de chimiothérapie,
- essais d'associations de drogues entre elles,
- association immuno-chimiothérapie,
- thérapies géniques,
- thérapies vaccinales,...

Compte tenu de l'existence de rejet spontané, certes rare, de certains mélanomes et des progrès considérables réalisés ces dernières années dans les domaines de l'immunologie, de la biologie moléculaire et de la description d'antigènes tumoraux, de grands espoirs se portent sur le développement de stratégies d'immunothérapies.

### **3. 3. L'immunothérapie**

L'immunothérapie utilise les défenses naturelles de l'organisme pour tuer les cellules cancéreuses. Le but de cette stratégie est de stimuler ou amplifier l'immunité existante chez le patient atteint du cancer afin d'aider au rejet de la tumeur (Pardoll, 1998 ; Jager *et coll.*, 2001 ; Pijpers *et coll.*, 2005). Même si ce n'est pas aussi simple à mettre en oeuvre, les traitements existent et sont autant de nouvelles armes pour lutter contre le cancer. De façon générale, l'immunothérapie antitumorale peut reposer sur des stratégies dites passives, ou non spécifiques, et actives, ou spécifiques.

#### **3. 3. 1. L'immunothérapie passive**

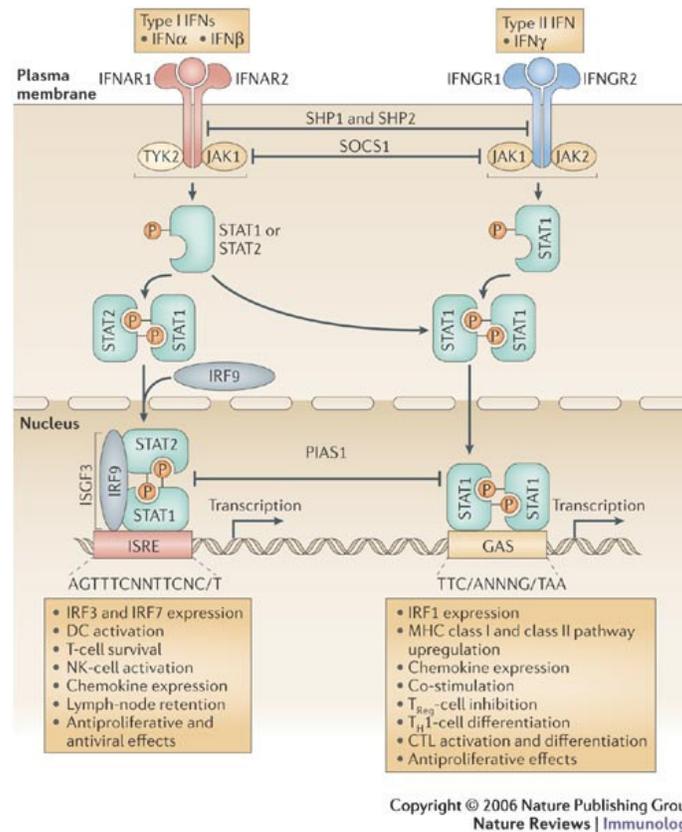
L'immunothérapie passive consiste à injecter aux malades des molécules, tels que des cytokines, qui favorisent l'élimination de cellules cancéreuses.

##### **3. 3. 1. 1. Les traitements du mélanome par interféron $\alpha$**

L'interféron  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) agit sur le mélanome et les cancers en général par trois voies principales (Fig. 10) :

- La voie immunitaire dont les principaux mécanismes sont l'augmentation d'expression des molécules HLA (classe I) sur les cellules tumorales favorisant, leur reconnaissance, une induction de réponse cellulaire de type Th<sub>1</sub>, une augmentation de la réponse cellulaire T cytotoxique (Palmer *et coll.*, 2000), et une activation des cellules NK.

- Une voie directe sur la cellule tumorale par inhibition de croissance et induction d'apoptose (Thyrell *et coll.*, 2002).
- Une voie passant par l'environnement tumoral, avec notamment un effet anti-angiogénique (Von Marshall *et coll.*, 2003).



**Figure 10 :** Différentes voies d'action de l'IFN- $\alpha$  (d'après Dunn *et coll.*, 2006).

Si la voie immunitaire est apparemment prédominante, les doses et le schéma d'administration influent sans doute différemment sur les 3 voies.

Actuellement, 2 types de dosage d'IFN- $\alpha$  se sont avérés bénéfiques en situation adjuvante :

- IFN- $\alpha$  à « faible » dose dans les mélanomes primitifs isolés, c'est-à-dire, sans ganglion régional cliniquement décelable (Grob *et coll.*, 1998).
- IFN- $\alpha$  à « forte » dose dans les mélanomes au stade d'envahissement ganglionnaire loco-régional (Kirkwood *et coll.*, 1996).

L'IFN- $\alpha$  demeure la seule molécule à avoir démontré une augmentation de survie globale en traitement adjuvant dans le mélanome au stade d'atteinte ganglionnaire. Seulement, le choix de la mise en place d'une immunothérapie adjuvante par IFN- $\alpha$  à forte dose doit résulter d'une discussion approfondie sur le rapport bénéfice/risque.

Des formes retard d'IFN- $\alpha$  ont été mises au point, permettant de diminuer le nombre d'injection et d'envisager des traitements prolongés. Ces interférons « pégylés » sont actuellement à l'étude dans plusieurs essais européens. Ils sont obtenus par pégylation, c'est-à-dire, par fixation d'une ou plusieurs chaînes de polyéthylène glycol. La taille et le poids moléculaire de la molécule sont augmentés dans le but principal d'en retarder l'élimination.

L'association chimiothérapie et immunothérapie avec une ou plusieurs drogues et l'IFN- $\alpha$ , augmente le taux de réponse par rapport aux traitements uniques, mais la survie moyenne des patients n'est pas augmentée (Bajetta *et coll.*, 2006), et la toxicité est majorée.

### 3. 3. 1. 2. Les traitements du mélanome par interleukine-2

L'interleukine 2 (IL-2) est une cytokine naturelle initialement isolée à partir de surnageants de lymphocytes T activés. Elle a la capacité d'induire la prolifération des lymphocytes T en culture (Doyle *et coll.*, 1985). L'activité antitumorale de l'IL-2 dans les modèles murins nécessite la présence de cellules effectrices immunocompétentes. Cette activité paraît relever de divers mécanismes d'action (Atkins, 1998) :

- Expansion de lymphocytes après activation par des antigènes spécifiques.
- Production d'autres cytokines (IFN  $\gamma$ , TNF...).
- Induction à partir des cellules précurseurs NK de LAK et induction de TIL.
- Enfin, les lymphocytes T activés induisent la production d'anticorps par les lymphocytes B pouvant participer à l'activité antitumorale.

L'IL-2 donne environ 16% de réponses objectives, dont 6% de réponses complètes (Atkins *et coll.*, 1999). Les effets secondaires sont cependant importants et nombreux. L'IL-2 peut provoquer chez les patients de l'hypotension, de la tachycardie, des faiblesses respiratoires, des nausées, vomissements et diarrhées.

Les approches de thérapies cellulaires basées sur l'utilisation d'IL-2, consistent à l'expansion *ex-vivo* par une culture appropriée (avec IL-2) de lymphocytes spécifiques (TIL). Ces lymphocytes étant à la base isolés de la tumeur du malade. Une fois multipliés, ces lymphocytes sont injectés au patient. L'objectif de ces manipulations empiriques était de permettre la colonisation de la tumeur par les lymphocytes T spécifiques d'antigènes tumoraux, afin qu'ils développent, dans la tumeur, une réponse immunitaire aboutissant à la

destruction des cellules cancéreuses. Cependant, les résultats n'apparaissent pas supérieurs à ceux observés avec une monothérapie par IL-2 (Dorval *et coll.*, 1992 ; Rosenberg *et coll.*, 1994).

### **3. 3. 2. L'immunothérapie active ou vaccination anti-mélanome**

Le concept de la vaccination anti-mélanome vise, après identification des antigènes spécifiques du mélanome, à induire une réponse immunitaire spécifique en les injectant au malade et à aboutir ainsi au rejet des cellules tumorales.

Il existe différents types de vaccins :

- Les vaccins de première génération : gangliosides et multi-antigènes
- Les vaccins de deuxième génération : antigènes spécifiques
- Les vaccins de troisième génération : cellules dendritiques, cellules tumorales modifiées, ...etc

#### **3. 3. 2. 1. Les vaccins de première génération**

***Gangliosides*** : L'utilisation des gangliosides représente l'une des plus anciennes approches par immunothérapie du mélanome. Ce sont des glycosphingolipides contenant de l'acide neuraminique. Ils sont ancrés dans les deux couches lipidiques de la membrane par des chaînes céramides lipophiliques. Ils sont surexprimés dans les tissus d'origine neuro-ectodermique et donc, notamment, par les cellules tumorales de mélanome. Ils ne sont pas présentés au système immunitaire par la voie classique du système HLA mais par l'intermédiaire de la famille des molécules CD1 également impliquée dans la présentation d'antigènes microbiens.

Le GM2 est un ganglioside exprimé dans 95% des mélanomes (Hamilton *et coll.*, 1993). Des études ont établi une corrélation entre la présence d'anticorps anti-GM2 présents naturellement, ou après induction d'une réponse immune, et une amélioration des survies sans récives et globales (Livingston *et coll.*, 1994). Seulement, l'injection de gangliosides « purs », sans apprêtement préalable, ne conduit pas à l'induction d'une réponse immunitaire importante, ces molécules étant reconnues en tant qu'auto-antigènes. Afin d'augmenter cette réponse, de nombreuses stratégies vaccinales ont été développées (ex : association GM2/BCG (Bacille de Calmette-Guérin) ou encore association GM2/KLH (protéine porteuse)/ QS21 (adjuvant) = vaccin nommé GMK (Kirkwood *et coll.*, 2001)).

Comme la plupart des approches de vaccination antitumorale, ce vaccin s'avère très bien toléré. Contrairement aux autres types de vaccin, ce sont des cibles pour l'immunothérapie médiée par les anticorps et non cellulaire.

***Vaccins multi-antigènes :*** Le but de cette immunothérapie active est le développement d'une immunité cellulaire cytotoxique antitumorale, grâce à la présentation d'antigènes tumoraux (plus ou moins spécifiques) au système immunitaire de l'hôte. Le choix des antigènes tumoraux et des méthodes de présentation se révèlent cruciaux pour l'efficacité de ce type de thérapeutique dans une maladie où l'immunité antitumorale « naturelle » se révèle peu efficace.

La vaccination par lysats de cellules mélaniques est une option assez ancienne. Son but est de mettre en contact l'organisme de l'hôte avec une quantité importante d'antigènes tumoraux, de nature variée, d'origine autologue (dérivés de la tumeur de l'hôte) ou allogénique (en général issu de lignées cellulaires de mélanome). Ces lysats sont préparés par destruction de cellules mélaniques après éclatement osmotique ou fragmentation mécanique. Ils sont ensuite utilisés soit associés à un adjuvant permettant de stimuler leur pouvoir immunogène, à une molécule cytotoxique comme le cyclophosphamide, ou un immunostimulant « généraliste » tel que l'IFN- $\alpha$ . Cette méthode de vaccination présente un certain nombre d'avantages mais aussi des inconvénients non négligeables.

Ces vaccins peuvent être, ou non, HLA-restreint « à priori » à certains groupes d'HLA de classe I. Cliniquement, c'est une méthode assez simple, notamment quand il s'agit de lignées de mélanomes associées à un adjuvant injecté soit par voie sous-cutanée ou intradermique. En revanche, ces méthodes sont très difficiles à standardiser tant en ce qui concerne la nature que la quantité des antigènes tumoraux utilisés, cela rendant parfois la reproductibilité et la comparaison des études très délicate. D'autre part, la mise en évidence de l'apparition de cellules cytotoxiques circulantes spécifiques chez les patients, est d'autant plus compliquée que les cibles moléculaires ne sont pas déterminées. Sauf cas particulier, il s'agit donc de méthodes finalement assez peu spécifiques, difficiles à standardiser et où l'analyse immunologique de la réponse cytotoxique se révèle aléatoire. La multiplication des antigènes d'origine « naturelle » permettrait l'apparition d'une réponse cytotoxique plus efficace et multidirectionnelle permettant de viser plusieurs cibles moléculaires en même temps. Mais cela n'a jamais été validé à ce jour. De plus, il est possible que l'absence de contrôle des antigènes utilisés entraîne, au contraire, l'apparition d'une tolérance immunologique vis-à-vis de certains d'entre eux, et finalement l'induction d'une réduction de

l'efficacité de la réponse antitumorale de l'hôte par stimulation de lymphocytes T régulateurs.

En ce qui concerne les études réalisées, elles sont peu nombreuses, font appel à des protocoles très différents et chez des patients hétérogènes. La comparaison et donc l'obtention d'une vision d'ensemble concernant le potentiel thérapeutique réel de cette technique de vaccination sont très difficiles. Le principal point positif, commun à toutes les études, est l'innocuité de la méthode avec tout au plus quelques réactions inflammatoires locales au point d'injection.

### **3. 3. 2. 2. Les vaccins de deuxième génération (antigènes spécifiques)**

Les vaccins antigènes spécifiques reposent sur le principe de l'injection d'un seul antigène de tumeur au malade. Ils induisent une importante activation des CTL. En revanche, leur utilisation est soumise à deux conditions :

- une restriction HLA,
- l'expression par la tumeur ou la métastase de l'antigène correspondant au peptide que l'on veut injecter. Il faut donc que la lésion soit accessible à une biopsie qui permet d'identifier par PCR (Réaction de polymérisation en chaîne) la présence ou non de l'antigène. Ces conditions limitent bien sûr les possibilités de faire bénéficier un malade d'un vaccin.

Pour contourner le problème de la restriction HLA, il est possible de synthétiser la protéine recombinante correspondante (et non le peptide antigénique). Le grand nombre d'épitopes de classe I que contient la protéine, permet de passer outre la restriction HLA imposée par l'approche peptidique.

Depuis quelques années, de multiples essais de vaccination par peptide ou protéine ont été effectués. Les protocoles cliniques jusqu'à ce jour ont essentiellement été réalisés avec les peptides Mage-3, Mage-1, Melana/MART-1, NA-17 et tyrosinase. Il est actuellement impossible d'en dégager une vue synthétique dans la mesure où les critères de sélection des patients, la nature de l'agent thérapeutique, l'utilisation ou non d'un immunoadjuvant, la dose administrée, la voie d'administration, la fréquence d'administration constituent autant de variables propres aux différents essais. Cependant, les régressions tumorales rapportées après vaccination valident incontestablement cette approche, mais apparaissent à la fois imprévisibles et peu fréquentes.

Ces vaccins sont constitués par des peptides de synthèse, ce qui assure un contrôle parfait de la qualité et de la quantité de produit injecté.

### 3. 3. 2. 3. Les vaccins de troisième génération

Cette troisième génération de vaccins anti-mélanome utilise différentes plateformes de présentation antigénique dans le but d'induire une réponse immunitaire forte contre les antigènes tumoraux.

**Vaccins utilisant des DC :** Dans cette approche, les antigènes de cellules mélaniques sont utilisés pour « charger » des DC afin de présenter à l'organisme-hôte des antigènes tumoraux dans des conditions favorables à leur immunogénicité. En effet, l'utilisation des DC, dans un but de vaccination anti-mélanome, repose sur le fait que ces cellules sont d'excellentes CPA. Elles sont capables d'internaliser des antigènes et de les présenter aux lymphocytes T dans un contexte HLA de classe II pour les lymphocytes CD4 et HLA de classe I pour les lymphocytes CD8.

Cette approche vaccinale est encore essentiellement du domaine de la recherche fondamentale et de la mise au point thérapeutique, mais l'application à l'homme se développe. Le principe de la mise au point du traitement repose sur la culture *in vitro* en présence de cytokines comme le GM-CSF, de DC isolées à partir du sang du malade. Ces DC différenciées *in vitro* sont ensuite cultivées en présence d'un peptide ou d'un mélange d'antigènes de mélanome qu'elles internalisent. Ces DC dites chargées sont alors réinjectées au malade où elles deviennent d'excellentes cellules activatrices des CTL spécifiques du ou des peptides.

Les études réalisées font appel à des protocoles très différents. Par exemple :

- Une réponse complète sur 6 a été observée après injections de DC chargées en peptides synthétiques d'antigènes de mélanome (Lotze *et coll.*, 1997).
- Des essais ont eu lieu avec des DC fusionnées avec des cellules tumorales irradiées : une réponse partielle a été observée chez un patient sur 17 (Krause *et coll.*, 2002).
- Trois réponses complètes et 3 partielles sur 12 patients traités ont été obtenues avec des DC cultivées en présence de cellules de mélanome irradiées (O'Rourke *et coll.*, 2003).
- Des études montrent que la sensibilisation des DC en présence de cellules de mélanome apoptotiques permet la génération, *in vitro*, de cellules T spécifiques des antigènes de mélanome et capables de lyser efficacement les cellules tumorales (Jenne *et coll.*, 2000).

**Vaccins utilisant des cellules tumorales modifiées :** La cellule tumorale mélanique contourne le système immunitaire en produisant des cytokines immunosuppressives, en

masquant ses antigènes de tumeur et en n'exprimant pas les molécules de co-activation ou les antigènes de classe I ou II. La réponse cytotoxique T s'en trouve alors inhibée. Le principe du vaccin par cellules tumorales consiste à injecter au malade en sous-cutané ou en intradermique, des cellules tumorales autologues irradiées dont la fonction immunitaire a été modifiée pour la rendre vulnérable aux CTL.

C'est ainsi que les cellules tumorales peuvent être modifiées pour produire :

- des cytokines IL-7, IL-2 et IL-12. En produisant ces cytokines dans leur environnement, elles activent les lymphocytes T. Dans une étude réalisée avec des cellules tumorales transfectées avec l'IL-12 et injectées en sous-cutané chez six malades, il est noté une réponse mineure, mais chez tous les malades l'activité cytotoxique a été augmentée ;
- du GM-CSF qui active les macrophages. Une étude préliminaire portant sur vingt malades au stade métastatique, chez lesquels des cellules tumorales autologues transfectées avec du GM-CSF associé à un adjuvant *canary poxvirus* ont été injectées en sous-cutané, permet deux rémissions complètes et deux rémissions partielles. Un vaccin réalisé avec l'association GM-CSF et BCG chez vingt malades a donné deux réponses partielles et deux réponses complètes ;
- les antigènes de classes I et II qui permettent la reconnaissance des antigènes de tumeur par la cellule cytotoxique.

Dans le même but, d'autres approches ont pu être développées et font appel aux exosomes (Chaput *et coll.*, 2005), à des constructions virales (Canarypox) (Spaner *et coll.*, 2006) ou des plasmides à ADN codant pour des antigènes tumoraux (Jechlinger, 2006).

### **3. 3. 2. 4. Les effets secondaires**

La qualité de vie est totalement respectée. Des poussées fébriles et des érythèmes au site d'injection du vaccin sont possibles, mais ils demeurent d'intensité faible à modérée.

En fait, la question majeure que soulèvent ces vaccins, notamment mono-peptidique, est celle de l'apparition d'une réaction auto-immune liée à l'expression de ces mêmes antigènes tumoraux par des cellules de tissus sains du malade. Ainsi Mage-3 exprimé par les cellules mélaniques est aussi exprimé par les tissus oculaire et testiculaire. Néanmoins à ce jour, aucun incident de ce type n'a été noté.

Par ailleurs, à côté de l'induction d'un phénomène d'auto-immunité, il convient de s'assurer de l'absence d'induction d'un phénomène de tolérance immunitaire.

Un autre risque lié aux vaccins concerne essentiellement les vaccins de troisième génération, à savoir la contamination des cultures de cellules dendritiques ou de cellules tumorales par un agent infectieux bactérien ou viral. Les cultures doivent être réalisées dans des unités de thérapie cellulaire répondant à des normes précises de sécurité.

### **3. 3. 2. 5. Les limites de la vaccination anti-mélanome**

Les principaux obstacles à une vaccination efficace sont à ce jour :

- ***La multiplicité des antigènes tumoraux***
- ***La multiplicité et la fréquence des mécanismes d'échappement des cellules tumorales au contrôle du système immunitaire :***

La croissance de la tumeur en dépit de son antigénicité reste encore incomplètement comprise, mais de multiples mécanismes peuvent être mis en jeu dans cet échappement au contrôle par le système immunitaire.

Dans un premier temps, nous pouvons rappeler la faible immunogénicité des cellules tumorales qui participe au défaut d'induction ou de maintien de la réponse immunitaire. Celle-ci est en partie due à une densité de peptides à leur surface qui n'atteint pas le seuil suffisant pour une reconnaissance efficace par le TCR.

Nous savons aussi que l'expression des molécules du CMH peut être déficiente dans les cellules tumorales. Cela peut être dû à différentes anomalies tels que des mutations portant sur les gènes du CMH-I, des transporteurs TAP, ou encore des altérations de certaines sous-unités du protéasome. Cette déficience peut être corrigée par les IFN.

La faible immunogénicité des tumeurs peut également provenir de l'absence de molécules de co-stimulation à leur surface. Les tumeurs solides n'expriment pas ou peu les molécules de la famille B7, et l'absence de second signal peut induire des phénomènes d'anergie des lymphocytes spécifiques qui ne répondent plus à l'antigène.

Par ailleurs, contrairement aux agents infectieux, les cellules tumorales n'induisent pas de réaction inflammatoire ni de signaux de « danger », qui jouent un rôle majeur dans l'activation des DC. Dans ce cas, la présentation des antigènes tumoraux, assimilés à des peptides du soi, est réalisée par des cellules présentatrices inductrices de tolérance. Une tolérance périphérique peut alors être observée à l'encontre des cellules néoplasiques qui ne sont pas affectées par la présence de lymphocytes T devenus anergiques. Cette tolérance peut également résulter de la présence des lymphocytes T CD4 immunorégulateurs (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) qui ont été détectés parmi les TIL de tumeurs humaines et qui sont malheureusement activés par les DC.

Un autre phénomène s'oppose à ce que les lymphocytes spécifiques puissent mettre en place des mécanismes de défense contre les cellules tumorales : il s'agit de la sécrétion locale de facteurs suppresseurs. Des cytokines inhibitrices des réponses immunitaires (TGF- $\beta$ , IL-10 ou PGE-2) peuvent être produites localement non seulement par les cellules tumorales mais également par le stroma tumoral. Cet environnement peut alors favoriser la différenciation des lymphocytes T CD4 en Th<sub>2</sub> sécréteurs de cytokines anti-inflammatoires ou encore en lymphocytes à fonction régulatrice.

Les cellules tumorales peuvent également être dépourvues de molécules d'adhérence aux lymphocytes telles que LFA-3 ou ICAM-1. Elles peuvent aussi exprimer des molécules anti-adhérentes telles que les mucines, échappant ainsi aux contacts avec les cellules immunocompétentes.

De plus, des expériences récentes montrent que les cellules tumorales peuvent s'adapter aux défenses immunitaires. En particulier, des cellules résistantes à la lyse peuvent se trouver progressivement sélectionnées au sein des populations cellulaires tumorales. Ces cellules peuvent par exemple surexprimer *bcl-2*, un gène anti-apoptotique.

Une immunosuppression favorisée par tous ces mécanismes d'échappement peut s'installer chez les patients cancéreux au cours du développement tumoral. Il faut également rappeler qu'un excès d'antigènes peut également avoir pour conséquence, un épuisement clonal par re-stimulation permanente.

- ***La nécessité d'avoir du matériel tumoral dans les approches antigène-spécifique :***

Cela afin de vérifier, préalablement à l'injection du ou des peptides, l'expression de l'antigène par les cellules tumorales (Dunn *et coll.*, 2006).

### **3. 3. 2. 6. Conclusions**

La vaccination représente une approche thérapeutique nouvelle et prometteuse dans le mélanome. La lenteur relative de la réponse, l'intérêt d'une masse tumorale faible et la très bonne tolérance incitent dès aujourd'hui à discuter son utilisation dans une situation adjuvante, notamment après exérèse de la tumeur primitive.

La recherche fondamentale cherche également à potentialiser la réponse antitumorale par combinaison des différents types de traitements (association chimio-immunothérapie), des différents types de vaccins, par le contournement des mécanismes d'échappement des cellules tumorales au contrôle du système immunitaire (utilisation d'anti-CTLA-4 (Sanderson *et coll.*, 2005), ...), ...etc.

## **IV/ Les adjuvants vaccinaux**

### **1. Définition**

Le terme « adjuvant » dérive du latin *adjuvare* qui signifie aider, assister. En immunologie, les adjuvants sont le plus souvent employés pour modifier, augmenter les effets d'un vaccin. Ils permettent de stimuler plus efficacement la réponse immunitaire dirigée contre les constituants du vaccin.

Bien qu'ils soient également testés dans le cadre de certaines immunothérapies, les adjuvants sont surtout utilisés en tant que constituants de vaccins. La plupart du temps, ils sont indispensables à l'installation d'une réponse immune protectrice.

Il existe une multitude d'adjuvants, de nature et d'origine extrêmement diverses, et dont il serait impossible de dresser une liste exhaustive.

### **2. Classification des principaux adjuvants**

Les adjuvants peuvent être classés dans 2 catégories, soit les immunostimulants (dérivent pour la plupart de pathogènes), soit les systèmes de présentation des antigènes (généralement microparticulaires) (Tab. I). Les premiers activent directement les cellules de l'immunité en se liant à différents récepteurs. Les seconds contiennent l'antigène et déterminent la façon dont il sera présenté au système immunitaire (Vermout *et coll.*, 2003).

**Tableau I :** Classification des principaux adjuvants (d'après Singh *et coll.*, 2002).

Les immunostimulants	Constituants bactériens	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ACF (adjuvant complet de Freund)</li> <li>▪ AIF (adjuvant incomplet de Freund)</li> <li>▪ MDP (muramyl dipeptide)</li> </ul>	
	Toxines bactériennes	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Toxine cholérique (CT)</li> <li>▪ Toxine pertussique (PT)</li> <li>▪ Lymphotoxine thermolabile (LT)</li> </ul>	
	Oligodésoxynucléotides CpG	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪</li> </ul>	
	Cytokines	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ IL-2 ; IL-12 ; GM-CSF ; IFN-<math>\alpha</math></li> </ul>	
	Imidazoquinolones		
Les systèmes de présentation des antigènes	Adjuvants minéraux	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hydroxyde d'aluminium</li> <li>▪ Phosphate d'aluminium (alum) ; de potassium ; de calcium</li> </ul>	
	Adjuvants huileux	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Emulsions « eau dans huile »</li> <li>▪ Emulsions « huile dans eau »</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ AIF</li> <li>▪ TiterMax® ; SAF</li> </ul>
	Amines lipophiles	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ DDA (dimethyldioctadecyl ammonium bromide ou chloride)</li> </ul>	
	Copolymères synthétiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Composés de chaînes hydrophiles de polyoxyéthylène (POE) et de chaînes hydrophobes de polyoxypropylène (POP)</li> </ul>	
	Polysaccharides	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Dextranes, mannanes, glycannes, chitosans</li> </ul>	
	Saponines et ISCOMs	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Quil A ; QS-21</li> <li>▪ ISCOMs = Quil A + cholestérol + phosphatidylcholine</li> </ul>	
	Adjuvants microparticulaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Liposomes</li> <li>▪ Virosomes</li> <li>▪ Microparticules</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ SAF, MF59</li> <li>▪ PLG microparticules</li> </ul>

### 3. Le fonctionnement général des adjuvants

Les adjuvants vont créer un lien entre l'immunité innée et adaptative. Ils vont permettre d'augmenter la réaction immunitaire innée dirigée contre le ou les antigènes constituant le vaccin. Cette augmentation d'activation de l'immunité innée ayant comme conséquence inévitablement une augmentation de l'activation de l'immunité adaptative. Pour cela, les adjuvants utilisent quatre caractéristiques principales (Schijns, 2000) :

La première, qui est sans doute la plus importante, est leur capacité à activer, à stimuler les CPA qui sont le lien physique entre l'immunité innée et adaptative. Ces CPA ainsi activées vont migrer jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires où elles vont pouvoir présenter les antigènes aux cellules T.

Les adjuvants (tels que l'Alum) assurent la protection physique des antigènes. Ainsi, l'antigène exposé au système immunitaire pendant une plus longue durée rend plus robuste la réponse immunitaire.

Les adjuvants ont la capacité de causer des réactions locales à l'emplacement de l'injection. Cette réaction induit un dégagement important de signaux de danger (tels que des chemokines) par les cellules environnantes.

Ils induisent également le dégagement de cytokines inflammatoires qui aident au recrutement des cellules immunitaires.

#### **4. Le fonctionnement individuel des principaux types d'adjuvants**

***Les adjuvants minéraux :*** Les adjuvants minéraux, tels que les phosphates et hydroxyde d'aluminium, sont utilisés depuis une soixantaine d'années et sont les seuls à être autorisés en médecine humaine. Ce type d'adjuvant permet de concentrer l'antigène localement et de le présenter sous forme d'agrégats, ce qui favorise la capture par les CPA. Ils peuvent stimuler directement les cellules non spécifiques, comme les macrophages, et sont capables d'activer le système du complément. Mais, même s'ils sont efficaces contre diverses maladies, la production d'anticorps induite par ces adjuvants reste modérée. Il faut noter que toutes les protéines ne sont pas absorbées efficacement par les sels d'aluminium et qu'ils sont incapables de stimuler les types de réponses cellulaires efficaces contre les tumeurs et contre beaucoup d'infections virales.

***Les immunostimulants :*** Il existe de nombreux adjuvants expérimentaux capables d'activer les CPA plus directement, tels que les lipopolysaccharides (LPS) et les oligodésoxynucléotides CpG (ADN de bactéries). Ces adjuvants agissent tels des signaux de danger. En effet, ils agissent directement sur les DC par fixation aux récepteurs Toll-like. Ce signal de danger induit la maturation des DC qui se traduit par l'augmentation de l'expression des molécules de classe I et II, des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40 et par la sécrétion de cytokines de l'inflammation (ex : IL-6, TNF- $\alpha$ ). Administrer ces composants revient donc à mimer les signaux pro-inflammatoires reçus par le système immunitaire lors d'une infection bactérienne. Cependant, même si ces adjuvants sont efficaces dans les modèles animaux, ils sont toxiques chez l'homme. Dans cet optique, des

dérivés de molécules naturelles comme le LPS ont été étudiés pour réduire la toxicité [ex : monophosphoryl lipide A (MPLA)]. Des cytokines ayant comme cibles les DC ont aussi été expérimentées en tant qu'adjuvant. L'IFN- $\alpha$  fait actuellement l'objet d'études cliniques chez l'homme.

***Les adjuvants microparticulaires.*** Les adjuvants microparticulaires offrent de nombreux avantages comme systèmes de libération de vaccins. Ils ont une taille similaire à celle des pathogènes rencontrés habituellement par le système immunitaire et contre lesquels il doit combattre. Par conséquent, les microparticules sont efficacement internalisées par les CPA. Cette internalisation par les cellules phagocytaires, et notamment par les DC, est responsable de l'activation des cellules T naïves localisées dans les organes lymphoïdes secondaires (Reddy *et coll.*, 2006). Les microparticules peuvent présenter de multiples copies de l'antigène à leur surface permettant une activation optimale des cellules B. De plus, ils exercent un effet dépôt et une persistance de l'antigène par protection de ce dernier de la dégradation (O'Hagan *et coll.*, 2006).

L'activité immunostimulante des adjuvants microparticulaires (liposomes, virosomes, microparticules) repose principalement sur leur capacité à présenter l'antigène de façon appropriée par la voie exogène de présentation par les CPA, et à la fois d'être internalisés par les CPA afin de stimuler le mode endogène de présentation. Le résultat est une réponse mixte caractérisée à la fois par de hauts taux d'anticorps et par une activité CTL. Ces systèmes sont toutefois difficiles à formuler.

De très nombreux adjuvants, aux modes d'actions variés, sont actuellement à l'étude tant en médecine humaine que vétérinaire. A ce jour, les adjuvants utilisables dans des vaccins commerciaux ne permettent pas d'induire une réponse à dominante Th<sub>1</sub>. Cette propriété pourrait être la clé d'une immunisation efficace contre bon nombre de tumeurs ou de maladies infectieuses aujourd'hui incurables. La production d'anticorps spécifiques reste toutefois indispensable pour obtenir une protection. De ce point de vue, le développement d'adjuvant à la fois non toxique et capable d'induire une réponse immunitaire humorale et cellulaire est indispensable au développement des nouveaux vaccins anti-tumoraux spécifiques.

## V/ Objectifs des travaux

Devant l'augmentation de fréquence du mélanome et face aux problèmes de toxicité et de manque d'efficacité des traitements anticancéreux conventionnels sur cette maladie, une attention croissante a été accordée aux autres approches thérapeutiques.

La découverte des antigènes associés aux tumeurs et les recherches suggérant un rôle du système immunitaire dans le traitement du cancer, ont conduit au développement de nouvelles approches d'immunothérapies actives pour la prévention et le traitement du cancer, comme le mélanome.

L'action prophylactique des vaccins anticancéreux est envisagée chez des individus à haut risque, ou après avoir diagnostiqué des changements malins dans les tissus cibles. Tandis que l'action thérapeutique est envisagée pour l'une des trois stratégies suivantes : arrêter la croissance des tumeurs existantes, bloquer la récurrence d'un cancer déjà traité, ou tuer les cellules cancéreuses qui ont échappé aux divers traitements.

La condition fondamentale pour la mise au point d'une stratégie d'immunothérapie anticancéreuse est l'induction d'une immunité spécifique efficace permettant de casser la tolérance à la tumeur et de produire une immunité antitumorale. Pour cela, différentes stratégies sont étudiées. La stratégie la plus attrayante est la vaccination, car conçue pour produire une immunité antitumorale lymphocytes T dépendante ainsi qu'une immunité mémoire.

En continuité avec les travaux précédemment réalisés au sein de notre laboratoire, nous nous sommes intéressés au développement d'une nouvelle stratégie d'immunothérapie anti-mélanome (Odot *et coll.*, 2004). Notre stratégie se base sur l'injection de protéines totales extraites de cellules de mélanome murin B16R résistantes à la Doxorubicine. Ces types de vaccins multi-antigènes ont la propriété de mettre en contact l'organisme avec une quantité importante d'antigènes tumoraux de natures variées. Des vaccins anti-mélanome utilisant cette propriété ont déjà été développés, tels que Melacine (Sosman *et coll.*, 2003) et Canvaxin (Hsueh *et coll.*, 2003). Ces deux vaccins composés de lysat de cellules tumorales ont, malgré d'important espoirs, échoué en phases cliniques. En effet, les peptides et les protéines sont faiblement immunogènes, principalement en raison de leur faible capacité à activer les CPA et de demi-vie courte. Leur utilisation sous une forme vaccinale appropriée permettant une meilleure activation des CPA (notamment des DC) et de les protéger de la dégradation semble primordiale afin d'induire une réponse antitumorale efficace et durable. Pour palier à ces problèmes, l'utilisation de systèmes microparticulaires de libération/présentation d'antigènes est une des alternatives proposées. Ces systèmes

microparticulaires, tout comme des adjuvants vaccinaux en général, ont la propriété de créer un lien entre l'immunité innée et adaptative par stimulation des CPA. Parmi les systèmes les plus importants, nous trouvons les liposomes, les virosomes et les microparticules. Les liposomes sont des sphères synthétiques constituées de bicouches lipidiques qui peuvent encapsuler des antigènes. Bien qu'ils constituent un des systèmes de libération/présentation d'antigènes le plus étudié, leur stabilité, leur fabrication et les problèmes de qualité semblent avoir été des facteurs entravant leur utilisation comme adjuvants chez l'homme. Les virosomes sont les capsides inertes et vides des virus. Ils peuvent être associés à des antigènes. Ces particules, de taille et de forme semblable aux virus, sont efficacement internalisées par les cellules dendritiques. Cependant, tout comme pour les liposomes, certains facteurs sont à améliorer. Parmi les microparticules, les microsphères de poly(DL-lactide-Co-glycolide) ont été intensivement étudiées. Ce sont des microsphères biocompatibles et biodégradables de taille nano- ou micrométrique capables d'incorporer différents antigènes. Le poly-lactide-co-glycolide était utilisé chez l'homme comme matériel de suture résorbable et comme système de libération contrôlée des drogues avant d'être utilisé pour former des microsphères (Walter *et coll.*, 2001; Elamanchili *et coll.*, 2004; Waeckerle-Men *et coll.*, 2005).

Le choix du système microparticulaire de libération/présentation d'antigènes à utiliser dans notre stratégie d'immunothérapie anti-mélanome s'est ainsi dirigé vers un système microparticulaire, et notamment vers les microcapsules d'hydroxyéthylamidon. Ces microcapsules, imaginées et synthétisées par le laboratoire de Pharmacotechnie de la Faculté de Pharmacie de Reims avec lequel nous collaborons, possèdent tout comme les microsphères de poly(DL-lactide-Co-glycolide) différents avantages (Levy, *et coll.*, 1990). Premièrement, elles sont composées d'un polysaccharide naturel extrait d'amidon de maïs modifié par hydroxylation : l'hydroxyéthylamidon (HEA). Cet HEA est couramment utilisé chez l'homme comme soluté de remplissage en clinique (Langeron *et coll.*, 2001; Jungheinrich *et coll.*, 2002). Deuxièmement, la modification par hydroxylation confère aux microcapsules d'HEA une hydrolyse enzymatique par l' $\alpha$ -amylase plus lente. Nous pouvons imaginer que cette augmentation du temps de dégradation prolonge la période de biodisponibilité des antigènes chargés. De plus, ces microcapsules synthétisées par un procédé de réticulation interfaciale sont faciles à fabriquer et peu coûteuses.

Au cours de mon projet de recherche, nous avons commencé par caractériser ces microcapsules et étudier leurs propriétés adjuvantes. Puis, nous avons testé une nouvelle approche d'immunothérapie anti-mélanome à base de protéines solubles totales extraites de cellules mélaniques en combinaison avec ces microcapsules d'hydroxyéthyl amidon. Le but

était d'améliorer la stimulation du système immunitaire contre les antigènes portés par les cellules de mélanome et ainsi déclencher une régression tumorale.

## **I/ Caractérisation des microcapsules d'Hydroxyéthylamidon**

### **1. Préparation des microcapsules d'hydroxyéthylamidon (HEA)**

Les microcapsules d'HEA sont préparées selon la méthode de réticulation interfaciale décrite par Levy et Andry (Levy *et coll.*, 1990). Brièvement, 2.3 g de Voluven ( Fresenius Kabi, Sèvres, France) lyophilisé correspondant à 2 g d'HEA sont dissous dans 10 ml de tampon carbonate pH 9.8, soit une solution d'HEA à 20 %. Cette phase aqueuse (6 ml) est émulsionnée sous agitation mécanique dans un solvant S (30 ml) à base de cyclohexane/chloroforme (1/4) (SDS, Peypin, France) contenant 5 % de span 85 (Seppic, Paris, France). Après 5 min d'agitation, 40 ml d'une solution de chlorure de téréphtaloyl ( Acros Organics, Noisy le Grand, France) à 5% préparée dans du solvant S sont ajoutés à l'émulsion et mélangés pendant 30 min. La réaction est stoppée par addition de 40 ml de solvant S. Les microcapsules sont lavées 4 fois avec du cyclohexane, 1 fois avec une solution d'éthanol à 95 % (SDS, Peypin, France) contenant 2 % de Tween 20 (Seppic, Paris, France), 2 fois avec de l'éthanol à 95 % et 4 fois avec de l'eau. Après une nuit de lavage dans l'eau et une centrifugation (350 g, 10 min, 22°C), les microcapsules sont resuspendues dans de l'eau et lyophilisées. Dans le but de caractériser les microcapsules par microscopie confocale, des microcapsules fluorescentes sont synthétisées par incorporation de 30 mg de fluoresceineamine (Fluka, St. Quentin Fallavier, France) à la phase aqueuse durant la première partie de la préparation.

### **2. Spectroscopie infrarouge de transformé de Fourier (FT-IR)**

Cette technique permet de reconstituer la nature chimique d'un produit par identification de certaines bandes d'absorption présentes sur un spectre, chaque bande d'absorption correspondant à un mode de vibration d'une liaison chimique entre deux atomes. Les interprétations se font par l'utilisation de bibliothèque de spectres.

Nous avons fait appel à la spectroscopie FT-IR pour comparer les liaisons chimiques présentes dans l'hydroxyéthylamidon seul ou réticulé. Pour ce faire, 1 mg de microcapsules ou d'hydroxyéthylamidon a été mélangé avec 190 mg de KBr pour être pressé (10 KPa) et analysé à l'aide d'un spectrophotomètre BXII (Perkin Elmer Courtaboeuf, France).

### **3. Examen microscopique des microcapsules**

#### **3. 1. Au microscope optique**

Dans un premier temps, la microscopie optique est utilisée pour rendre compte de l'aspect général des microcapsules. Cette manipulation nécessite l'utilisation d'un microscope Olympus BH-2 (Olympus, Shibuya-Ku, Tokyo, Japan). Les microcapsules sont préalablement colorées au bleu de méthylène (Fluka, St. Quentin Fallavier, France) pour une meilleure visualisation des parois.

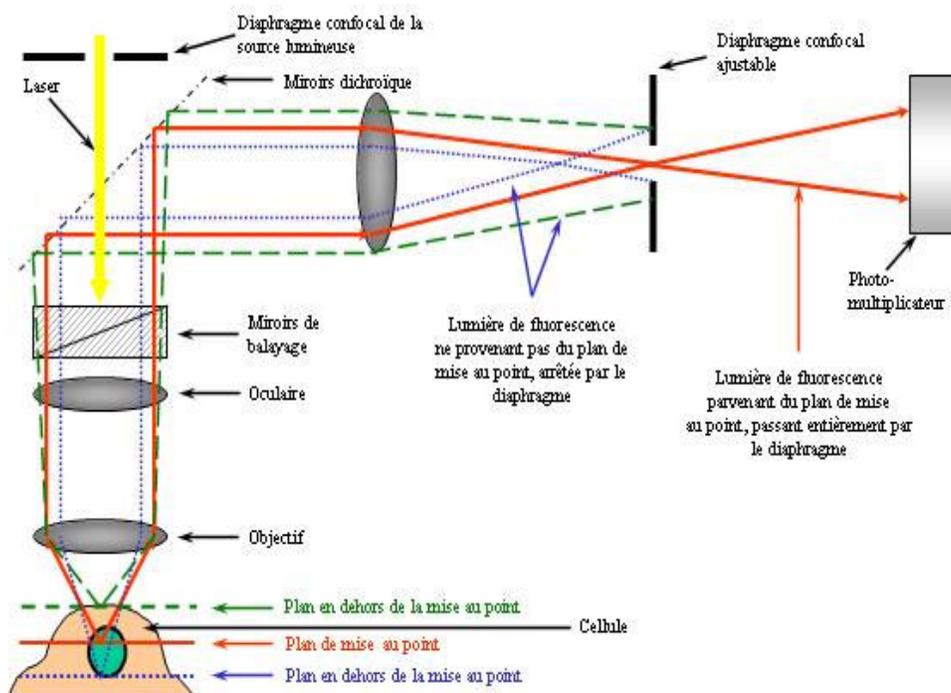
#### **3. 2. Au microscope électronique à balayage**

Le microscope électronique à balayage (MEB) dispose d'une sonde très fine (rayon de quelques dixièmes de millimètres à quelques nanomètres) qui est focalisée sur la surface supérieure de l'échantillon et qui est balayée sur celui-ci selon une rame x,y régulière. L'échantillon étant préalablement recouvert d'une fine couche d'or palladium, les signaux émis par l'échantillon au point d'impact de la sonde sont collectés pour former une image de l'objet.

Ainsi, le microscope électronique à balayage JEOL 5400 LV (JEOL, Schiphol, Pays-Bas) permet la visualisation de la surface et du volume des microcapsules.

#### **3. 3. Au microscope confocal**

L'inconvénient majeur de la microscopie de fluorescence conventionnelle est une perte de résolution due à l'émission de fluorescence défocalisée qui se superpose à l'image du plan focal. La microscopie confocale a permis de pallier ces inconvénients puisque son principe est de pratiquer des coupes optiques virtuelles dans l'objet observé et de n'enregistrer que l'image de la fluorescence émise dans le plan. Le principe de la microscopie confocale est résumé dans la figure 11. Un rayon laser exciteur pénètre dans l'échantillon marqué avec des fluorochromes. Il y a alors émission des rayons fluorescents provenant de différents plans de la préparation. Grâce à un diaphragme confocal ajustable ou « pinhole » qui élimine le signal fluorescent provenant d'autres plans, il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de la préparation. Ces rayons passent alors à travers un bloc de filtrage des longueurs d'onde, puis arrivent à un système de détection par photomultiplicateur.



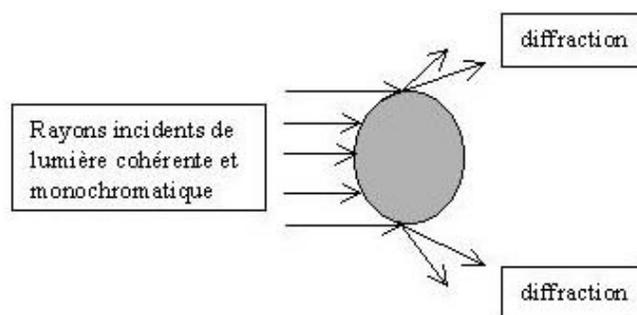
**Figure 11** : Principe de la microscopie confocale

Les images des microcapsules marquées à la fluoresceinamine « vides » et des microcapsules non marquées mais « chargées » avec de la SAB marquée au Texas red (SAB-Texas red, Invitrogen, Cergy-pontoise, France) ont été enregistrées avec un microscope confocal Bio-Rad MRC 1024 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Le microscope confocal nous a permis d'obtenir des représentations tridimensionnelles de microcapsules marquées à la fluoresceinamine (cf § I/ 1.) afin de déterminer le caractère évidé ou non des microcapsules d'HEA et de localiser spatialement la BSA-Texas red chargée dans les microcapsules d'HEA.

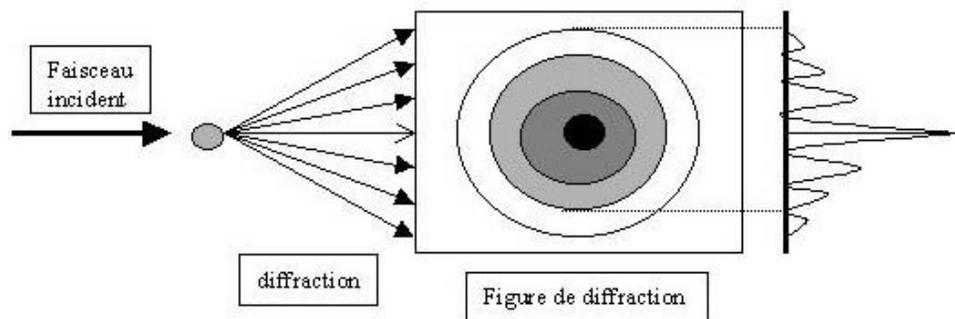
#### 4. La granulométrie laser

Un granulomètre laser LS200 (Coulter Particle Sizer, type LS 200, Coultronics, France) a été utilisé pour mesurer la taille des particules et plus exactement pour déterminer leur fréquence statistique en fonction de leur taille. Pour cela, la technique granulométrique utilise le principe de diffraction et de diffusion d'un faisceau laser (Fig. 12).



**Figure 12 :** Diffraction de la lumière par une particule

Selon la théorie de Fraunhofer, lorsqu'une particule est éclairée par un faisceau de lumière cohérente et monochromatique, il apparaît un motif de diffraction sous forme de franges concentriques alternativement claires et sombres (Fig. 13). L'intensité du rayonnement diffracté est alors une fonction du rayon des particules. L'angle de diffraction est d'autant plus grand que les particules sont petites.



**Figure 13 :** Principe de la théorie de Fraunhofer

### 5. Chargement des microcapsules d'HEA avec de la SAB

Le chargement de la SAB dans les microcapsules est obtenu par incubation de 5 mg de microcapsules lyophilisées dans 500  $\mu$ l (1% m/v) de solution de SAB (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) à différentes concentrations (0,05; 0,25 ; 1 ; 2,5 et 5%) préparées dans du sérum physiologique. Après 3 heures d'incubation à 37°C sous agitation douce, les tubes sont centrifugés pendant 30 minutes à 200 g pour éliminer la SAB non chargée. Le dosage, par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France), de la quantité de SAB libre dans le surnageant permet de déterminer la capacité (CC) et l'efficacité de chargement (EC) des microcapsules d'HEA pour la SAB.

$$\text{CC} = \frac{[(\text{SAB total}) - (\text{SAB libre du surnageant})]}{\text{poids de microparticules}} \times 100$$

$$\text{EC} = \frac{[(\text{SAB total}) - (\text{SAB libre du surnageant})]}{\text{SAB total}} \times 100$$

Les évolutions de la CC et de l'EC des microcapsules en fonction de la concentration des solutions de SAB utilisées et du temps d'imbibition ont été étudiés.

Les résultats d'efficacité et de capacité de chargement obtenus sont utilisés pour la détermination de la concentration de la solution de SAB à incuber avec les 5 mg de microcapsules pour permettre le chargement d'une quantité de SAB déterminée.

## **6. Relargage *in vitro* de la SAB chargée dans les microcapsules d'HEA**

Pour l'étude du relargage de la SAB en fonction du temps, les microcapsules sont préalablement chargées comme décrit précédemment. Le culot de microcapsules ainsi obtenu est lavé avec 500  $\mu\text{l}$  de PBS (rapport 1% masse/volume) (Invitrogen) pour éliminer la totalité de la SAB non chargée. Le culot de microcapsules est ensuite repris dans du PBS dans un rapport de 2% (masse/volume) et incubé à 37°C sous agitation douce durant 1, 3, 18, 24, 48, 72h et une semaine. Les tubes sont centrifugés 10 min à 200 g et le contenu en SAB relargué dans le surnageant est dosé par la méthode de Bradford.

## **7. La dégradation des microcapsules d'HEA**

### **7. 1. La dégradation enzymatique des microcapsules d'HEA *in vitro***

Dix milligrammes de microcapsules lyophilisées sont mises en suspension dans 5 ml de solutions enzymatiques préparées dans un tampon phosphate pH 7 (20 mM phosphate ; 6 mM NaCl). Les solutions enzymatiques utilisées sont : une solution d' $\alpha$  amylase à 1% (20 UI/mg) (Sigma), une solution d'estérase à 19 UI/ml (19 UI/mg) (Sigma) et un mélange des deux enzymes. Les tubes sont placés au bain-marie à 37°C et sous agitation constante. Des tubes témoins contenant 10 mg de microcapsules suspendues dans 5 ml de tampon phosphate pH 7 sont placés dans les mêmes conditions. La dégradation des microcapsules dans les solutions enzymatiques est évaluée au cours de temps par comptage des microcapsules sur cellule de Malassez.

### **7. 2. La dégradation *in vivo* des microcapsules d'HEA**

Cinq milligrammes de microcapsules lyophilisées sont réhydratées dans 200  $\mu\text{l}$  de sérum physiologique stérile (0.9% de NaCl). Les suspensions de microcapsules sont injectées par voie intra-péritonéale à 21 souris femelles B6D2F1. Trois souris sont sacrifiées chaque

jour, la cavité intrapéritonéale est lavée avec 10 ml de sérum physiologique et les microcapsules récupérées sont observées au microscope optique (Olympus BH-2). Un examen morphologique de ces microcapsules permet de rendre compte de leur dégradation *in vivo* au cours du temps.

## **II/ Activité adjuvante des microcapsules d'HEA sur la réponse immunitaire anti-SAB chez la souris B6D2F1**

### **1. Les Souris**

Les souris B6D2F1 utilisées sont des femelles hybrides d'haplotype H2b/H2d âgées de 6 à 8 semaines. Les souris ont été fournies par Charles River Laboratories (Iffa Credo, l'Arbresle, France). Elles résultent du croisement entre des femelles de la souche C57Bl/6 d'haplotype H2b et des mâles de la souche DBA/2 d'haplotype H2d. Les animaux sont stabulés une semaine avant les expérimentations en atmosphère constante à l'animalerie de la Faculté de Pharmacie de Reims.

### **2. L'internalisation des microcapsules d'HEA par des cellules mononucléées murines**

#### **2. 1. Récupération des cellules mononucléées**

L'internalisation des microcapsules d'HEA par des cellules mononucléées murines a été testée avec des cellules de la cavité intrapéritonéale de souris B6D2F1.

Les cellules de la cavité intrapéritonéale ont été obtenues par sacrifice d'une souris et le lavage de sa cavité intrapéritonéale avec 10 ml de sérum physiologique.

Après centrifugation (350 g, 10 minutes, 22°C), le culot cellulaire est repris dans 3 ml de RPMI/SVF 5% et est déposé délicatement sur 3 ml d'une solution de ficoll (Lymphoprep™, AbCys, Paris, France) afin d'isoler les cellules mononucléées des autres cellules par gradient de densité (800 g, 20 minutes). Après 2 lavages au RPMI/SVF 5%, les cellules sont remises en suspension dans du milieu RPMI/SVF 10% supplémenté d'antibiotiques (streptomycine 10 µg/ml, pénicilline 100 U/ml) (Invitrogen) avant d'être utilisées pour les tests de phagocytose.

#### **2. 2. Test de phagocytose *in vitro***

Les cellules mononucléées ont étéensemencées dans les puits d'une Lab Tek 8 puits à raison de  $1.10^6$  cellules par puits dans un volume de 400 µl de RPMI/SVF 10 % supplémenté

d'antibiotiques (Gibco-Invitrogen). Après 12 heures d'incubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), le milieu a été éliminé et remplacé par 200 µl de suspension de microcapsules d'HEA fluorescentes (cf § I/ 1.) (0.5 mg/ml en tampon HEPES (Gibco-Invitrogen) 0.2M, pH 7.4). Après 4 heures d'incubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), la suspension de microcapsules a été remplacée par 200 µl de solution de bleu trypan (Gibco-Invitrogen) (250 µg/ml en tampon citrate pH 4.4) afin de « quencher » (éliminer) la fluorescence extracellulaire (Wan *et coll.*, 1993). Ainsi, seules les microcapsules phagocytées sont visibles et ont été observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence Olympus IX70 (Olympus, Rungis, France) muni d'une caméra (Hamamatsu Digital camera C4742-95).

Un control négatif a été réalisé par ajout de Cytochalasine D (20 µg/ml) (Sigma) au milieu de culture des cellules 1 heure avant l'ajout de la suspension de microcapsules, ainsi que dans la suspension. La Cytochalasine D est un inhibiteur de la phagocytose (Cremaschi *et coll.*, 1996).

### 3. Les traitements *in vivo*

#### 3. 1. Composition des lots injectés

Huit lots de souris ont reçu différentes injections intra-péritonéales (1, 2, 3 et 4) ou sous-cutanées (1', 2', 3' et 4') résumées dans les tableaux ci-dessous :

**Tableau II:** Composition des lots de souris immunisées par voie *i.p.* avec de la SAB, SAB/Alum (Brenntag, Chassieu, France) ou de la SAB-microcapsules.

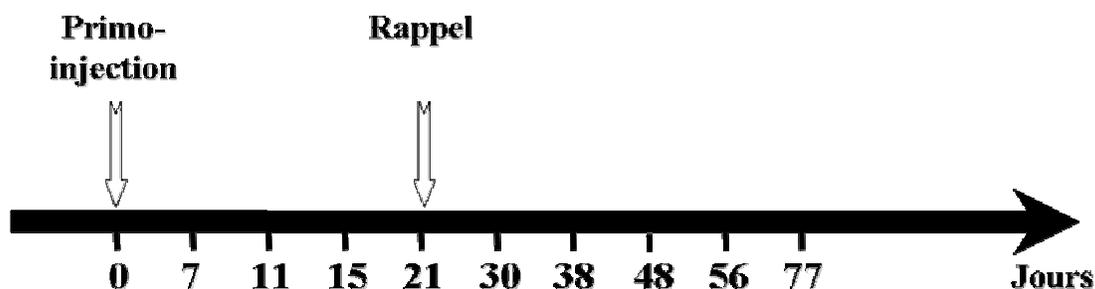
Lots N°	Nombre de souris	Préparations vaccinales
1	3	200 µl de sérum physiologique
2	3	100 µg de SAB dans 200 µl de sérum physiologique ( <b>SAB</b> )
3	3	100 µg de SAB dans 190 µl de sérum physiologique et 10 µl d'Alum (solution de BSA/Alum 1% (p/v)) ( <b>SAB/Alum</b> )
4	3	100 µg de SAB vectorisées dans 5 mg de microcapsules suspendues dans 200 µl de sérum physiologique <b>(SAB-microcapsules)</b>

**Tableau III :** Composition des lots de souris immunisées par voie *s.c.* avec de la SAB, SAB/Alum ou de la SAB-microcapsules.

Lots N°	Nombre de souris	Préparations vaccinales
1'	3	100 µl de sérum physiologique (souris témoins)
2'	3	100 µg de SAB dans 100 µl de sérum physiologique ( <b>SAB</b> )
3'	3	100 µg de SAB dans 90 µl de sérum physiologique et 10 µl d'Alum (solution de BSA/Alum 1% (p/v)) ( <b>SAB/Alum</b> )
4'	3	100 µg de SAB vectorisées dans 5 mg de microcapsules suspendues dans 100 µl de sérum physiologique <b>(SAB-microcapsules)</b>

### 3. 2. Protocole d'immunisation

Suite à la primo injection, un rappel espacé de 21 jours est effectué (Fig. 14).



**Figure 14 :** Protocole d'immunisation *i.p.* et *s.c.* des souris avec de la SAB, SAB/Alum ou de la SAB-microcapsules.

### 4. Prélèvements de sang et récupération du plasma.

Les prélèvements de sang ont eu lieu à J7, J11, J15, J21, J30, J38, J48, et J77. Environ 100 µl de sang sont prélevés au niveau de la queue des animaux à l'aide de capillaires héparinés (Instrumentation Laboratory, Milan, Italie). Le sang est transféré dans des tubes Eppendorf de 0.5 ml et centrifugés 5 min à 20 000 g. Les plasmas sont récupérés et conservés à - 20°C jusqu'à leur utilisation.

### **5. Dosage immuno-enzymatique des IgG dirigées contre la matrice des microcapsules d'HEA.**

Afin de détecter la présence, dans les plasmas des souris immunisées, d'anticorps dirigés contre la matrice des microcapsules, des microcapsules vides et chargées avec de la SAB (cf § II/ 2.) ont été utilisées comme antigènes lors de dosages immuno-enzymatiques.

Des tubes de verre sont incubés avec 3 ml d'Ovalbumine (Sigma) à 0.1 % en PBS (0.01M; pH 7,4) pendant 1 h à température ambiante afin de bloquer la fixation aspécifique des anticorps sur la paroi des tubes. Les tubes sont lavés 3 fois avec du PBS-0.05 % Tween 20 et 0.02 % de  $\text{NaN}_3$  (Sigma) (PBS-5T). Un milligramme de microcapsules vides ou chargées avec de la SAB suspendues dans 1ml de PBS-0.02 % Tween 20 et 0.02 % de  $\text{NaN}_3$  (PBS-2T) sont ajoutés dans les tubes. Un millilitre de plasma de 3 souris des lots 1 (témoin négatif), 3 (immunisées avec des microcapsules vides) et 6 (immunisées avec la SAB chargée dans des microcapsules) prélevés à J30 (soit 9 jours après le rappel) et dilués au 1/200<sup>ème</sup> avec du PBS-2T sont ajoutés avec les microcapsules et incubés toute la nuit à 4°C, sous agitation. Les microcapsules sont lavées 4 fois avec du PBS-5T et suspendues dans 0.3 ml d'anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (GAM-IgG-HRP, Jackson Immunoresearch, Interchim, Montluçon, France) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> avec du PBS-2T. Après 2 h30 d'incubation à température ambiante et sous agitation, les microcapsules sont lavées 4 fois avec du PBS-5T, suspendues dans 1 ml de substrat (TMB, AbCys) et incubées 10 min à température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction enzymatique est stoppée par 1 ml d'acide sulfurique 1N. Après centrifugation, les densités optiques (D.O.) des surnageants de réaction sont lues à 450 nm [lecteur de microplaque série 750 microplate reader (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France)]. Chaque plasma est analysé en duplicate.

### **6. Dosage immuno-enzymatique des IgG totales, IgG1 et IgG2a anti-SAB.**

Les puits d'une plaque 96 puits (Nunc Immunoplate Maxisorp F96) sont incubés une nuit à 4°C avec 100 µl de SAB [500 µg/ml en PBS (0.01M; pH 7,4)]. Après 3 lavages avec 200 µl de PBS-0.05 % Tween 20 (PBS-5T), la plaque est saturée 1 h à température ambiante avec 100 µl/puit de tampon de saturation (Ovalbumine 1% en PBS-5T). La plaque est lavée 3 fois avec du PBS-5T avant l'ajout de 100 µl de plasma dilué dans du tampon de saturation. Après 2 h d'incubation à température ambiante, 3 lavages avec du PBS-5T sont effectués et 100 µl/puit de GAM-IgG-HRP (Jackson Immunoresearch, Interchim, Montluçon, France), de RAM-IgG1-HRP (BD Biosciences Pharmingen, Le Pont de Claix, France) ou de RAM-IgG2a-HRP (BD Biosciences Pharmingen) dilués au 1/1000<sup>ème</sup> dans du tampon de

saturation sont ajoutés dans chaque puit et incubés 2 h à température ambiante. La plaque est lavée 3 fois avec du PBS-5T et incubée 10 min en présence de 100 µl/puit de substrat (TMB, AbCys, France) à température ambiante et à l'obscurité. La réaction est stoppée par ajout de 50 µl/puit d'acide sulfurique 1N. La mesure de la densité optique (D.O.) à 450 nm est effectuée par utilisation d'un lecteur de microplaque série 750 microplate reader (Bio-Rad). Chaque plasma est analysé en triplicate. Les Titres en IgG totales, IgG1 et IgG2a sont donnés par la formule :

$$\text{Titre} = (\text{D.O.}_{450 \text{ nm}}) \times (-\log_2 (\text{dilution} \times 10))$$

Les titres moyens obtenus avec les souris témoins (traitées avec du sérum physiologique) sont soustraits aux titres obtenus avec les souris traitées (SAB, SAB/Alum et SAB-microcapsules).

### **7. Récupération des cellules spléniques et mise en co-culture *in vitro* avec de la SAB.**

Pour les expériences étudiant la production de cytokines par les cellules spléniques des souris immunisées avec la SAB et la prolifération *in vitro* de ces cellules spléniques, 5 semaines après le rappel, 3 souris de chaque lot sont sacrifiées, leur rate est prélevée et dilacérée dans du RPMI/SVF 5% pour récupérer les cellules spléniques. Après centrifugation (350g, 10 min, 22°C), les culots sont repris dans 3 ml de RPMI/SVF 5% et déposés délicatement sur 3 ml de ficoll afin d'isoler les cellules mononucléées des autres cellules sanguines par gradient de densité (800g, 20 minutes). Après 2 lavages au RPMI/SVF 5%, les cellules sont remises en suspension dans du milieu RPMI/SVF 10% supplémenté d'antibiotiques (streptomycine 10 µg/ml, pénicilline 100 U/ml).

Une mise en présence *in vitro* des cellules mononucléées avec la SAB est effectuée afin de stimuler les cellules spécifiques de la SAB générées par les différents traitements. Le dosage des cytokines secrétées dans les surnageants de culture permettra de déterminer la voie immunitaire (Th1 ou Th2) stimulée suite aux différents traitements prophylactiques.

Les cellules mononucléées sont ensemencées dans une plaque 96 puits à raison de 500 000 cellules/puit dans un volume de 100 µl de RPMI/SVF 10 % supplémenté d'antibiotiques (la SAB est apportée par le SVF, 2.5 mg/ml). Après 60 h d'incubation dans une étuve à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, les surnageants de culture sont récupérés et conservés à - 20°C jusqu'au dosage des cytokines, ou les cellules sont utilisées pour la détermination de leur prolifération *in vitro*.

## **8. Dosage immuno-enzymatique de l'IL4 et de l'IFN $\gamma$ dans les surnageants de co-culture des cellules spléniques.**

Les dosages d'IL 4 et d'IFN  $\gamma$  dans les surnageants de co-culture des cellules spléniques ont été réalisés par la technique ELISA (Mouse Interleukine-4 module set, et Mouse IFN $\gamma$ , AbCys). La spécificité du dosage est liée à l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de l'IL 4 et de l'IFN $\gamma$  à doser, et la quantification est possible par utilisation d'IL 4 et d'IFN $\gamma$  standards (protocoles expérimentaux cf recommandations des fabricants).

Brièvement, les puits d'une plaque 96 puits Maxisorp sont incubés une nuit à 4°C avec 100  $\mu$ l d'anticorps anti-IL 4 ou IFN $\gamma$ . Les puits de la plaque sont lavés et saturés pendant 1 h à température ambiante avant l'ajout de 100  $\mu$ l de surnageant dilué à doser. Après 2 h d'incubation, la plaque est lavée, 100  $\mu$ l d'anticorps anti-IL 4 ou IFN $\gamma$  sont ajoutés dans les puits appropriés et incubés 2 h. Parallèlement, une gamme étalon est réalisée par ajout d'IFN $\gamma$  et d'IL 4 standards à la place des surnageants. Pour finir, la plaque est lavée et incubée 10 min en présence de 100  $\mu$ l/puit de substrat (TMB, AbCys, France) à température ambiante et à l'obscurité. La réaction est stoppée par ajout de 50  $\mu$ l/puit d'acide sulfurique 1N. La mesure de la densité optique (D.O.) à 450 nm est effectuée par utilisation d'un lecteur de microplaque série 750 microplate reader (Bio-Rad). Chaque surnageant est analysé en triplicate.

## **9. Test de prolifération *in vitro* des cellules spléniques co-cultivées avec de la SAB.**

La prolifération des cellules spléniques des animaux traités et co-cultivées *in vitro* avec de la SAB est testée grâce à la technique au MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium) (Sigma) qui est un marqueur fonctionnel des mitochondries (Mosmann, 1983). Ce test repose sur la capacité de la deshydrogénase mitochondriale à convertir le MTT en un précipité pourpre de formazan. L'activité de la deshydrogénase mitochondriale rend compte de la viabilité cellulaire.

Le MTT est préparé dans du PBS à une concentration de 2 mg/ml et stocké à l'abri de la lumière et à - 20°C.

Après 60 heures d'incubation, 50  $\mu$ l de MTT (2 mg/ml) sont ajoutés dans les puits et les cellules sont remises à l'étuve pendant 4 heures. Le milieu est alors éliminé et les cristaux de formazan sont dissous par addition de 200  $\mu$ l de DMSO (Sigma). La mesure de la

D.O.<sub>540nm</sub> est effectuée par utilisation d'un lecteur automatique série 750 microplate reader (Bio-rad, Marnes la Coquette, France). L'index de stimulation est obtenu en divisant la valeur d'absorbance moyenne obtenue avec les splénocytes co-cultivés extraits des souris traitées (SAB ; SAB/Alum ; SAB-microcapsules) par la valeur d'absorbance moyenne obtenue avec les splénocytes co-cultivés extraits des souris ayant reçues des injections de sérum physiologique (souris témoins).

## **10. Analyse statistique**

Les groupes expérimentaux ont été comparés par le test *t* de Student. Les données sont significatives lorsque *P* est inférieur ou égale à 0,05.

### **III/ Mise au point d'une nouvelle stratégie d'immunothérapie anti-mélanome B16R par injection de protéines solubles totales B16R chargées dans des microcapsules d'HEA**

#### **1. Culture cellulaire**

##### **1 1. Les cellules tumorales**

La lignée de cellules B16 résistantes à la doxorubicine (B16R), utilisée *in vitro* et *in vivo*, sont à l'origine de mélanomes chez les souris C57Bl/6, d'haplotype H2b. Ces cellules adhérentes dérivent du stock ATCC (B16F0) et ont été isolées par le docteur Rosana Supino à l'institut National des tumeurs de Milan (Fomelli *et coll.*, 1986) par une sélection progressive des cellules B16V, obtenues à partir de mélanomes B16F0 transplantés *in vivo*, en présence de concentrations croissantes de doxorubicine. Leur indice de résistance à la doxorubicine est de  $3,5 \cdot 10^{-7}$  M. Elles ont fait l'objet d'un suivi sanitaire (test au mycoplasme) avant leur congélation et à la fin de chaque cycle de culture. Un traitement à la doxorubicine ( $3,5 \cdot 10^{-7}$  M) (Dakota Pharm, Créteil, France) est réalisé tous les mois pour maintenir la résistance de cette lignée cellulaire.

##### **1. 2. Culture de cellules en monocouche**

La lignée cellulaire B16R est constituée de cellules adhérentes qui peuvent être cultivées *in vitro* en monocouche en milieu RPMI 1640 (Gibco Invitrogen) auquel est ajouté 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco Invitrogen) décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 minutes.

Cette lignée cellulaire est manipulée dans une hotte stérile à flux laminaire vertical et cultivée dans un incubateur à 37°C sous atmosphère contrôlée : 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % air atmosphérique, 90 % d'hygrométrie. Les techniques d'entretien indispensables sont le changement de milieu et le repiquage, correspondant au transfert des cellules dans de nouvelles boîtes de culture lorsque celles-ci recouvrent 80 % de la surface du support. Le détachement des cellules est réalisé par action enzymatique de la trypsine (Gibco Invitrogen). Afin d'enlever toute trace de SVF inhibant l'action de la trypsine, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du PBS (x1) dépourvu d'ions calcium et magnésium. L'ajout de milieu de culture complet permet la neutralisation de la trypsine. Les cellules sont alorsensemencées dans des boîtes de culture à raison de 80 000 cellules/ml de milieu de culture complet.

Afin de s'assurer que les cellules ne sont pas contaminées par des mycoplasmes, celles-ci doivent régulièrement faire l'objet d'un test de détection des mycoplasmes (cf III/ 2. 3.).

### **1. 3. Culture de cellules en sphéroïde**

Pour générer des sphéroïdes, tout comme pour le repiquage de cellules en monocouche, le tapis de cellules B16R (en phase exponentielle de croissance) est rincé deux fois avec du PBS (x1) dépourvu d'ions calcium et magnésium (Gibco Invitrogen) et les cellules sont détachées de la boîte de culture par trypsination (Gibco Invitrogen). Les cellules sontensemencées dans les puits d'une plaque 96 puits préalablement recouverts avec 40 µl d'agarose à 1.33% (Sigma) et cela à raison de 50 000 cellules par puit dans un volume de 100 µl. Les plaques sont incubées 24 h dans un incubateur à 37°C sous atmosphère contrôlée et sous agitation tridimensionnelle (Bioblock Scintific, Heidolph polymax 1040, vitesse 8). Les sphéroïdes ainsi formés sont mis en culture dans les mêmes conditions. La moitié du volume final de milieu est renouvelée au bout de 48 heures.

### **1. 4. Test au mycoplasme**

Un test au mycoplasme est effectué avant la congélation de la lignée cellulaire et à la fin de chaque cycle de décongélation grâce au colorant Hoechst 33342 (Sigma). Le Hoechst est une molécule fluorescente qui se lie de manière stable à l'ADN. Ainsi, les noyaux cellulaires apparaissent colorés en bleu au microscope à fluorescence (observation dans l'UV). S'il y a contamination des cellules, l'ADN des mycoplasmes est également coloré, ce qui permet leur détection.

Pour cela, après trypsination, les cellules sont centrifugées pendant 7 minutes à 350 g. Le culot cellulaire est repris dans du PBS contenant 20% de SVF et ceci à raison de 100 000 cellules/ml. Deux cents microlitres de milieu sont alors déposés sur des lames qui vont subir une cyto-centrifugation. Après avoir laissé sécher les lames, les cellules vont être fixées et perméabilisées pendant 10 minutes avec du Paraformaldéhyde 3% (Sigma) contenant 0,1% de Triton x100 (Sigma). Après 3 lavages de 5 minutes avec du PBS, les cellules sont colorées au Hoechst. Après une incubation de 10 à 15 minutes en présence du colorant et 3 lavages au PBS, l'ADN des mycoplasmes peut être mis en évidence sous lumière UV par observation à l'aide d'un microscope à fluorescence (Nikon Diaphot 300).

### **1. 5. Estimation de la viabilité cellulaire par le bleu trypan**

Le test d'exclusion au bleu trypan est basé sur la capacité des cellules saines à pouvoir exclure les colorants de haut poids moléculaire. Le bleu trypan (0,16 % dans du PBS) (Sigma-Aldrich) est ajouté volume/volume à 100 µl de suspension cellulaire. Une numération est ensuite effectuée sur les lames de comptage (Kova Glasstis slide 10, Hycor Biomedical Inc, Californie, Etats-Unis). Les cellules viables ne sont pas colorées contrairement aux cellules mortes. La viabilité cellulaire est alors établie en calculant le rapport :

Nombre de cellules non colorées / Nombre de cellules colorées.

### **2. Extraction des protéines solubles totales de mélanocytes tumoraux murins B16R**

Après trypsination et 3 lavages au PBS, le culot de cellules est suspendu dans du sérum physiologique et est agité au vortex. Trois cycles de congélation (-80°C) / décongélation (37°C) / vortex sont effectués. Le surnageant est récupéré après une centrifugation de 10 minutes, 20 000 g et à 4°C. Les protéines du surnageant sont dosées par la méthode de Bradford (Sigma-aldrich) selon les recommandations du fabricant.

### **3. Chargement des microcapsules d'HEA avec les protéines solubles totales extraites de mélanocytes tumoraux murins B16R**

Comme pour le § I/. 5., le chargement des protéines extraites de cellules B16R dans les microcapsules est obtenu par incubation de 5 mg de microcapsules lyophilisées dans 500 µl de solution de protéines B16R à différentes concentrations (0.025 ; 0.05 ; 0.075 et 0.1%)

préparées dans du sérum physiologique. De la même façon, la capacité et l'efficacité de chargement des microcapsules d'HEA pour les protéines B16R ont été déterminées.

Les résultats d'efficacité et de capacité de chargement obtenus sont utilisés pour la détermination de la concentration de la solution de protéines B16R à incuber avec les 5 mg de microcapsules pour permettre le chargement d'une quantité de protéines B16R déterminée.

#### **4. Précipitation des protéines à l'acétone**

La précipitation des protéines à l'acétone est utilisée pour concentrer les protéines solubles B16R restantes après le chargement dans les microcapsules d'HEA. Les protéines ainsi concentrées vont pouvoir subir une électrophorèse. Pour cela, un volume de surnageant récupéré après imbibition des microcapsules est ajouté à 4 volumes d'acétone froid. Le tout est mélangé, disposé 20 min à -20°C et centrifugé (15 min-20 000 g-4°C). Le culot protéique obtenu après élimination du surnageant et séchage à l'air, est repris dans du tampon d'échantillon (20 µg/20 µl de tampon).

#### **5. Electrophorèse des protéines solubles totales B16R**

Une électrophorèse des extraits protéiques issus de cellules B16R avant et après chargement dans les microcapsules d'HEA est réalisée sur gel de polyacrylamide précoulé d'un gradient 4 à 12% SDS (Invitrogen) selon la technique mise au point par Laemmli (cuve à électrophorèse verticale type XCell Surelock, Invitrogen.). La migration est effectuée à 200 Volts pendant 35 min dans du tampon de migration (Invitrogen).

#### **6. Cytotoxicité *in vitro* des microcapsules d'HEA**

La cytotoxicité des microcapsules d'HEA sur les cellules B16R est testée grâce à la technique au MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltetrazolium) (Sigma)

Le MTT est préparé dans du PBS à une concentration de 2, 5 mg/ml et stocké à l'abri de la lumière et à -20°C.

##### **6. 1. Cytotoxicité des microcapsules d'HEA sur les cellules B16R cultivées en monocouche**

Les cellules B16R sontensemencées dans une plaque 96 puits à une densité de 5 000 cellules par puit dans un volume de 100 µl de milieu RPMI supplémenté avec 10 % de SVF

(RPMI/SVF 10 %). Après 12 heures d'incubation dans une étuve à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub> permettant l'adhérence des cellules, 100 µl de différentes concentrations de microcapsules sont ajoutés dans les puits. Après 72 heures d'incubation, 20 µl de MTT (2,5 mg/ml) sont ajoutés dans les puits et les cellules sont remises à l'étuve pendant 3 heures. Le milieu est alors éliminé et les cristaux de formazan sont dissous par addition de 200 µl de DMSO (Sigma). La mesure de la D.O.<sub>540 nm</sub> est effectuée par utilisation d'un lecteur automatique série 750 microplate reader (Bio-Rad).

## **6. 2. Cytotoxicité des microcapsules d'HEA sur les cellules B16R cultivées en sphéroïdes**

Après 3 jours de culture, la moitié du volume de milieu de culture des sphéroïdes, soit 50 µl sont renouvelés et 100 µl des différentes concentrations de microcapsules sont ajoutés dans les puits. Après 72 heures d'incubation dans une étuve à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>, les sphéroïdes sont transférés dans une nouvelle plaque 96 puits et deux lavages au PBS sont effectués. La plaque est centrifugée 10 min à 250 g et 200 µl de milieu frais sont ajoutés. Les sphéroïdes sont dissociés manuellement à l'aide d'une pipette automatique, 20 µl de MTT sont ajoutés et les cellules sont remises à l'étuve pendant 3 heures et la même technique décrite ci-dessus est réalisée.

Le pourcentage de viabilité cellulaire est obtenu en divisant la valeur d'absorbance moyenne des échantillons traités par la valeur d'absorbance moyenne des échantillons contrôles non traités fois cent.

## **7. Analyse par cytométrie de flux de l'expression de molécules de Classe I à la surface des cellules B16R**

### **7. 1. A la surface des cellules B16R cultivées *in vitro***

Des cellules B16R (1.10<sup>6</sup> cellules par puits)ensemencées à J-1 dans les puits d'une plaques 6 puits recouverts de 2 ml d'agarose 1,33%, sont récupérées et réparties dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml à raison de 1.10<sup>6</sup> cellules /tube. Après un premier lavage en PBS (centrifugation 10 min à 400 g), elles sont incubées avec l'anticorps ou l'isotype contrôle (Tab. IV) pendant 30 min. Après deux lavages, les culots cellulaires sont repris dans 500 µL de PBS. Les échantillons ainsi obtenus sont analysés en cytométrie de flux (Becton Dickinson, FACS Calibur) et les acquisitions de données gérées par le logiciel CellQUEST (BD Biosciences, France).

### 7. 2. A la surface des cellules B16R récupérées *in vivo*

Trois, six, sept et 21 jours après les inoculations sous-cutanées de  $1.10^6$  cellules B16R viables suspendues dans 100  $\mu\text{L}$  de sérum physiologique, les tumeurs B16R sont prélevées et dilacérées mécaniquement dans du milieu RPMI/SVF 10%. La suspension cellulaire obtenue est alors filtrée (50  $\mu\text{m}$ ) et répartie dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml. Après un premier lavage en PBS (centrifugation 10 min à 400 g), les cellules sont incubées avec l'anticorps ou l'isotype contrôle (Tab. IV) pendant 30 min. Après deux lavages, les culots cellulaires sont repris dans 500  $\mu\text{L}$  de PBS. Les échantillons ainsi obtenus sont analysés en cytométrie de flux (Becton Dickinson, FACS Calibur) et les acquisitions de données gérées par le logiciel CellQUEST (BD Biosciences, France).

### 7. 3. A la surface des cellules B16R stimulées *in vitro* avec de l'IFN- $\gamma$

Des cellules B16R (150 000 cellules/puit) sontensemencées à J0 dans les puits d'une plaque 6 puits. Le lendemain (J1) 1 ml de RPMI/SVF 10% contenant 250 UI d'IFN- $\gamma$  sont ajoutés dans les puits. Trois jours plus tard (J4) les cellules ainsi traitées sont récupérées et réparties dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml à raison de 200 000 cellules /tube. Après un premier lavage en PBS (centrifugation 10 min à 400 g), elles sont incubées avec l'anticorps ou l'isotype contrôle (Tab. IV) pendant 30 min. Après deux lavages, les culots cellulaires sont repris dans 200  $\mu\text{L}$  de PBS. Les échantillons ainsi obtenus sont analysés en cytométrie de flux (Becton Dickinson, FACS Calibur) et les acquisitions de données gérées par le logiciel CellQUEST (BD Biosciences, France).

**Tableau IV:** Anticorps utilisés pour la recherche des molécules de classe I à la surface des cellules B16R

Anticorps	Isotype
Mouse anti-mouse MHC Class I H-Kb: FITC (clone CTKb ; Serotec, Cergy Saint-Christophe, France)	IgG2a de souris

## 8. Les traitements prophylactiques

### 8. 1. Les Souris

Cf § I/ 1. 1.

### 8. 2. Composition des lots injectés

Six lots de souris ont reçu différentes injections intra-péritonéales (lots 1, 2 et 3) ou sous-cutanées (lots 1', 2' et 3') résumées dans les tableaux suivants :

**Tableau V:** Composition des lots de souris traitées prophylactiquement par voie *i.p.* avec des protéines B16R ou des protéines B16R-microcapsules.

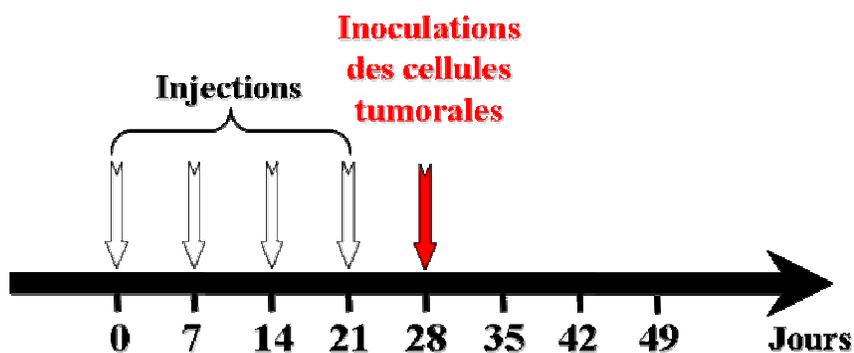
Lot N°	Nombre de souris	Préparations vaccinales
1	6	200 µl de sérum physiologique (souris témoins)
2	6	200 µg de protéines solubles extraites de cellules B16R dans 200 µl de sérum physiologique <b>(Protéines B16R)</b>
3	6	5 mg de microcapsules chargées avec 200 µg de protéines B16R dans 200 µl de sérum physiologique <b>(Protéines B16R-microcapsules)</b>

**Tableau VI :** Composition des lots de souris traitées prophylactiquement par voie *s.c.* avec des protéines B16R ou des protéines B16R-microcapsules.

Lot N°	Nombre de souris	Préparations vaccinales
1'	9	100 µl de sérum physiologique
2'	9	200 µg de protéines solubles extraites de cellules B16R dans 100 µl de sérum physiologique <b>(Protéines B16R)</b>
3'	9	5 mg de microcapsules chargées avec 200 µg de protéines B16R dans 100 µl de sérum physiologique <b>(Protéines B16R-microcapsules)</b>

### 8. 3. Protocole d'immunisation

Suite à la primo injection, trois rappels espacés de 7 jours sont effectués. Une semaine après le dernier rappel,  $1.10^6$  cellules B16R viables en suspension dans 100 µl de sérum physiologique sont injectées sur le flanc gauche des souris en sous-cutanée (Fig. 15).



**Figure 15 :** Protocole d'immunisation des souris traitées prophylactiquement par voie *i.p.* et *s.c.* avec des protéines B16R ou des protéines B16R-microcapsules.

### 8. 4. Evaluation du développement tumoral et de sa progression

Après l'apparition tumorale, le suivi du développement tumoral se fait deux à trois fois par semaine par la mesure, au pied à coulisse, du plus grand diamètre apparent de la tumeur. Ceci nous permet d'en évaluer la surface d'une section en  $\text{cm}^2$ . Nous pouvons ainsi établir une courbe du développement tumoral en fonction du temps.

### **8. 5. Prélèvement de sang et récupération du plasma**

Les prélèvements de sang ont eu lieu à J7, J11, J18 et J28 chez les souris prétraitées par voie *s.c.* uniquement. Environ 100 µl de sang sont prélevés au niveau de la queue des animaux à l'aide de capillaires héparinés (Instrumentation Laboratory). Le sang est transféré dans des tubes Eppendorf de 0,5 ml et centrifugés 5 min à 20 000 g. Les plasmas sont récupérés et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

### **8. 6. Dosage immuno-enzymatique des IgG dirigées contre les cellules B16R**

Le niveau de production d'anticorps dirigés contre les cellules B16R chez les animaux prétraités par voie *s.c.* a été évalué par la technique ELISA. Les cellules B16R sont ensemencées dans une plaque 96 puits à une densité de 10 000 cellules par puit dans un volume de 100 µl de milieu RPMI/SVF 10%. Après 12 heures d'incubation dans une étuve à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules sont lavées et fixées par ajout de 100 µl de formol par puit. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, les puits sont lavés avec de l'eau distillée et saturés avec 250 µl/puit de PBS/BSA 2% pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation tridimensionnelle. Après lavage, 100 µl de sérum de souris dilués au 1/500<sup>ème</sup> dans du PBS/BSA 1% sont ajoutés dans les puits appropriés et incubés pendant 2 heures à 37°C sous agitation. Les puits sont ensuite lavés et 50 µl d'anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (GAM-IgG-HRP, Jackson Immunoresearch, Interchim, Montluçon, France) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS/BSA 1% sont ajoutés dans les puits. Après 1 heure d'incubation à 37°C sous agitation et lavage, 100 µl de substrat de la peroxydase (3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine, TMB) sont ajoutés dans les puits pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière avant de lire les absorbances à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Bio-Rad). Les valeurs d'absorbance moyennes obtenues avec les souris témoins (traitées avec du sérum physiologique) sont soustraites aux valeurs d'absorbances obtenues avec les souris traitées (Protéines B16R et Protéines B16R-microcapsules)

### **8. 7. Récupération des cellules spléniques et mise en rééducation**

Sept jours après le dernier rappel, 3 souris de chaque lot d'animaux prétraités par voie *s.c.* sont sacrifiées, leur rate est prélevée et dilacérée dans du milieu RPMI/SVF 5% pour en récupérer les cellules spléniques. Après centrifugation (350 g, 10 minutes, 22°C), les culots cellulaires sont repris dans 3 ml de RPMI/SVF 5 % et sont déposés délicatement sur 3 ml

d'une solution de ficoll afin d'isoler les cellules mononucléées des autres cellules sanguines par gradient de densité (800 g, 20 minutes). Après 2 lavages au RPMI/SVF 5 %, les cellules sont remises en suspension dans du milieu RPMI/SVF 10 % supplémenté d'antibiotiques (streptomycine 10 µg/ml, pénicilline 100 U/ml) avant d'être mises en rééducation.

Les cellules spécifiques des antigènes tumoraux étant en faible proportion, il est difficile de déceler les cellules effectrices actives quand elles sont directement isolées chez l'animal. Une co-culture *in vitro* avec des cellules cibles est donc nécessaire pour détecter une activité cytolytique reflétant l'activation et l'expansion des cellules effectrices. Pour cela, des cellules B16R sont ensemencées dans une plaque 6 puits à une densité de  $1,5 \cdot 10^6$  cellules par puit dans un volume de 5 ml de milieu RPMI/SVF 10 %. Après 12 heures d'incubation dans une étuve à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>, un agent cytotatique, la mitomycine (Sigma-aldrich), est ajoutée à raison de 0,5 mg/ml dans les puits afin de bloquer la prolifération des cellules. Après 4 heures d'incubation, 3 lavages au RPMI sont effectués et les cellules spléniques sont déposées sur les cellules B16R à raison de  $20 \cdot 10^6$  cellules par puit dans 9 ml de RPMI/SVF 10 % contenant des antibiotiques et de l'interleukine-2 (1,42 ng/ml ; Sigma-aldrich) (ratio cellules effectrices/cellules cibles=10). Les cellules sont laissées en co-culture pendant 6 jours.

#### **8. 8. Analyse par cytométrie en flux des populations lymphocytaires avant et après la mise en rééducation des cellules spléniques**

Les cellules spléniques obtenues avant et après rééducation sont réparties dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml à raison de 200 000 cellules /tube. Après un premier lavage en PBS (centrifugation 10 min à 400 g), elles sont incubées avec les différents anticorps ou isotype contrôle (Tab. VII). Après une incubation de 30 min et deux lavages au PBS, les culots cellulaires sont repris dans 200 µL de PBS avant d'être analysés par cytométrie en flux.

Pour les lymphocytes murins T CD8<sup>+</sup>, une analyse par cytométrie en flux deux couleurs est réalisée au moyen d'un cytomètre en flux FACSCalibur (BD Biosciences). La population lymphocytaire est identifiée sur la base de ses caractéristiques de taille (FSC) et de complexité (SSC), mais surtout sur la présence ou l'absence à leur surface des marqueurs TCR et CD8. De la même façon, les lymphocytes NK 1.1<sup>+</sup> sont analysés par cytométrie en flux une couleur.

L'acquisition des données est réalisée sur un minimum de 10 000 évènements et l'analyse réalisée par le logiciel CellQUEST (BD Biosciences).

**Tableau VII:** Les anticorps utilisés pour l'analyse des populations lymphocytaires

Anticorps	Isotypes
Hamster anti-mouse TCR alpha/beta (Beta Chain): RPE (clone H57-597; Serotec)	IgG de hamster
Rat anti-mouse CD8 ALPHA: APC (clone KT15; Serotec)	IgG <sub>2a,λ</sub> de rat
Mouse anti-mouse NK-1.1 Antigen : RPE (clone PK136 ; Serotec)	IgG <sub>2a</sub> de souris

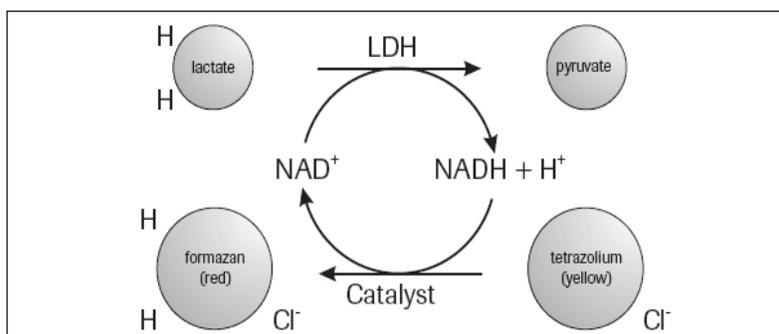
## 8. 9. Test de relargage de la lactate déshydrogénase

### 8. 9. 1. Principe

La réponse immunitaire à médiation cellulaire des cellules spléniques vis-à-vis des cellules tumorales peut être évaluée grâce à l'utilisation d'un test de relargage de la lactate déshydrogénase (LDH). Ce test colorimétrique permet de quantifier le taux de lyse cellulaire en mesurant l'activité de la LDH, enzyme cytosolique ubiquitaire libérée dans le surnageant de culture par les cellules lysées. L'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité de cellules lysées (Fig. 16).

### 8. 9. 2. Test LDH

Après 6 jours de co-culture avec les cellules tumorales, les cellules spléniques rééduquées sont récupérées puis déposées sur ficoll (volume/volume). Les cellules mononucléées sont récupérées et lavées. Ces cellules effectrices (E) sont ensuite mises en co-culture dans des plaques 96 puits ensemencées la veille avec des cellules cibles B16 R viables (C) (ratio E/C=25).



**Figure 16 :** Principe enzymatique du test LDH.

Différents témoins sont utilisés pour déterminer le relargage spontané des cellules effectrices (cellules spléniques seules), des cellules cibles (cellules B16R seules), le relargage

maximal de LDH par les cellules cibles (cellules B16R avec Triton 1 %) et le bruit de fond (milieu seul).

Après 4 heures de co-culture, les plaques sont centrifugées (250 g, 5 minutes), 75 µl de surnageant sont transférés dans une nouvelle plaque 96 puits et incubés avec 75 µl de mélange réactionnel fourni par le kit de détection de la LDH (Roche Applied Science, Allemagne) pendant 10 minutes à l'obscurité. La lecture des absorbances à 490 nm est effectuée par un lecteur de microplaques.

Le pourcentage de cytolysé des cellules spléniques vis-à-vis des cellules B16R est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ de cytolysé} = \frac{(\text{Effecteurs/cibles}) - \text{Effecteurs seuls} - \text{Cibles}}{\text{Triton 1\%} - \text{Cibles seules}}$$

## 9. Les traitements curatifs

### 9. 1. Les Souris

Cf I/1. 1.

### 9. 2. Compositions des lots injectés

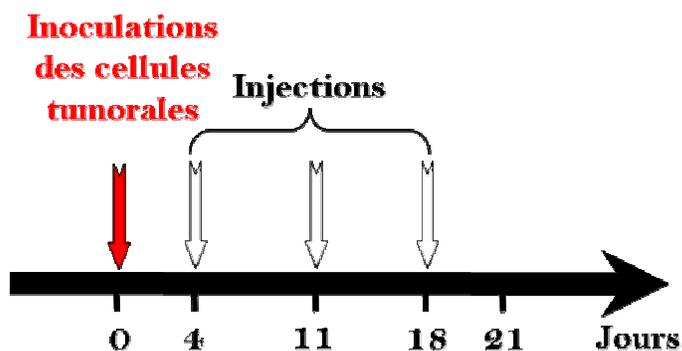
Trois lots de souris ont reçu différentes injections sous-cutanées résumées dans le tableau suivant :

**Tableau VIII :** Composition des lots de souris traitées curativement par voie *s.c.* avec des protéines B16R ou des protéines B16R-microcapsules.

Lot N°	Nombre de souris	Préparations vaccinales
1	3	200 µl de sérum physiologique
2	3	200 µg de protéines solubles extraites de cellules B16R dans 100 µl de sérum physiologique <b>(Protéines B16R)</b>
3	3	5 mg de microcapsules chargées avec 200 µg de protéines B16R dans 100 µl de sérum physiologique <b>(Protéines B16R-microcapsules)</b>

### 9. 3. Protocole d'immunisation

Quatre jours après l'injection de  $1.10^6$  cellules B16R viables en suspension dans 100  $\mu$ l de sérum physiologique sur le flanc gauche des souris en sous-cutanée, 3 injections espacées de 7 jours ont été effectuées à proximité de la tumeur (Fig. 17).



*Figure 17* : Protocole d'immunisation des souris traitées curativement par voie *s.c.* avec des protéines B16R ou des protéines B16R-microcapsules.

### 9. 4. Evaluation du développement tumoral et de sa progression

Cf § III/ 8. 4.

Un intérêt croissant pour les systèmes microparticulaires de libération d'antigène a été mis en évidence ces dernières années. Cet intérêt est basé sur différents avantages tels que l'induction d'une stabilité plus importante des antigènes chargés et le relargage contrôlé de ces derniers (Eldridge *et coll.*, 1991 ; Degling *et coll.*, 1995 ; Putney *et coll.*, 1998). Ils facilitent la capture, le transport et/ou la présentation des antigènes par les CPA qui sont capables d'activer directement les cellules T (Reddy *et coll.*, 2006). Tout cela en font des adjuvants efficaces en vaccination peptidique. Ces adjuvants particuliers peuvent différer par leur composition chimique et morphologique : liposomes, virosomes, ISCOMS (Immunostimulating Complex), émulsions, ou nano- et microparticules fabriquées à partir de biopolymères (Kersten, *et coll.*, 2003 ; O'Hagan *et coll.*, 2006). Dans cette dernière catégorie, le poly-lactide-co-glycolides (PLG), polyester biodégradable et biocompatible, a été le premier à être utilisé pour la fabrication de systèmes microparticulaires de libération de vaccin. En effet, il a été utilisé chez l'homme pendant de nombreuses années en tant que matériel de suture résorbable et comme système de libération contrôlée des drogues (Walter *et coll.*, 2001; Elamanchili *et coll.*, 2004 ; Waeckerle-Men *et coll.*, 2005). Dans cette même nécessité de biodégradabilité et de biocompatibilité, les microparticules à base d'amidon semblent être appropriées (Rydell *et coll.*, 2005). Seulement, des problèmes de dégradation *in vivo* trop rapide de l'amidon, et donc de libération précoce des protéines chargées font de ces microparticules un mauvais candidat (Larionova *et coll.*, 1999).

Pour la préparation de nos microcapsules, nous avons choisi un dérivé de l'amidon couramment utilisé en clinique comme soluté de remplissage : l'hydroxyéthylamidon (HEA) (Voluven®) (Langeron *et coll.*, 2001; Jungheinrich *et coll.*, 2002). Ce dernier possède les mêmes caractéristiques que l'amidon, mais est beaucoup moins rapidement dégradé dans l'organisme. Ainsi, des microcapsules d'HEA ont été synthétisées par un procédé de réticulation interfaciale utilisant le chlorure de téréphtaloyle comme agent réticulant (Levy *et coll.*, 1990).

Au cours de cette première partie, nous avons étudié les caractéristiques de ces microcapsules d'HEA dans l'objectif de déterminer si elles peuvent être utilisées en vaccination peptidique. Pour cela, la morphologie et la taille des microcapsules ont été étudiées par microscopie optique, confocale, électronique et par granulométrie laser. L'analyse de la membrane des microcapsules par spectroscopie infrarouge a été réalisée. Les caractéristiques de chargement et de relargage ont été étudiées à l'aide d'une protéine modèle : la sérum albumine bovine (SAB) ainsi que la dégradation de ces microcapsules *in vitro* et *in vivo*.

## **1. Faisabilité**

La faisabilité est appréciée selon différents critères:

- *Le « rendement » des microcapsules :*

La préparation des microcapsules d'hydroxyéthyl amidon donne lors des différents lavages et centrifugations, des culots de volume important. Après lyophilisation, le poids de poudre obtenu est proche du poids du polymère mis en jeu reflétant ainsi une bonne réticulation du polysaccharide par l'agent réticulant.

- *La résistance mécanique de la paroi :*

Ces propriétés vont permettre d'une part, une bonne lyophilisation des microcapsules sans altération de la paroi, et d'autre part, une reprise de la forme sphérique après réhydratation. Cette résistance mécanique est vérifiée par des études en microscopie.

## **2. Analyse de la membrane des microcapsules par spectroscopie Infrarouge.**

Le procédé de préparation des microcapsules a été étudié par spectroscopie Infrarouge. Le spectre IR obtenu présente une bande d'absorption à  $3400\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations des liaisons O-H dans les polysaccharides (Fig.18 bande n°1) (Levy *et coll.*, 1991). Les différences notables entre le spectre de l'hydroxyéthyl amidon et celui des microcapsules d'hydroxyéthylamidon correspondent aux bandes d'absorptions situées respectivement à  $1717\text{ cm}^{-1}$  (Fig.18 bande n°2) et  $1277\text{ cm}^{-1}$  (Fig.18 bande n°3). Ces bandes sont dues à la vibration des liaisons esters (C=O) formées lors de la préparation des microcapsules. Ces liaisons esters se forment entre les groupements O-H de l'amidon et les groupements C=O-Cl du chlorure de téréphtaloyle.

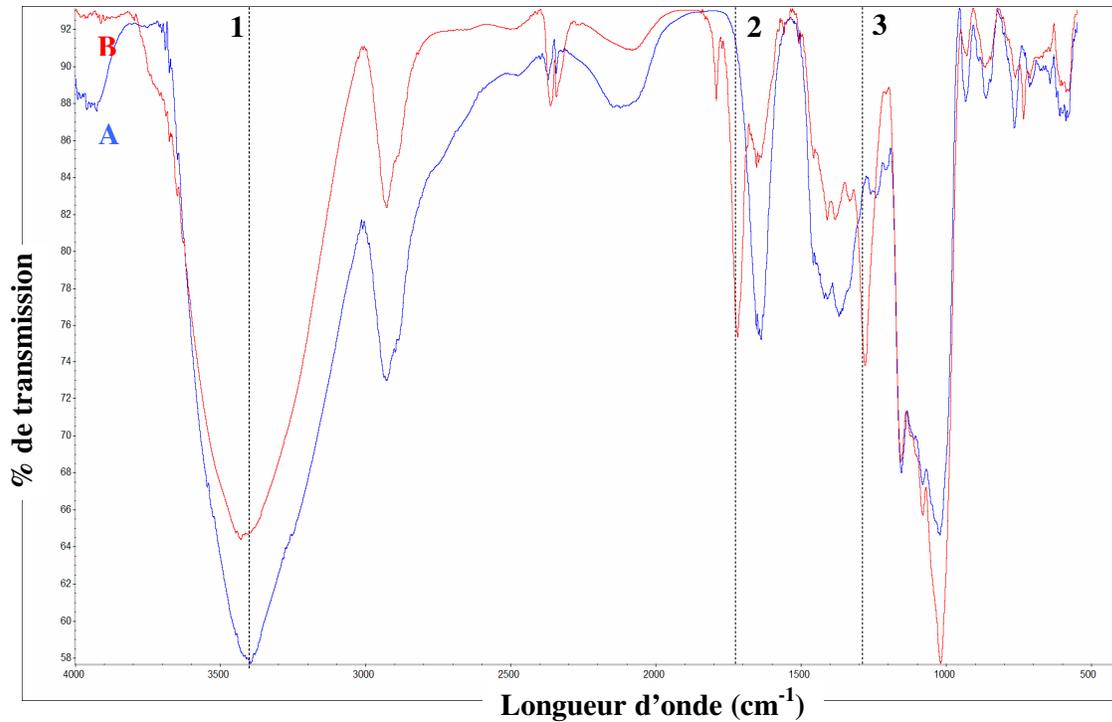


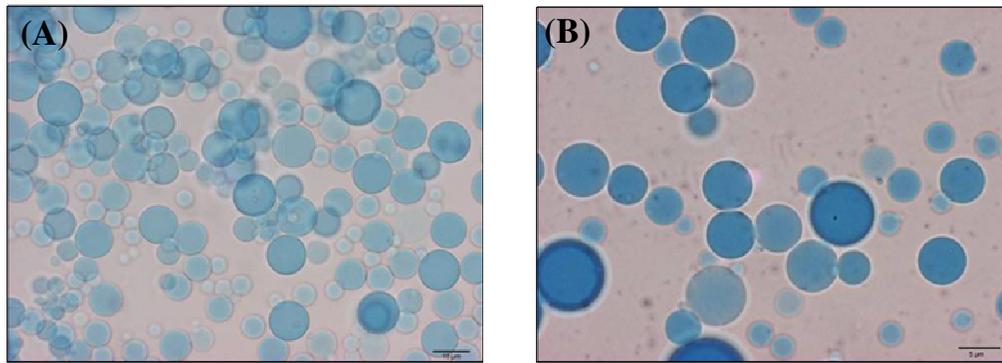
Figure 18 : Spectres FT-IR de l'hydroxyéthyl amidon (A) et des microcapsules (B)

### 3. Etude de la morphologie des microcapsules d'HEA par différentes techniques de microscopie

Les microcapsules ont été caractérisées par des techniques de microscopie optique, microscopie confocale et microscopie électronique à balayage.

#### 3. 1. En microscopie optique

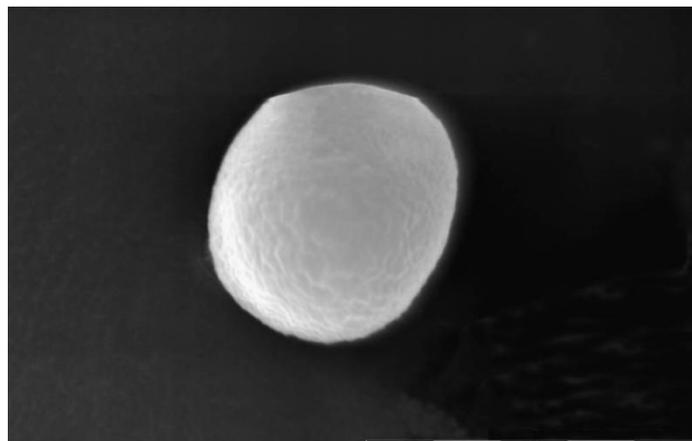
Les microcapsules d'hydroxyéthyl amidon remises en suspension dans l'eau et colorées au bleu de méthylène apparaissent transparentes (Fig. 19A). Elles sont monodispersées et uniformes avec une paroi épaisse facilement observable au grossissement 40 (Fig. 19B).



**Figure 19** : Microcapsules d'HEA colorées au bleu de méthylène observées en microscopie photonique (A) grossissement 20 x et (B) 40 x. Barre d'échelle : (A) 10 µm et (B) 5 µm.

### 3. 2. En microscopie électronique à balayage

Cette technique a permis de mettre en évidence, la bonne sphéricité des microcapsules et le caractère lisse de leur surface (Fig. 20). Ces résultats montrent que les différents lavages effectués au cours de la préparation des microcapsules ont permis d'éliminer le chlorure de téréphtaloyle en excès, qui peut être gênant lors du chargement de celles-ci. En microscopie électronique à balayage, l'excès de chlorure de téréphtaloyle est facilement caractérisable par la présence d'aiguilles à la surface des microcapsules.



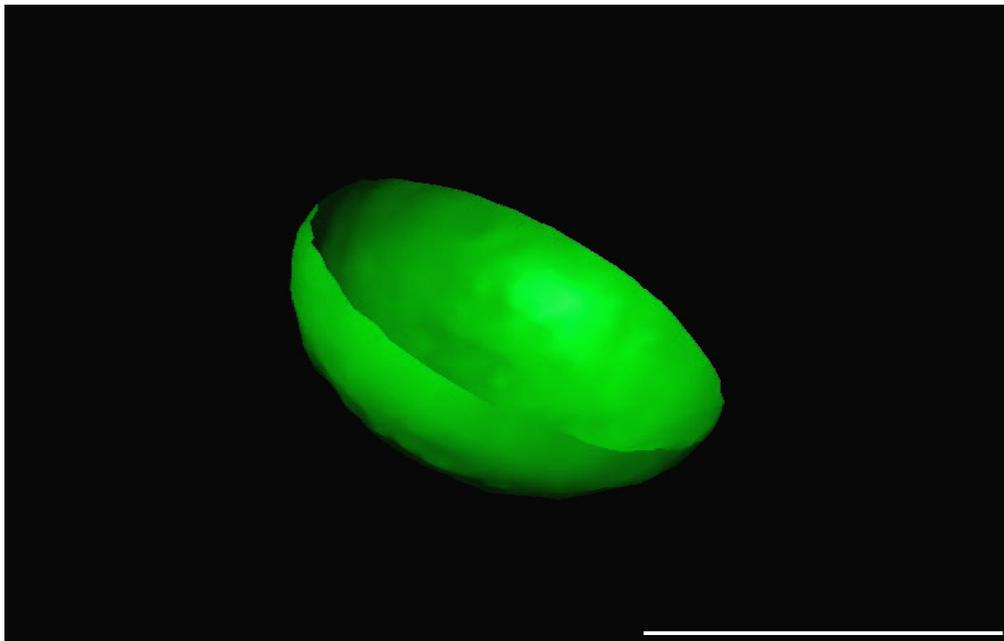
**Figure 20** : Etude d'une microcapsule d'HEA par microscopie électronique à balayage (grossissement x 5000). Barre d'échelle : 10 µm

Afin de pouvoir utiliser ces microcapsules comme vecteurs de peptides ou de protéines, il était important de vérifier leur structure vésiculaire ou matricielle. Pour cela, nous avons utilisé la technique de microscopie confocale permettant de réaliser des

reconstructions en 3-dimensions. Des microcapsules fluorescentes ont été synthétisées par incorporation d'une solution de fluoresceinamine à 0,05% dans la phase aqueuse.

### **3. 3. En microscopie confocale**

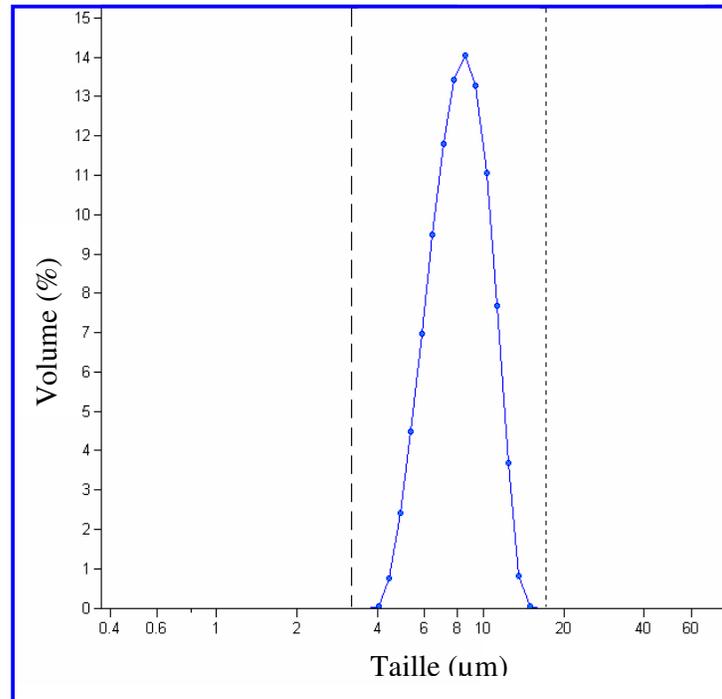
La reconstruction en 3-dimensions d'une microcapsule marquée à la fluoresceinamine et la projection d'une demie hauteur ont permis de démontrer le caractère évidé des microcapsules (Fig.21).



**Figure 21** : Etude d'une microcapsule d'HEA par microscopie confocale après marquage à la fluoresceinamine. Barre d'échelle 10  $\mu\text{m}$ .

### **4. Evaluation de la taille des microcapsules par granulométrie laser**

La taille moyenne des microcapsules a été évaluée grâce à l'utilisation d'un granulomètre laser. Les tailles des microcapsules suivent une répartition Gaussienne avec une limite à gauche de 4  $\mu\text{m}$  et une limite à droite de 15  $\mu\text{m}$ , avec une majorité de microcapsules ayant une taille de 8.3  $\mu\text{m}$  (Fig.22).

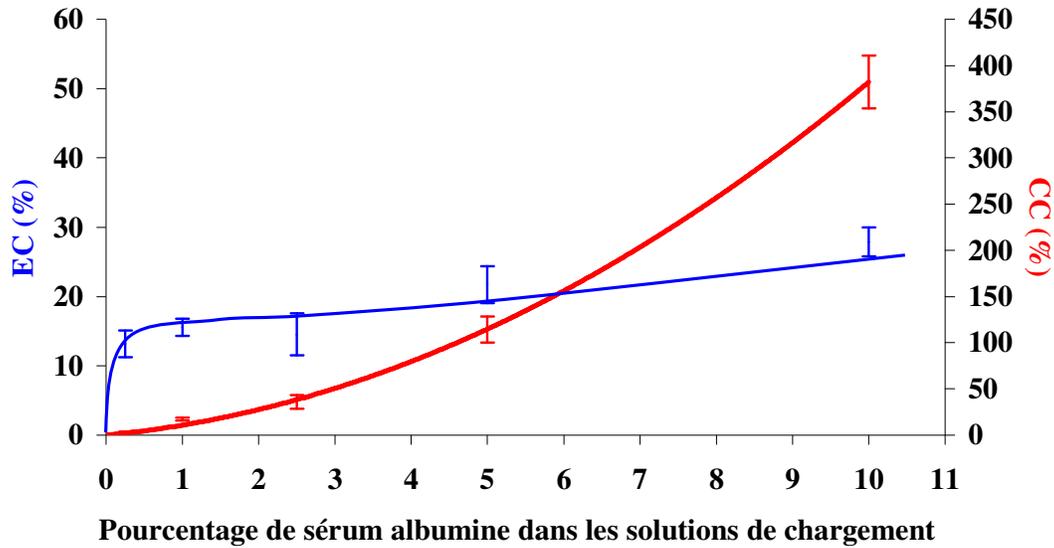


**Figure 22 :** Détermination de la taille des microcapsules par un granulomètre laser

### **5. Détermination de la capacité et de l'efficacité de chargement des microcapsules d'HEA pour la sérum albumine bovine**

Les microcapsules ont été chargées avec différentes concentrations de sérum albumine bovine (SAB) par incubation de 1 % de microcapsules lyophilisées (masse/volume) dans des solutions de SAB de concentrations comprises entre 0,025 et 10 % (masse/volume).

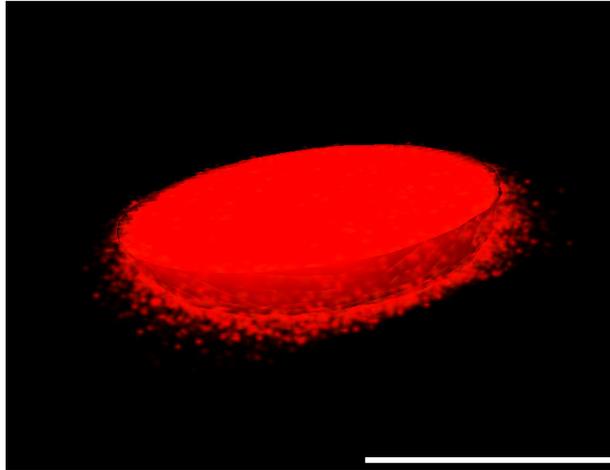
Après 3 h d'incubation, les capacités et les efficacités de chargement ont été déterminées. Comme le montre la Figure. 6, quelle que soit la concentration en SAB utilisée, l'efficacité de chargement (EC) est de  $17 \% \pm 4 \%$  (n=6) et la capacité de chargement augmente proportionnellement avec les concentrations de SAB dans les solutions de chargement.



**Figure 23 :** Capacité (CC) et Efficacité (EC) de chargement des microcapsules d'HEA pour la SAB

*Le chargement de la SAB dans les microcapsules est obtenu par incubation de 5 mg de microcapsules d'HEA lyophilisées dans 500  $\mu$ l de solution de SAB à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en moyennes des EC et des CC.  $\pm$  SEM ( $n=6$ ).*

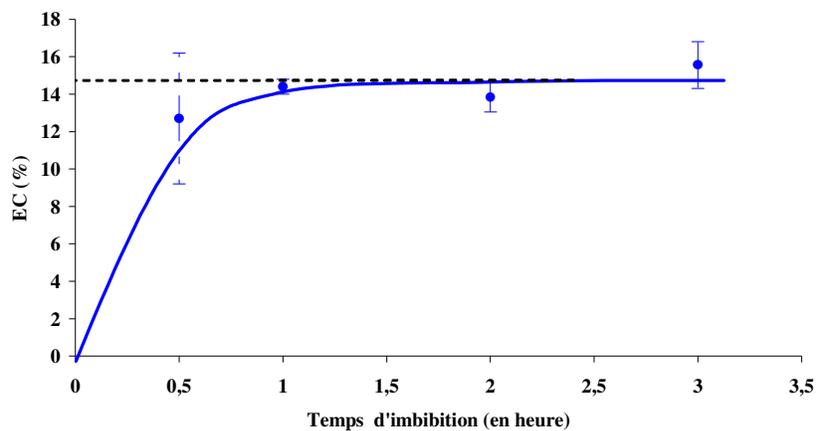
L'observation en microscopie confocale de microcapsules ayant été chargées avec une solution à 2,5% de SAB marquée au Texas Red permet de localiser cette SAB au niveau de la microcapsule (Fig.23). Cette technique nous permet de visualiser à la fois l'intérieur et la surface des microcapsules. Le marquage intérieur et extérieur des microcapsules d'HEA suggère que la SAB chargée se situe non seulement en surface mais aussi à l'intérieur des microcapsules.



**Figure 24 :** Microcapsules d'HEA chargées avec 2,5 % de sérum albumine bovine marquée au Texas Red observée en microscopie confocale. Barre d'échelle 5  $\mu\text{m}$ .

### 6. Influence du temps d'imbibition sur l'efficacité de chargement des microcapsules

Les microcapsules ont été chargées par incubation de 1 % de microcapsules lyophilisées (masse/volume) dans une solution de SAB à 1% (masse/volume). Après, 30min, 1h, 2h et 3h d'incubation, les efficacités de chargement des microcapsules ont été déterminées (n=3) (Fig.25).



**Figure 25 :** Efficacité de chargement (EC) des microcapsules d'HEA en fonction du temps d'imbibition.

A partir d'1h d'imbibition, l'efficacité de chargement des microcapsules atteint son maximum qui est d'environ 15%.

### 7. La cinétique de relargage *in vitro* de la SAB chargée dans les microcapsules d'HEA

Comme précédemment, les microcapsules ont préalablement été chargées par incubation de 1 % de microcapsules lyophilisées (masse/volume) dans une solution de SAB à 1% (masse/volume). Après 3h d'incubation et lavage du culot, le relargage *in vitro* de la SAB chargée a été déterminé pour différents temps : 1h, 3h, 18h, 24h, 48h, 72h et 1 semaine. Le lavage du culot provoque un relargage instantané d'environ 30% de la SAB chargée. Cela doit correspondre à la quantité de SAB présente à la surface des microcapsules et non à l'intérieure. Après lavage, le pourcentage de SAB relarguée stagne à 3.5% indépendamment du temps de relargage (Fig.26). Ce pourcentage très faible n'est pas significatif et doit correspondre à la SAB présente à la surface des microcapsules n'ayant pas été éliminée lors du lavage du culot.

Ces résultats indiquent que dans ces conditions, 70 % de la SAB restent piégés dans ou à la périphérie des microcapsules. Cela sous entend, qu'une importante partie de cette dernière pourrait être relarguée après dégradation des microcapsules d'HEA.

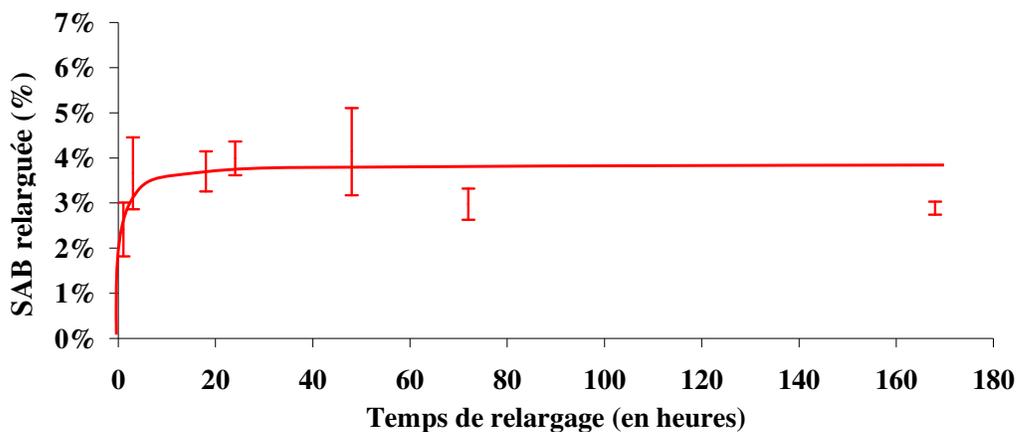


Figure 26 : Relargage de la SAB par les microcapsules en fonction du temps.

## 8. Etude de la dégradation des microcapsules d'HEA

### 8. 1. Dégradation *in vitro* des microcapsules d'HEA

La dégradation des microcapsules a été réalisée en présence d' $\alpha$  amylase, d'estérase ou du mélange des 2 enzymes en fonction du temps d'incubation. Elles permettent respectivement de dégrader la molécule d'amidon et les liaisons créées au cours de la préparation des microcapsules. Les microcapsules résistent à la dégradation par une solution d'estérase à 19 UI/ml quel que soit le temps de contact. Avec des solutions d' $\alpha$  amylase dont les concentrations sont comprises entre 0,1 et 0,5 mg/ml, nous avons montré une faible activité de dégradation. Avec une solution d' $\alpha$  amylase à 1 mg/ml, les microcapsules sont dégradées à 40 % dès 4 heures d'incubation et à 50 % au bout de 24 heures (Tab. IX). L'addition d'estérase (19 UI/ml) à la solution d' $\alpha$  amylase à 1 mg/ml permet d'augmenter la dégradation des microcapsules à un taux de 75 % au bout de 24 heures.

Ainsi, il semblerait nécessaire que la macromolécule d'amidon soit partiellement dégradée pour que l'estérase puisse couper les liaisons établies lors de la réticulation.

**Tableau IX:** Dégradation<sup>a</sup> des microparticules en présence ou non d'amylase, d'estérase en fonction du temps d'incubation

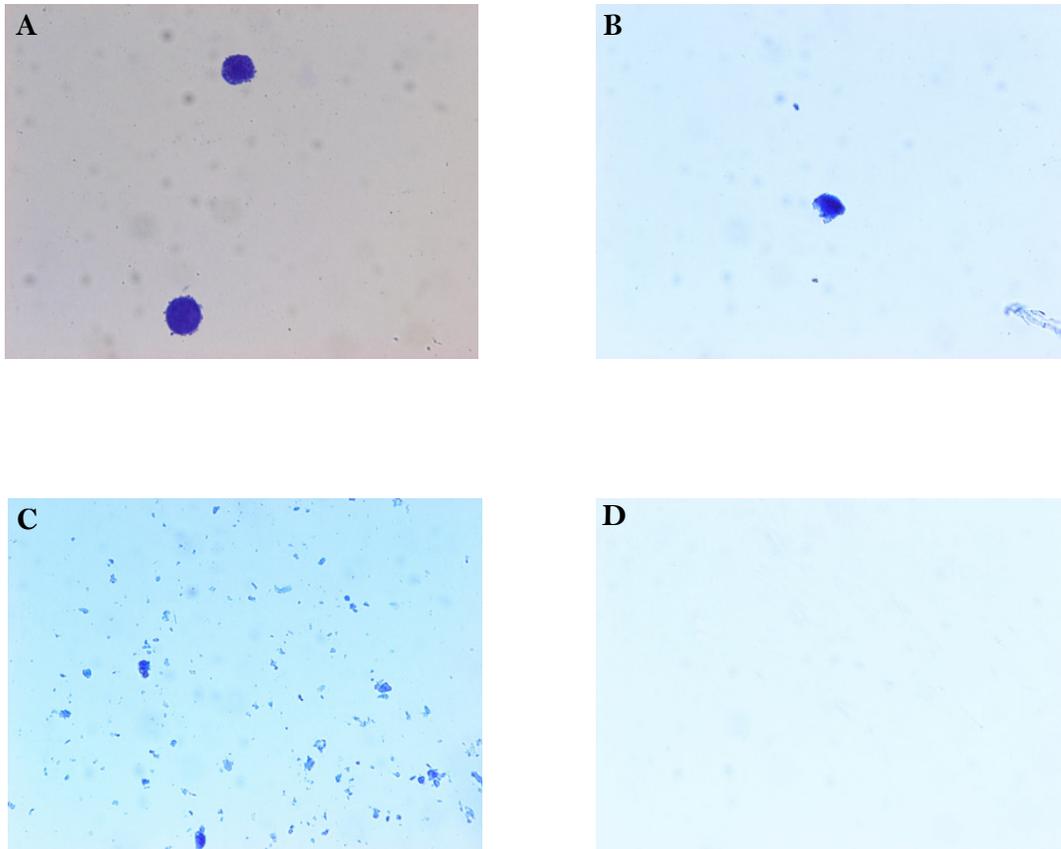
Temps de reaction	Sans enzyme	Amylase (1 mg/mL)	Esterase (19 UI/mL)	Amylase + Esterase
1h	-	-	-	-
2h	-	+/-	-	+/-
3h	-	+	-	+
4h	-	++	-	++
6h	-	++	-	+++
24h	-	+++	-	++++

<sup>a</sup>estimation de la dégradation des microcapsules comptées sur lame de Malassez: <5% (-), <10% (+/-), <20% (+), <40% (++) , <50% (+++), <75% (++++). Ce tableau est le résultat de 3 expériences indépendantes.

### 8. 2. Dégradation *in vivo* des microcapsules d'HEA

Cinq milligrammes de microcapsules suspendues dans 200  $\mu$ l de sérum physiologique ont été injectés par voie intrapéritonéale à un groupe de 21 souris femelles B6D2F1. Chaque jour, 3 souris ont été sacrifiées afin d'évaluer la dégradation des microparticules dans le liquide intrapéritonéal par microscopie optique (Fig.27).

Un jour après les injections, les parois des microcapsules colorées au bleu de méthylène deviennent moins lisses (Fig. 27A). Trois jours plus tard, les microcapsules sont ouvertes (Fig. 27B) et au cinquième jour après leur injection, seuls des débris sont observables (Fig.27C). Une semaine après les injections, aucune microcapsule, ni débris ne sont retrouvés. Cela signifie que toutes les microcapsules ont été dégradées en une semaine (Fig.27D).



**Figure 27:** Etude de la dégradation *in vivo* des microparticules d'HEA injectées à des souris femelles B6D2F1. Observation du liquide intrapéritonéal après le premier jour d'injection (A), 3 jours après (B), au jour 5 (C) et au jour 7 (D).

## 9. Conclusion et Discussion

L'analyse de la paroi des microcapsules d'HEA par spectroscopie infra-rouge nous a permis de valider la formation de liaisons esters entre les groupements O-H de l'HEA et C=O-Cl de l'agent réticulant.

La préparation peut être divisée en 3 étapes, une première étape d'émulsification, une seconde étape de réticulation qui permet l'obtention des microcapsules et une dernière étape de lavage. Cette dernière étape est très importante puisqu'elle permet l'élimination du chlorure de téréphtaloyl en excès. L'étude de la surface des microcapsules en microscopie électronique à balayage nous a permis d'examiner et d'approuver la qualité de nos lavages. Sachant que, la présence de chlorure de téréphtaloyl à la surface de nos microcapsules pourrait engendrer des problèmes de chargement et surtout de cytotoxicité *in vivo*. Une fois lavées, les microcapsules sont lyophilisées. L'analyse par microscopie optique de la morphologie des microcapsules après réhydratation a mis en évidence une bonne reprise de leur forme sphérique et de la non formation d'agrégats qui pourraient s'avérer gênants pour les injections *in vivo*.

Nous nous sommes ensuite intéressés plus spécifiquement aux caractéristiques compatibles avec l'utilisation de ces microcapsules comme système de libération/présentation de peptides ou de protéines.

Nous avons démontré par microscopie confocale que nos microcapsules ont une structure vésiculaire, ce qui nous permet de les qualifier de microcapsules et non de microsphères. Les microsphères ayant au contraire une structure matricielle, c'est-à-dire pleine. Ainsi des molécules vont pouvoir être chargées dans nos microcapsules.

L'évaluation de la taille de ces dernières conditionne le choix de la voie d'administration. En effet, leur taille étant comprise entre 4 et 15  $\mu\text{m}$  avec une médiane à 8.3  $\mu\text{m}$ , l'injection intraveineuse est à proscrire afin d'éviter tout problème d'embolisation. Les microcapsules de 4  $\mu\text{m}$  et de 15  $\mu\text{m}$  de diamètre ne vont pas être dégradées à la même vitesse, notamment à cause de leur différence d'épaisseur de paroi. Cela peut entraîner une prolongation de la biodisponibilité de la molécule chargée, et ainsi une meilleure stimulation de la réponse immunitaire contre cette dernière. Nous verrons dans la partie suivante que la taille est aussi impliquée dans l'activité adjuvante des microcapsules, particulièrement dans l'internalisation de celles-ci par les CPAs.

Nous avons montré que l'efficacité de chargement des microcapsules pour la SAB est fixe et est de l'ordre de  $17\% \pm 4$ . Au contraire, la capacité de chargement augmente proportionnellement avec les concentrations de SAB dans les solutions de chargement. Ces

deux résultats sont cohérents et renvoient au modèle de chargement mis en oeuvre. En effet, les microcapsules lyophilisées mises en suspension dans une solution de protéine vont agir comme des « éponges ». Ainsi pour un même peptide, protéine ou mélange de protéines, l'efficacité de chargement sera fixe, et la capacité de chargement dépendante de la solution de chargement utilisée.

Ce moyen physique de chargement est un avantage par rapport aux autres techniques de chargement. La plupart entraînant des problèmes de dégradation, de modification du peptide ou de la protéine chargée, mais aussi des problèmes de reproductibilité (Kazzaz *et coll.*, 2000 ; Singh *et coll.*, 2006).

La localisation interne mais aussi à la surface des microcapsules de la SAB chargée va surtout être importante pour la suite de l'étude, cette double localisation étant impliquée dans l'activation de la réponse immunitaire contre la protéine chargée.

Concernant la biodisponibilité, nous pouvons imaginer que 30% de la SAB chargée sont immédiatement disponibles à l'organisme, puisque instantanément relargués par les microcapsules. Les 70% restants n'étant disponibles qu'après dégradation des microcapsules.

Nous avons démontré que les microcapsules d'hydroxyéthylamidon préparées possèdent des propriétés intéressantes suggérant leur utilisation *in vivo* en tant que système de libération/présentation de peptides ou protéines. Une étude plus poussée sur les capacités adjuvantes de celles-ci semble justifiée.

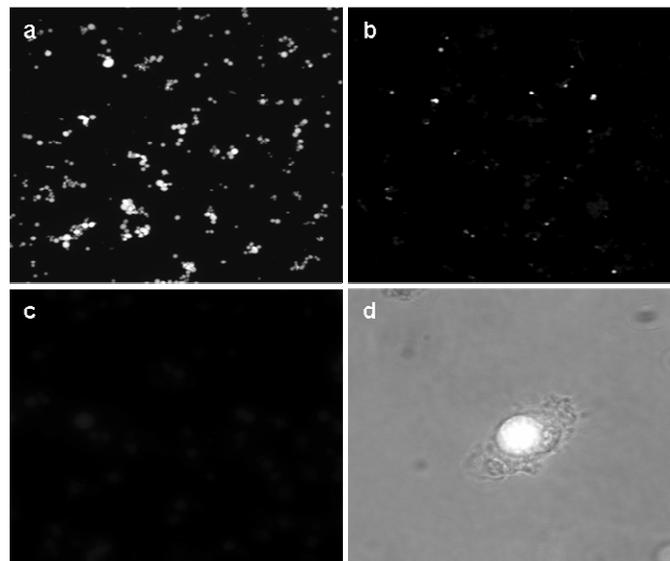
Dans la première partie, nous avons caractérisé et démontré que les microcapsules d'HEA présentent des propriétés compatibles à leur utilisation en tant que système de présentation/libération d'antigène. Ces propriétés sont, entre autre, la biocompatibilité *in vivo* des microcapsules, la stabilité, leur capacité élevée de chargement de la SAB (15 %), leur biodégradabilité *in vivo* et la localisation des protéines chargées (Devy *et coll.*, 2006).

Au cours de cette deuxième partie, nous avons étudié les propriétés adjuvantes des microcapsules d'hydroxyéthyl amidon précédemment caractérisées et ceci en comparaison avec un adjuvant traditionnellement utilisé chez l'homme qui est l'Alum.

L'activité adjuvante des microcapsules a été mise en évidence suite à des injections intrapéritonéales ou sous-cutanées à des souris B6D2F1, de 100 µg de sérum albumine bovine (SAB), 100 µg de SAB combinée à l'Alum (SAB-Alum) ou chargée dans des microcapsules (SAB-microcapsules). Pour cela, la capacité des microcapsules d'HEA à être internalisées par des cellules mononucléées a été étudiée. Les dosages des IgG totales, IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>2a</sub> anti-SAB dans les plasmas des souris immunisées prélevés à intervalles réguliers, l'étude de la prolifération des splénocytes *in vitro* et le dosage de l'IL4 et IFNγ secrétés par les cellules spléniques de ces animaux ont été effectués.

### 1. L'internalisation des microcapsules d'HEA par des cellules mononucléées murines

La capacité des microcapsules d'HEA à être internalisées par des cellules mononucléées a été étudiée. Nous avons utilisé une méthode de « quenching » de la fluorescence extracellulaire par le bleu trypan décrite par Wan C.P *et coll.* en 1993. Ainsi, des microcapsules d'HEA fluorescentes ont été incubées avec des cellules mononucléées récupérées de la cavité intrapéritonéale de souris. Après 4 heures d'incubation, la suspension de microcapsules a été remplacée par une solution de bleu trypan préparée en tampon citrate pH 4,4. L'ajout de cette solution permet le « quenching » de la fluorescence extracellulaire, c'est-à-dire des microcapsules non internalisées dans les cellules mononucléées. De cette façon, sur la Figure 28b, les points fluorescents correspondent à des microcapsules internalisées. Cette expérience montre que les microcapsules d'HEA peuvent être phagocytées par des cellules mononucléées.



**Figure 28 :** Observation au microscope à fluorescence de microcapsules d'HEA marquées à la fluoresceine internalisées dans des cellules mononucléées murines intrapéritonéales.

*a.* Fluorescence émise par les microcapsules fluorescentes avant « quenching » par le bleu trypan ( $\times 20$ ). *b.* Fluorescence émise par les microcapsules fluorescentes après « quenching » par le bleu trypan. Soit la fluorescence émise par les microcapsules internalisées ( $\times 20$ ). *c.* Témoin négatif: Traitement des cellules mononucléées avec de la cytochalasine D (inhibe la phagocytose) avant l'ajout des microcapsules ( $\times 20$ ). *d.* Une microcapsule internalisée dans une cellule mononucléée. Observation en contraste de phase et en microscopie de fluorescence simultanément ( $\times 60$ ).

## 2. L'immunogénicité des microcapsules d'HEA

Cinq milligrammes de microcapsules vides ou chargées avec 100 µg de SAB suspendues dans 200 µl de sérum physiologique ont été injectés par voie intrapéritonéale à deux groupes de 3 souris femelles B6D2F1 et ceci à raison de deux injections espacées de 21 jours. Neuf jours après le rappel, un échantillon de sang de chaque souris a été prélevé. La présence ou non d'IgG anti-microcapsules dans les plasmas des souris immunisées a été déterminée par dosage immuno-enzymatique. Des souris immunisées avec du sérum physiologique ont servi de témoins négatifs.

L'absence d'IgG dirigées contre les microcapsules a été démontrée (Tab. X). Par contre, des IgG dirigées contre les microcapsules chargées avec de la SAB ont été détectées chez les souris immunisées avec de la SAB-microcapsules (Tab. X). Cela traduit non pas la présence d'IgG dirigées contre les microcapsules mais d'IgG dirigées contre la SAB située en périphérie des microcapsules.

**Tableau X:** Récapitulatif des résultats obtenus lors de la recherche d'IgG anti-microcapsules en fonction des plasmas et cibles utilisés

Plasmas de	Cibles	
	Microcapsules vides	Microcapsules chargées avec de la SAB
Souris témoins	-	-
Souris immunisées avec des microcapsules vides	-	-
Souris immunisées avec des microcapsules chargées avec de la SAB	-	+

*+ Présence d'IgG dirigées contre les microcapsules cibles*

*- Absence d'IgG dirigées contre les microcapsules cibles*

## 3. Cinétique de production des IgG totales anti-SAB suite aux différents traitements

Suite aux différents traitements administrés aux souris, la cinétique de production des IgG anti-SAB a été étudiée. Pour cela, des souris ont été immunisées par voie *i.p.* ou *s.c.* avec 100 µg de SAB, 100 µg des SAB/Alum ou 100 µg de SAB-microcapsules. Une primo-injection suivie d'un rappel au bout de 21 jours ont été effectués, le sang des souris

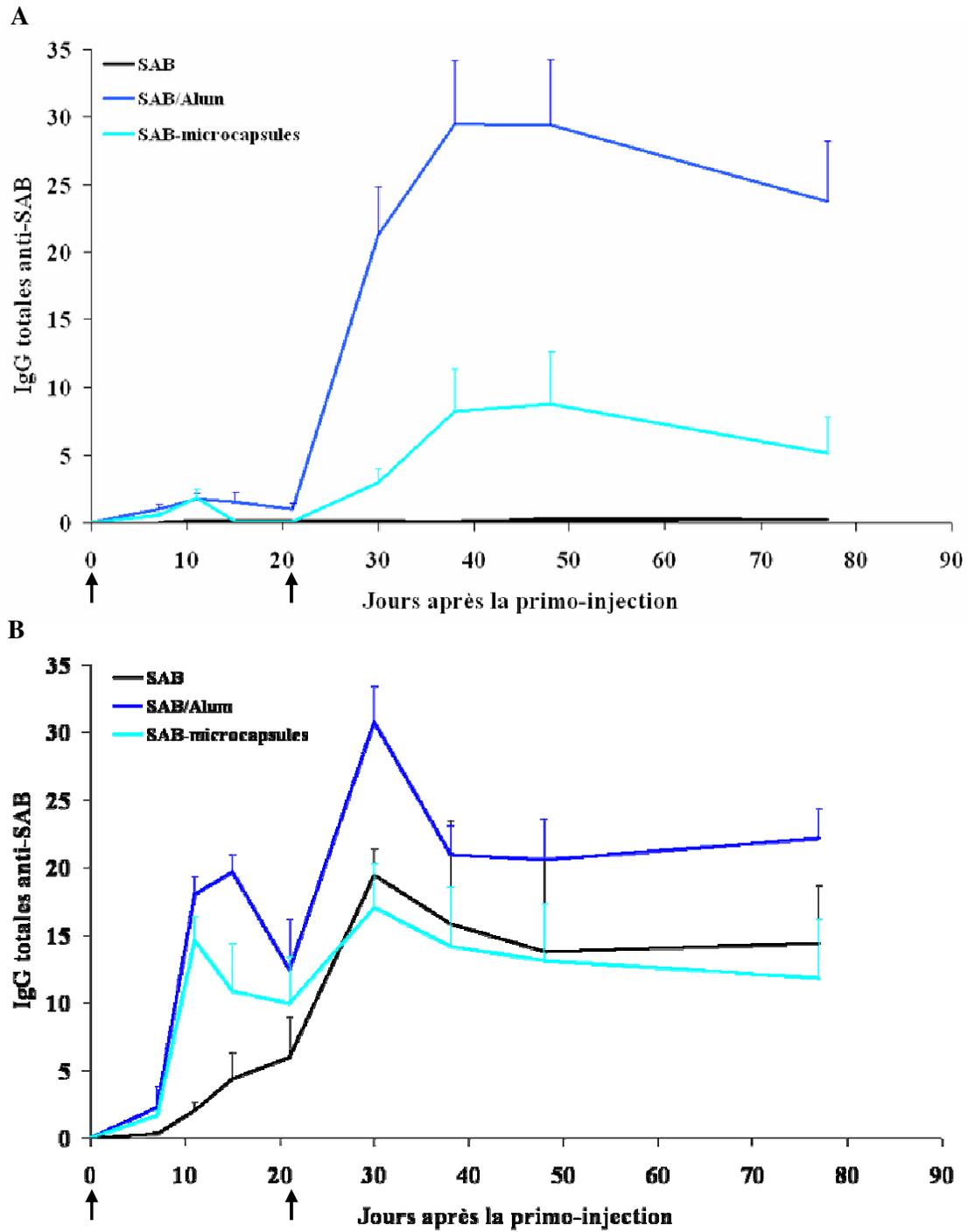
immunisées a été prélevé à intervalle régulier et les titres en IgG anti-SAB ont été déterminés par la technique ELISA.

Injectées par voie *i.p.*, les 3 formulations vaccinales n'induisent pas (ou peu) d'IgG anti-SAB suite à la primo-injection. A noter qu'après le rappel, les formulations vaccinales à base d'adjuvant (SAB/Alum et SAB-microcapsules) ont permis la mise en place d'une immunité mémoire se traduisant par une réponse secondaire précoce et forte. La formulation à base d'Alum est la plus efficace, et ceci malgré une importante potentialisation de la production d'IgG anti-SAB grâce au chargement de cette dernière dans des microcapsules d'HEA. La SAB seule injectée par voie *i.p.* ne permet pas la production d'IgG anti-SAB. Ainsi, les adjuvants permettent de diminuer la quantité d'antigènes à injecter pour obtenir une réponse immunitaire humorale (Fig. 29A).

Injectées par voie *s.c.*, les 3 formulations permettent la production d'IgG anti-SAB suite à la primo-injection. Cependant, les formulations à base d'adjuvant sont plus efficaces que la SAB seule. En effet, avec la SAB/Alum et la SAB-microcapsules, la réponse primaire est plus précoce, rapide et forte qu'avec la SAB seule. Après le rappel, 3 réponses secondaires importantes ont été obtenues, sans différence significative entre les 3 réponses (Fig. 29B).

En général, la voie *s.c.* est plus efficace que la voie *i.p.*, avec surtout une réponse primaire plus importante, et les formulations à base d'adjuvant se sont avérées plus efficaces que l'injection de SAB seule.

Nous en déduisons que les microcapsules ont permis de rendre immunogène les 100 µg de SAB injectés par voie *i.p.*, et d'accroître la réponse primaire dirigée contre la SAB inoculée par voie *s.c.*



**Figure 29 :** Cinétiques des titres en IgG totales suite à l’immunisation des souris avec 100 µg de SAB (—), 100 µg de SAB combinée à de l’Alum (—) ou 100 µg de SAB chargée dans des microcapsules (—) par voie *i.p.* (A) ou *s.c.* (B). Les flèches indiquent les immunisations (jours 1 et 21).

Les résultats sont exprimés en moyennes des titres  $\pm$  SEM ( $n=3$ ).

#### 4. Caractérisation isotypique des IgG anti-SAB produites

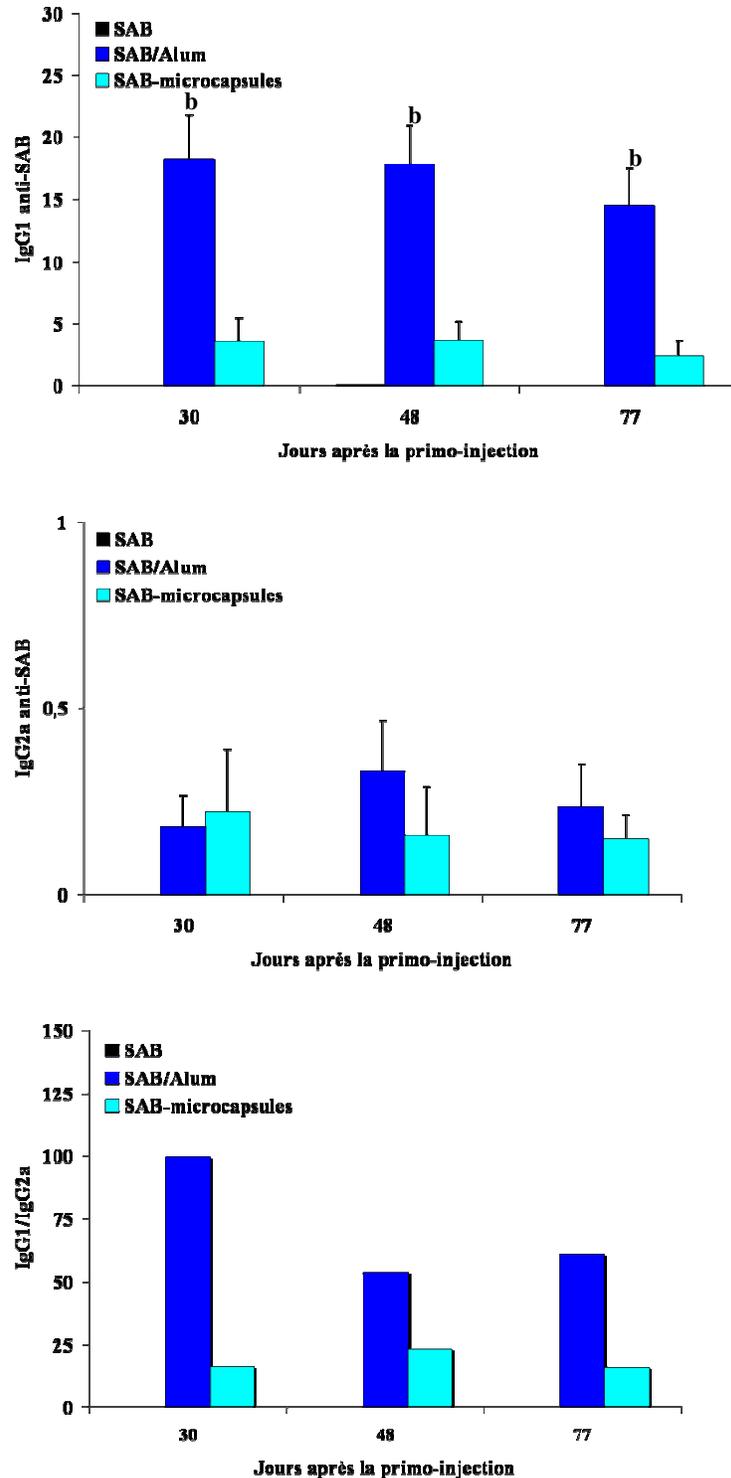
Afin de nous renseigner sur le type de réponse activée ( $Th_1$  ou/et  $Th_2$ ) par les différentes formulations vaccinales, la caractérisation isotypique, par test ELISA, des IgG anti-SAB produites suite au rappel a été étudiée.

Injectées par voie *i.p.*, la formulation à base d'Alum entraîne une production importante d'IgG1 anti-SAB (Fig. 30). Des IgG2a ont été produites en très faible proportion, mais sans différence significative entre les deux formulations (SAB/Alum et SAB-microcapsules) (Fig. 30). Ainsi, le ratio IgG1 sur IgG2a anti-SAB est plus élevé chez les souris immunisées avec la SAB combinée à de l'Alum (Fig. 30).

En conclusion, la production d'IgG1 étant associée à l'activation de la voie  $Th_2$ , cela semble indiquer que l'Alum active plus efficacement la voie  $Th_2$  que les microcapsules. Par contre, la production d'IgG2a étant associée à l'activation de la voie  $Th_1$ , cela semble indiquer que les deux adjuvants activent de façon identique, mais faiblement, la voie  $Th_1$ . Cependant, la réponse secondaire en IgG totales moins importante pour le lot SAB-microcapsules que pour le lot SAB/Alum, laisse présumer une meilleure activation de la voie  $Th_1$  grâce aux microcapsules.

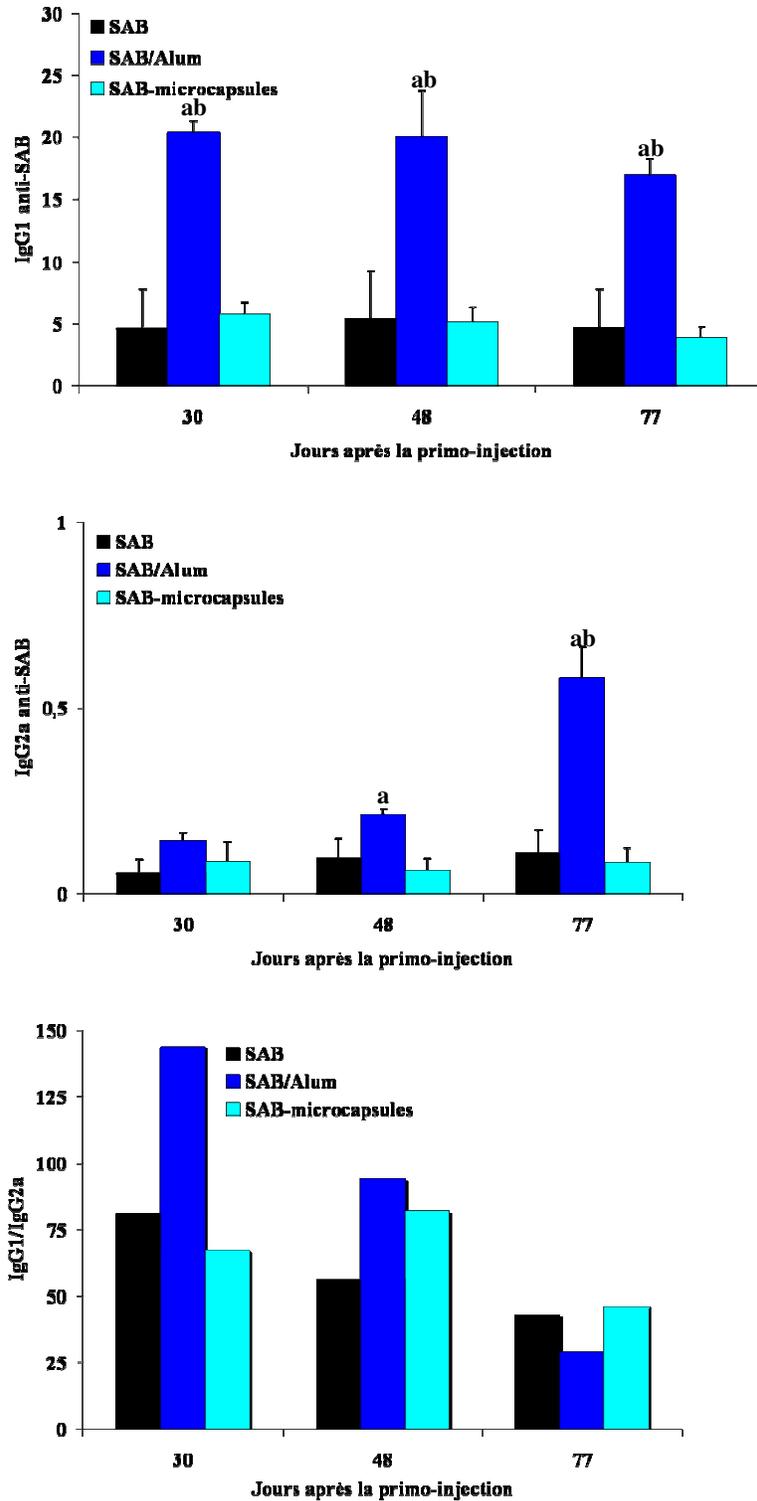
Injectées par voie *s.c.*, la SAB microencapsulée n'a aucun effet sur la réponse en IgG1 et IgG2a en comparaison avec la SAB seule (Fig.31). Au contraire, la formulation SAB/Alum induit une augmentation de la production d'IgG1 anti-SAB, mais aussi d'IgG2a anti-SAB entre les jours 30 et 77 après la primo-injection. Cette augmentation des IgG2a, pour le lot SAB/Alum, va de paire avec une diminution des IgG1. Ainsi, le ratio en IgG1 sur IgG2a anti-SAB est plus élevé pour ce lot SAB/Alum au jour 30, mais, les 3 ratios ont tendance à s'équilibrer au cours du temps.

En conclusion, nous retrouvons une activation plus efficace de la voie  $Th_2$  avec l'Alum, mais aussi une meilleure activation de la voie  $Th_1$ . Injectées par voie *s.c.*, les microcapsules ne semblent pas modifier l'immunogénicité de la SAB, en tout cas en ce qui concerne la réponse secondaire.



**Figure 30 :** Titres en IgG1 et IgG2a chez les souris immunisées par voie *i.p.* avec 100 µg de SAB, 100 µg de SAB/Alum ou 100 µg de SAB-microcapsules

Les résultats sont exprimés en moyennes des titres  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). **a** :  $P<0.05$  entre le lot SAB et SAB/Alum. **b** :  $P<0.05$  entre le lot SAB/Alum et SAB-microcapsules.



**Figure 31 :** Titres en IgG1 et IgG2a chez les souris immunisées par voie *s.c.* avec 100 µg de SAB, 100 µg de SAB/Alum ou 100 µg de SAB-microcapsules

Les résultats sont exprimés en moyennes des titres  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). **a** :  $P<0.05$  entre le lot SAB et SAB/Alum. **b** :  $P<0.05$  entre le lot SAB/Alum et SAB-microcapsules.

### 5. Sécrétions *in vitro* d'IL4 et d'IFN $\gamma$ par les splénocytes des animaux traités

Afin de nous renseigner sur le type de réponse activée (Th<sub>1</sub> ou/et Th<sub>2</sub>) par les différents types de formulation vaccinales, cinq semaines après le rappel, les splénocytes des animaux immunisés ont été isolés et cultivés en présence de SAB. Après 60 h, les surnageants de co-cultures ont été prélevés et les dosages, par test ELISA, de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-4 contenus dans ces surnageants ont été réalisés.

Chez les souris immunisées par voie *i.p.* avec de la SAB ou de la SAB/Alum, seule de l'IL-4 a été dosée, et les taux sont inférieurs à ceux dosés chez les souris immunisées avec la SAB-microcapsules (Tab.XI). Un taux important d'IFN- $\gamma$  a été évalué chez ces dernières.

Injectée par voie *s.c.* la formulation à base de SAB-microcapsules est plus efficace que les deux autres dans l'induction d'une sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules spléniques des souris traitées (Tab.XI).

**Tableau XI:** Taux d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  secrétés par les splénocytes des souris immunisées avec 100  $\mu$ g de SAB, 100  $\mu$ g de SAB/Alum ou 100  $\mu$ g de SAB-microcapsules par voie *i.p.* ou *s.c.*

Cytokines (pg/ml)				
	i.p.		s.c.	
Lots	IL-4	IFN- $\gamma$	IL-4	IFN- $\gamma$
<b>SAB</b>	27 $\pm$ 13	Ø	55 $\pm$ 22	47 $\pm$ 26
<b>SAB/Alum</b>	35 $\pm$ 5	Ø	101 $\pm$ 43	150 $\pm$ 65
<b>SAB-microcapsules</b>	77 $\pm$ 15 <sup>ab</sup>	333 $\pm$ 115 <sup>ab</sup>	67 $\pm$ 16	172 $\pm$ 56 <sup>a</sup>

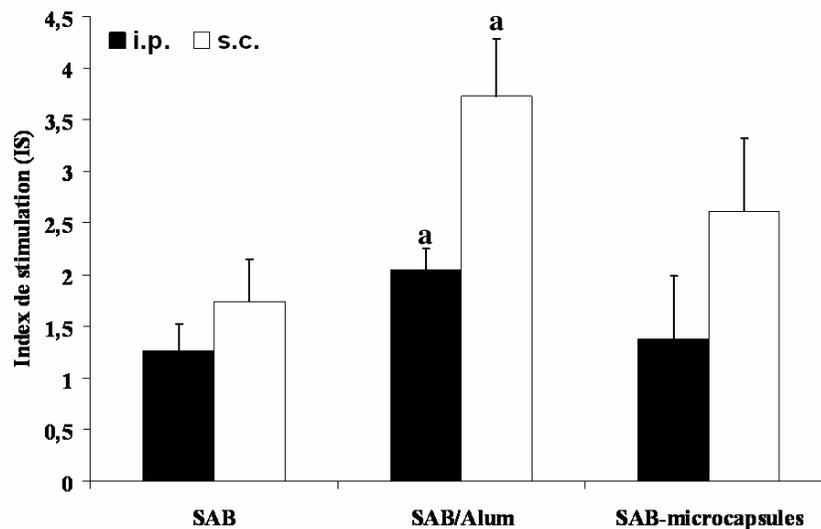
Les résultats sont exprimés en moyennes des concentrations  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). **a** :  $P<0.05$  entre le lot SAB et SAB-microcapsules. **b** :  $P<0.05$  entre le lot SAB/Alum et SAB-microcapsules. Ø : pas détecté.

En conclusion, la sécrétion d'IL-4 étant associée à l'activation de la voie Th<sub>2</sub>, et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  à la voie Th<sub>1</sub>, les microcapsules semblent activer plus efficacement les voies Th<sub>2</sub> et Th<sub>1</sub> par voie *i.p.*, et la voie Th<sub>1</sub> par voie *s.c.*

## 6. Etude de la prolifération des splénocytes *in vitro*

Cinq semaines après le rappel, les splénocytes des animaux immunisés ont été isolés et cultivés en présence de SAB. Après 60 h de co-culture, la prolifération des splénocytes *in vitro* a été étudiée.

Seule une prolifération plus importante des splénocytes spécifiques de la SAB a été observée chez les souris immunisées avec la SAB/Alum, et ceci quelle que soit la voie d'administration (*i.p.* ou *s.c.*) (Fig.32). En effet, même si une légère augmentation de la prolifération des splénocytes peut être observée chez les souris immunisées avec la SAB-microcapsules par voie *s.c.* par rapport aux souris immunisées avec de la SAB seule, cette différence n'est pas significative (Fig.32).



**Figure 32 :** La prolifération des splénocytes spécifiques de la SAB chez les souris immunisées avec 100 µg de SAB, 100 µg de SAB/Alum ou 100 µg de SAB-microcapsules par voie *i.p.* ou *s.c.*.

Les résultats sont exprimés en moyennes des IS  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). **a** :  $P < 0.05$  entre le lot SAB et SAB/Alum.

## 7. Conclusions et Discussion

Ces dernières années, nous pouvons constater une augmentation de l'intérêt pour les adjuvants peptidiques et protéiques (Sinha *et coll.*, 2003 ; Degim *et coll.*, 2007). Selon le type de réponse immunitaire souhaitée (Th<sub>1</sub> ou Th<sub>2</sub>), les vaccins à base de peptides ou de protéines doivent être formulés sous une forme vaccinale appropriée, avec le bon adjuvant, et administrés par une voie adéquate.

Dans cette deuxième partie, les microcapsules d'HEA précédemment caractérisées ont été testées comme système de libération/présentation de protéines pour induire une immunité contre la SAB. Cette immunité devra être supérieure à celle de la SAB injectée seule.

Dans un premier temps, nous avons démontré que les microcapsules d'HEA ont une taille permettant leur internalisation par des cellules mononucléées. Cette internalisation des microcapsules chargées en antigènes par les CPA, suivie de leur migration jusqu'aux organes lymphoïdes, sont indispensables à la présentation des antigènes aux lymphocytes T (Banchereau *et coll.*, 1998 ; Thiele *et coll.*, 2002). De plus, Audran *et al* (Audran *et coll.*, 2003) ont rapporté que des microsphères biodégradables de taille compatible avec leur phagocytose, permettent de prolonger la présentation *in vitro* des peptides aux CPA. Ceci prédit une meilleure stimulation du système immunitaire, notamment des lymphocytes T, grâce à nos microcapsules.

Nous avons démontré que les microcapsules d'HEA injectées seules n'induisent pas de réponse immunitaire. En effet, certains adjuvants classés dans la catégorie des immunostimulants, tels que les adjuvants à base de toxines bactériennes ou de constituants bactériens, induisent une réponse immunitaire indépendante de l'antigène additionné (Plant *et coll.*, 2004). Contrairement à ceux ci, l'immunité obtenue suite à l'injection des microcapsules chargées avec un antigène est strictement dirigée contre ce dernier.

D'un point de vue concret, une réponse IgG anti-SAB durable a été obtenue chez les souris immunisées par voie *i.p.* et *s.c.* avec les microcapsules chargées avec la SAB. Cette réponse est plus importante que la réponse induite par l'injection de SAB seule, surtout par voie *i.p.* Par voie *s.c.*, seule la réponse primaire est plus forte et précoce. En effet, nous avons précédemment montré que la SAB chargée dans les microcapsules d'HEA était localisée à l'intérieur, mais aussi en surface (Devy *et coll.*, 2006). La présentation de l'antigène en surface est importante pour l'activation des lymphocytes B. Cette organisation externe permet un

bon contact entre les antigènes et les récepteurs des lymphocytes B, constituant ainsi un signal d'activation optimal (Bachmann *et coll.*, 1993 ; Fehr *et coll.*, 1998).

Les différences obtenues suggèrent que la voie d'administration intervient dans la réponse anticorps. Les DC, qualifiées de CPA « professionnelles » sont les chefs d'orchestres de l'établissement de la réponse immunitaire. Selon la voie d'immunisation utilisée, les DC activées seront qualitativement et quantitativement différentes (Gutierrez *et coll.*, 2002). Néanmoins, les microcapsules d'HEA sont moins efficaces que l'Alum qui est un adjuvant reconnu pour engendrer une puissante réponse humorale (Petrovsky *et coll.*, 2004).

Les adjuvants sont sélectionnés en fonction du type de réponse qu'ils induisent, à savoir une réponse de type Th<sub>1</sub> ou Th<sub>2</sub>. La réponse Th<sub>1</sub> est pilotée par les cellules T CD4 de type 1 et se caractérise par la production d'IL-2, d'IFN- $\gamma$ , et par une augmentation de la production d'IgG2a, IgG2b et IgG3. Ce type de réponse intervient dans la production et le maintien des CTL. La réponse Th<sub>2</sub>, pilotée par les cellules T CD4 de type 2, se caractérise par la production d'IL-4, d'IL-5, d'IL-10, et par une augmentation de la production des IgG1 et IgA. La réponse Th<sub>1</sub> intervient dans l'immunité dirigée contre les agents infectieux intracellulaires, tels que les virus, les bactéries, les protozoaires, et contre les cellules cancéreuses. L'immunité Th<sub>2</sub> est efficace contre la plupart des bactéries et les infections virales (Cox *et coll.*, 1997). Les sels d'aluminium, seuls adjuvants autorisés à être utilisés chez l'homme, stimulent principalement l'immunité de type Th<sub>2</sub>, mais cette immunité est peu efficace contre les pathogènes intracellulaires et les cellules malignes (Sokolovska *et coll.*, 2007).

Les injections *i.p.* de SAB-microcapsules et de SAB/Alum ont induits la production d'IgG1 et d'IgG2a anti-SAB. SAB/Alum induit une production d'IgG totales plus importante que les microcapsules qui se traduit par plus d'IgG1 mais autant d'IgG2a. Cela sous-entend que les deux adjuvants activent les réponses Th<sub>1</sub> et Th<sub>2</sub>, mais que l'Alum permet une meilleure activation de la réponse Th<sub>2</sub>, et les microcapsules de la Th<sub>1</sub>. Il faut souligner qu'un taux accru d'IgG1 est associé à la production d'IgE. Les IgE sont impliquées dans les phénomènes d'inflammation et notamment dans les chocs anaphylactiques (Relyveld *et coll.*, 1998 ; Erazo *et coll.*, 2007). Ainsi, un taux excessif d'IgG1 n'est pas sans conséquences. De plus, des granulomes intrapéritonéaux ont été trouvés après immunisation *i.p.* des souris avec la SAB/Alum. D'autres études rapportent l'apparition de granulomes post-vaccinaux chez des animaux ou même des enfants immunisés avec un vaccin à base de sels d'aluminium (Bordet *et coll.*, 2001 ; Valtulini *et coll.*, 2005).

Par voie *s.c.*, les 3 formulations activent les réponses Th<sub>1</sub> et Th<sub>2</sub>. Aucune différence de production d'IgG1 et d'IgG2a n'a été mise en évidence après les injections *s.c.* de SAB seule et de SAB-microcapsules. Cela est en concordance avec les dosages d'IgG totales suite au rappel. Ainsi, l'utilisation des microcapsules ne modifie pas la réponse secondaire anti-SAB. Par contre, nous avons vu précédemment qu'elle a permis de modifier la réponse primaire. La caractérisation isotypique des IgG produites lors de cette réponse primaire aurait, dans ce cas, été plus instructive. L'utilisation d'Alum a entraîné, tout comme pour la voie *i.p.*, une production accrue d'IgG1, et cela pour une réponse secondaire en IgG totales à peine plus importante que celle des deux autres formulations. Au cours du temps, nous avons remarqué une légère inversion de l'activation des voies Th<sub>1</sub> et Th<sub>2</sub> par l'Alum, avec une diminution de la production d'IgG1 au profit des IgG2a, soit une diminution de l'activation de la réponse Th<sub>2</sub> et une augmentation de Th<sub>1</sub>. La faible différence de réponse secondaire en IgG totales entre les 3 formulations, et le taux d'IgG1, 3 à 4 fois supérieur pour SAB/Alum que pour SAB et SAB-microcapsules, laissent sous-entendre la production d'autres types d'IgG par ces deux dernières formulations. En effet, nous pouvons émettre l'hypothèse que les injections de SAB et de SAB-microcapsules pourraient entraîner une production d'IgG2b et/ou d'IgG3 qui eux aussi caractérisent une réponse de type Th<sub>1</sub>.

En règle générale, lorsqu'il y a une réponse humorale, les voies Th<sub>1</sub> et Th<sub>2</sub> sont activées simultanément mais en proportions différentes. Quelle que soit la voie d'administration utilisée, l'Alum active plus efficacement la voie Th<sub>2</sub> que les deux autres formulations, ce qui est à l'origine de sa toxicité. Même si l'utilisation des microcapsules permet de potentialiser la réponse humorale dirigée contre la SAB, seule une faible activation de la réponse Th<sub>1</sub> a été mise en évidence par la caractérisation isotypique des IgG totales anti-SAB produites lors de la réponse secondaire.

Nous avons voulu confirmer cela avec l'étude des sécrétions d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 par les splénocytes récupérés chez les animaux immunisés et cultivés *in vitro* en présence de SAB. Les injections *i.p.* de SAB-microcapsules induisent une augmentation de la sécrétion, par les cellules spléniques, de cytokines de la voie Th<sub>1</sub> (d'IFN- $\gamma$ ) et Th<sub>2</sub> (IL-4). Il est intéressant de remarquer que, même si les injections *i.p.* de SAB/Alum engendrent une réponse humorale anti-SAB importante, sous-entendant une activation de la réponse Th<sub>2</sub> et donc une sécrétion accrue des cytokines associées à celle-ci, en réalité, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation de sécrétion d'IL-4. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui démontre que la réponse Th<sub>2</sub> initiée par l'Alum est indépendante de la cytokine IL-4 (Brewer *et coll.*, 1996 ; Brewer *et coll.*, 1999).

Seule une augmentation de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  a été mise en évidence suite aux injections *s.c.* de SAB-microcapsules.

Cela signifie que, par voie *i.p.*, l'utilisation des microcapsules a permis de stimuler plus efficacement les voies Th<sub>1</sub> et Th<sub>2</sub>, et que par voie *s.c.*, de stimuler plus efficacement la voie Th<sub>1</sub>.

Pour ce qui est de la prolifération des cellules spléniques, elle n'est pas sensiblement différente entre les lots SAB et SAB-microcapsules. Par conséquent, la re-stimulation *in vitro* avec de la SAB des cellules spléniques des animaux immunisés avec de la SAB-microcapsules semble entraîner plutôt une activation, qu'une prolifération de ces dernières. Contrairement aux animaux immunisés avec la SAB/Alum où une prolifération importante des cellules spléniques a été mise en évidence.

En conclusion de tous ces résultats, nous avons montré que les microcapsules d'HEA sont capables de potentialiser la réponse immunitaire contre un antigène, la SAB. Elles permettent l'induction d'une réponse mixte Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>. Ce type de réponse mixte a déjà été mis en évidence pour d'autres adjuvants (Carcaboso *et coll.*, 2004 ; Petrovsky, 2006 ; Khajuria *et coll.*, 2007 ;). Ceci est un atout pour se défendre contre des cibles redoutables tels que les agents pathogènes intracellulaires et les cellules cancéreuses. De plus, les microcapsules d'HEA sont faciles à préparer et à utiliser, c'est pourquoi, nous avons voulu tester ces microcapsules dans une stratégie de vaccination anti-cancéreuse et plus précisément anti-mélanome.

Le mélanome est le cancer cutané le plus agressif et il présente un haut potentiel invasif et métastatique. Sa fréquence est en pleine expansion et il représente la première cause de mortalité par cancer cutané.

A l'heure actuelle, la chirurgie reste le premier traitement du mélanome. L'épaisseur du mélanome au moment de la prise en charge est l'un des facteurs déterminants pour la réussite du traitement. En effet, la chirurgie permet de guérir la quasi-totalité des malades si le diagnostic est fait très tôt et si la tumeur est superficielle. Malheureusement, dans les cas où la chirurgie est impossible, les possibilités thérapeutiques deviennent limitées. Les résultats décevants de la chimiothérapie classique ont amené à multiplier les voies de recherche thérapeutique de ce type de tumeur.

Les progrès considérables de ces dernières années dans les domaines de l'immunologie, de la biologie moléculaire et de la description de marqueurs tumoraux (protéines, peptides...), ont permis le développement récent de stratégies vaccinales anti-tumorales spécifiques dans divers types de cancers, et en particulier dans le mélanome. Les cellules tumorales portent à leur surface des antigènes qui peuvent être reconnus par le système immunitaire, et notamment les lymphocytes T CD8 capables de détruire les cellules tumorales. Les recherches actuelles tentent de déterminer s'il est possible, par une vaccination des patients contre les antigènes portés par leur tumeur, de déclencher une régression tumorale. Plusieurs approches ont été explorées, certaines sont basées sur l'administration directe de cellules tumorales irradiées ou lysées (Sondak *et coll.*, 2003 ; Hsueh *et coll.*, 2003) (ex : la Melacine® dans le traitement du mélanome) ou encore de cellules tumorales autologues modifiées génétiquement afin de produire des cytokines ou des molécules co-stimulatrices. D'autres stratégies plus spécifiques utilisent des cellules dendritiques ou des cellules tumorales transfectées pour produire un AAT, ou encore des DC chargées *ex vivo* avec un ou des AAT (Banchereau *et coll.*, 2005). Toutefois, les procédés d'obtention de ces vaccins sont lourds et présentent des risques en terme de qualité du produit vaccinal. Une alternative est l'administration directe des AAT sous une forme vaccinale appropriée.

Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés à l'utilisation d'extraits protéiques pour lutter contre le mélanome. En effet, un travail précédemment réalisé au sein de notre laboratoire (Odot *et coll.*, 2004) a montré qu'un traitement préventif *in vivo* par injection de protéines solubles extraites de mélanocytes tumoraux murins résistants à la Doxorubicine (cellules B16R) permettait de développer une réponse immunitaire humorale spécifique et un léger retard dans le développement tumoral. Dans le but d'améliorer cette immunité anti-mélanome chez la souris, nous avons testé les microcapsules d'HEA dans une

stratégie d'immunothérapie anti-mélanome par injection de protéines solubles extraites de cellules B16R (protéines B16R) chargées dans ces microcapsules. Cette méthode devrait permettre d'améliorer la présentation des protéines aux CPA et ainsi augmenter leur immunogénicité.

Dans un premier temps, les caractéristiques de chargement des microcapsules d'HEA pour les protéines B16R ont été étudiées, ainsi que la cytotoxicité *in vitro* des microcapsules contre les cellules B16R constitutives des tumeurs *in vivo*.

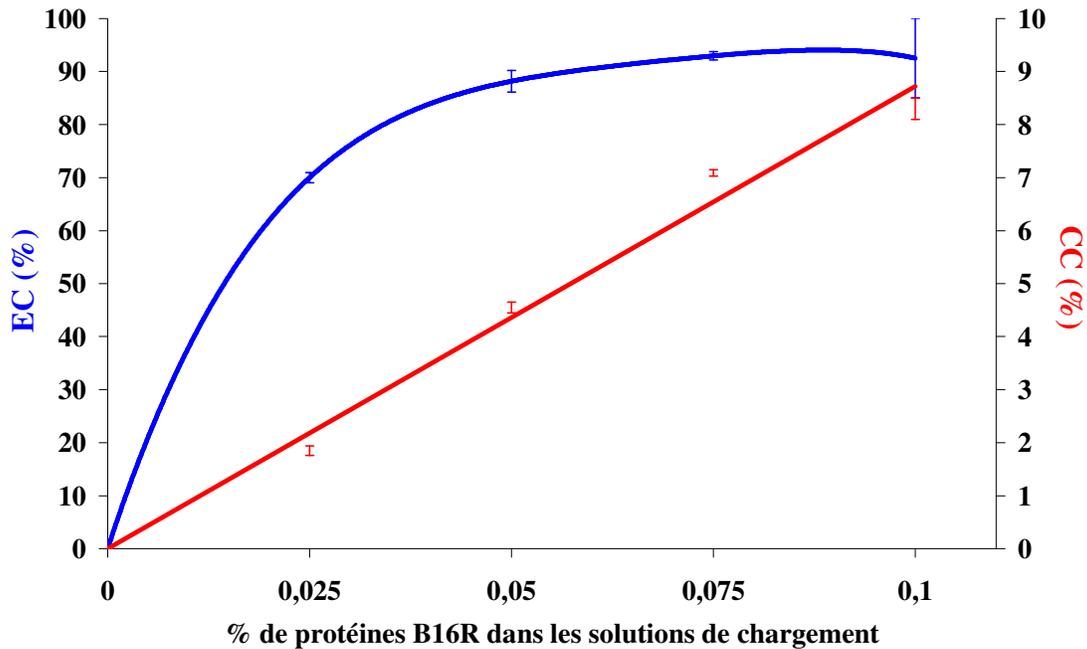
Dans un deuxième temps, les effets de différents traitements prophylactiques (200 µg de protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA), administrés par voie *i.p.* ou *s.c.* sur la progression tumorale ont été étudiés.

Les mécanismes immunitaires pouvant être impliqués dans le ralentissement de progression tumorale observés suite aux traitements prophylactiques administrés par voie *s.c.* seront précisés et l'efficacité de ces différents traitements dans un modèle curatif sera évaluée.

### 1. Détermination de la capacité et de l'efficacité de chargement des microcapsules d'HEA pour les protéines solubles totales extraites des cellules B16R

Les microcapsules ont été chargées par incubation de 5 mg de microcapsules lyophilisées dans 500 µl de solutions de protéines solubles mélaniques B16R comprises entre 0.025 et 0.1% (masse/volume).

Après 3 h d'incubation, les capacités et les efficacités de chargement ont été déterminées. La Figure 33 montre que à partir de la solution de chargement de concentration 0.05%, l'efficacité de chargement (EC) atteint sa valeur maximale qui est de 88 % ± 2 % (n=3). La capacité de chargement augmente proportionnellement avec les concentrations de protéines solubles mélaniques dans les solutions de chargement.



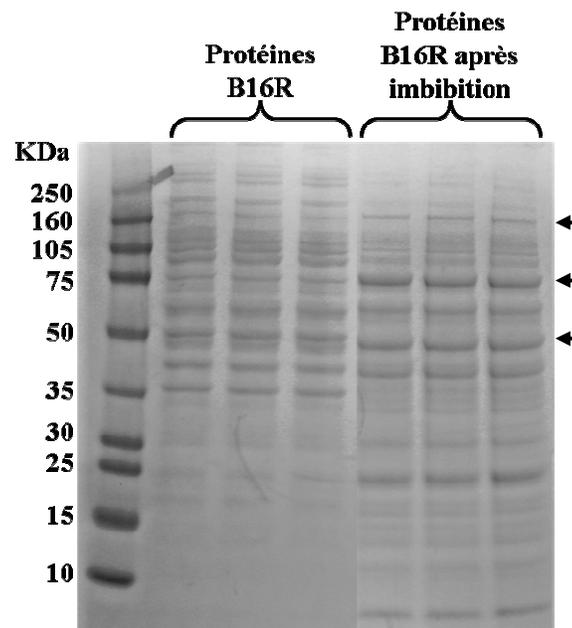
**Figure 33 :** Capacité (CC) et Efficacité (EC) de chargement des microcapsules d'HEA pour les protéines solubles totales extraites des cellules B16R.

*Le chargement des protéines extraites de cellules B16R dans les microcapsules est obtenu par incubation de 5 mg de microcapsules d'HEA lyophilisées dans 500 µl de solution de protéines B16R à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en moyennes des EC et des CC ± SEM (n=4).*

En plus de l'analyse quantitative du chargement des protéines solubles totales B16R dans les microcapsules d'HEA, nous avons étudié ce chargement d'un point de vue qualitatif. Pour cela, nous avons analysé le profil électrophorétique des protéines solubles totales B16R avant et après chargement dans les microcapsules d'HEA (Fig. 34). Ce profil nous renseigne

sur le poids moléculaire des protéines B16R non chargées. Nous pouvons remarquer que les protéines de haut poids moléculaire sont plus efficacement chargées que les protéines de faible poids moléculaire. En effet, chaque piste est le résultat de l'électrophorèse de 20 µg de protéines B16R avant ou après imbibition. Dans ces 20 µg de protéines B16R avant chargement, les protéines de faible poids moléculaire (de moins de 35 KDa) sont peu visibles donc en faible proportion. A l'inverse, les protéines présentes après chargement sont majoritairement les protéines de poids moléculaire inférieur à 35 KDa. Nous pouvons de la même façon mettre en évidence la non imbibition de certaines protéines telles que celles à 160, 75 et 50 KDa (identifiées par des flèches sur la figure 34).

En conclusion, toutes les protéines solubles B16R ne sont pas chargées avec la même efficacité.



**Figures 34 :** Profil électrophorétique des protéines solubles totales B16R avant et après chargement dans les microcapsules d'HEA.

*Chaque piste correspond à 20 µg de protéines solubles totales B16R avant ou après chargement dans les microcapsules d'HEA. Une précipitation des protéines à l'acétone a préalablement été réalisée. Chaque piste correspond à des échantillons indépendants.*

**2. Etude *in vitro* de la cytotoxicité des microcapsules d'HEA vis à vis des cellules de mélanome B16R**

La cytotoxicité des microcapsules d'HEA a été testée sur les cellules de mélanome B16R cultivées en monocouches et en sphéroïdes.

Les résultats du Tableau XII montrent que les concentrations de microcapsules comprises entre 0,1 et 1 mg/ml ne possèdent pas de propriétés cytotoxiques significatives contre cette lignée cellulaire. En effet, le taux maximum d'inhibition de croissance est de 8%.

**Tableau XII** : Estimation de l'inhibition de croissance des cellules B16R cultivées en monocouche ou en sphéroïde en présence de microcapsules d'HEA (mg/ml) pendant 72 h.

Microcapsules (mg/ml)	% d'inhibition de croissance					
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,8	1
Monocouche	0, 5 ± 1	1 ± 1	3 ± 1	5 ± 1	7 ± 1	8 ± 1
Sphéroïde	0	0	3 ± 1	5 ± 1	6 ± 1	7 ± 1

*Ces résultats correspondent à la moyenne et la déviation standard de 9 expériences.*

En conclusion, les microcapsules d'HEA n'ont pas d'effet cytotoxique direct sur les cellules B16R contre lesquelles nous voulons lutter.

### **3. Etude des traitements prophylactiques à bases de protéines solubles B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA**

#### **3. 1. Etude du développement tumoral suite aux traitements à base de protéines solubles B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA**

##### **3. 1. 1. Etude du développement tumoral suite aux traitements prophylactiques administrés par voie intrapéritonéale**

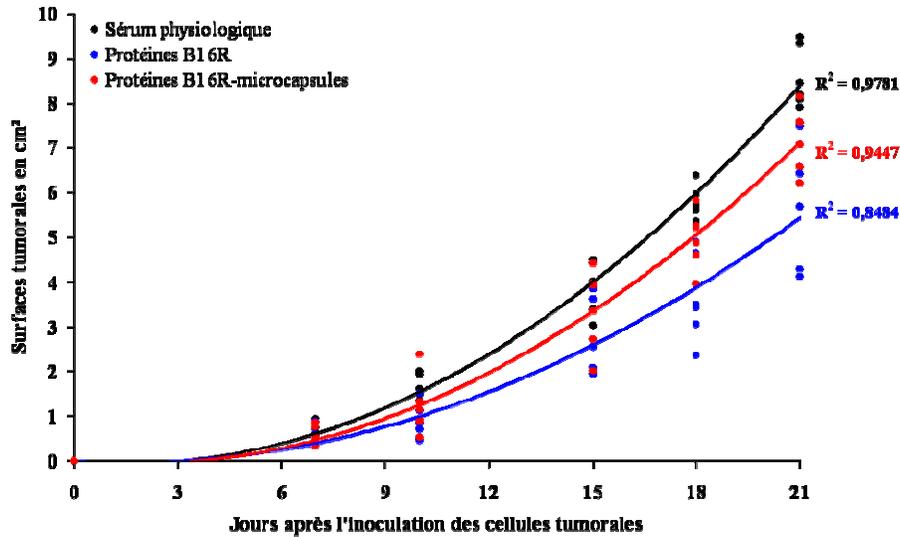
Après le prétraitement des souris et l'inoculation des tumeurs ( $1.10^6$  cellules B16R viables en *s.c.*), nous avons suivi le développement tumoral. Jusqu'au quatrième jour après l'inoculation des cellules tumorales, rien n'est détectable. Entre le quatrième et le septième jour, une masse palpable noire apparaît. Nous pouvons commencer à estimer le diamètre apparent de la tumeur, qui augmente de façon exponentielle avec le temps, et suivre son développement.

Ainsi, les effets des différents traitements prophylactiques (injection de protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA) sur le développement tumoral a été évalué en comparaison avec le développement tumoral chez des souris témoins ayant reçues des injections de sérum physiologique.

La Figure 35 montre que la progression tumorale moyenne est ralentie chez les souris prétraitées avec des protéines B16R et des protéines B16R-microcapsules. Mais, le prétraitement à base de protéines B16R est plus efficace que celui à base de protéines B16R-microcapsules.

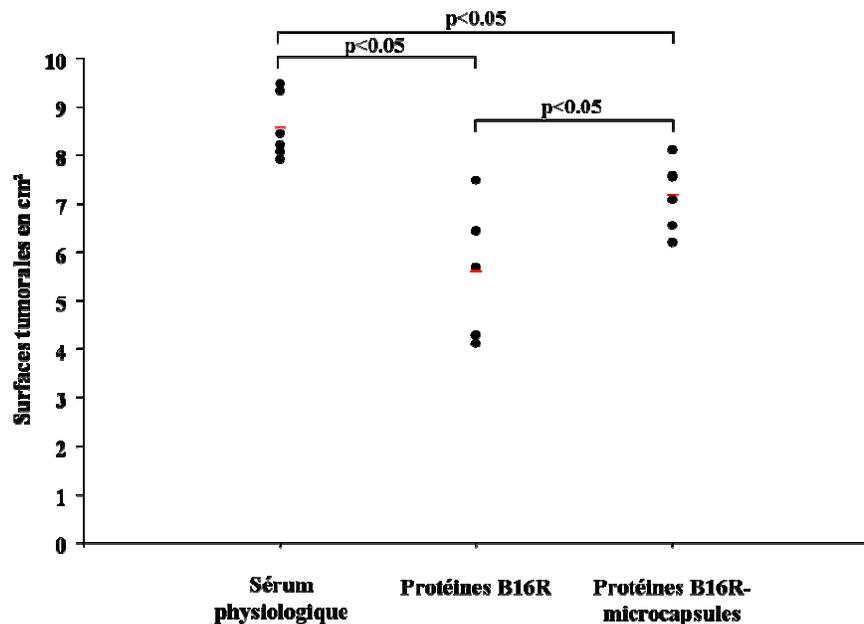
Les surfaces tumorales 21 jours après l'inoculation des tumeurs (Fig. 36) confirment les différences de progressions tumorales significatives entre les lots de souris. Aucun retard d'apparition n'a été observé et 100% des souris ont développé une tumeur.

En conclusion, le traitement prophylactique à base de protéines B16R seules administrées par voie *i.p.* est plus efficace, en terme de ralentissement de progression tumorale, que le traitement à base de protéines B16R chargées dans les microcapsules d'HEA.



**Figure 35 :** Développement tumoral après inoculation de  $1.10^6$  cellules B16R viables en *s.c.* chez les souris B6D2F1 prétraitées avec des protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA administrées par voie *i.p.*.

Chaque point représente la surface tumorale d'une souris au jour considéré, et la courbe (régression polynomiale) montre le développement tumoral moyen pour chaque lot de souris. Dans cette expérience  $n = 6$  souris. L'homogénéité du développement tumoral au sein d'un lot de souris est donnée par le coefficient de détermination  $R^2$  de la courbe. Plus le  $R^2$  est proche de 1 et plus le développement est homogène.



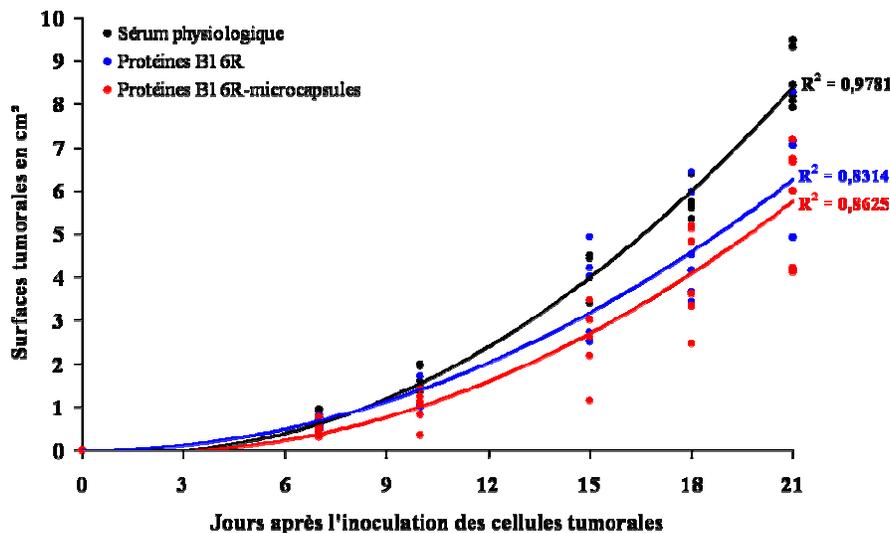
**Figure 36 :** Surfaces tumorales 21 jours après inoculation de  $1.10^6$  cellules B16R viables en *s.c.* chez les souris B6D2F1 prétraitées avec des protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA administrées par voie *i.p.*.

Chaque point représente la surface tumorale d'une souris au jour 21. (—) représente la surface tumorale moyenne de chaque lot. Dans cette expérience  $n = 6$  souris.

### 3. 1. 2. Etude du développement tumoral suite aux traitements prophylactiques administrés par voie sous-cutanée

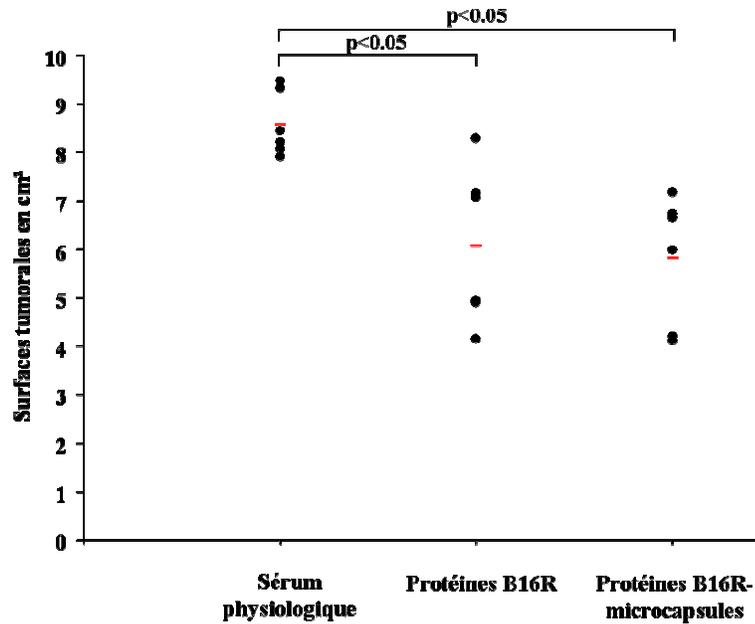
De même, les effets des prétraitements prophylactiques administrés en *s.c.* sur le développement tumoral ont été évalués en comparaison avec le développement tumoral chez des souris témoins ayant reçues comme prétraitement des injections de sérum physiologique. La Figure 37 montre que la progression tumorale moyenne est ralentie chez les souris prétraitées avec des protéines B16R et des protéines B16R-microcapsules. Mais, aucune différence de progression tumorale n'a été mise en évidence entre ces deux lots de souris. Les surfaces tumorales 21 jours après l'inoculation des tumeurs (Fig. 38) confirment les différences significatives de progressions tumorales entre les lots de souris. Aucun retard d'apparition n'a été observé et 100% des souris ont développé une tumeur.

En conclusion, les traitements prophylactiques à base de protéines B16R seules et de protéines B16R chargées dans des microcapsules d'HEA administrées par voie *s.c.* ont le même effet sur le ralentissement de la progression tumorale.



**Figure 37 :** Développement tumoral après inoculation de  $1.10^6$  cellules B16R viables en *s.c.* chez les souris B6D2F1 prétraitées avec des protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA administrées par voie *s.c.*.

Chaque point représente la surface tumorale d'une souris au jour considéré, et la courbe (régression polynomiale) montre le développement tumoral moyen pour chaque lot de souris. Dans cette expérience  $n = 6$  souris. L'homogénéité du développement tumoral au sein d'un lot de souris est donnée par le coefficient de détermination  $R^2$  de la courbe. Plus le  $R^2$  est proche de 1 et plus le développement est homogène.



**Figure 38 :** Surfaces tumorales 21 jours après inoculation de  $1.10^6$  cellules B16R viables en *s.c.* chez les souris B6D2F1 prétraitées avec des protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA administrées par voie *s.c.*.

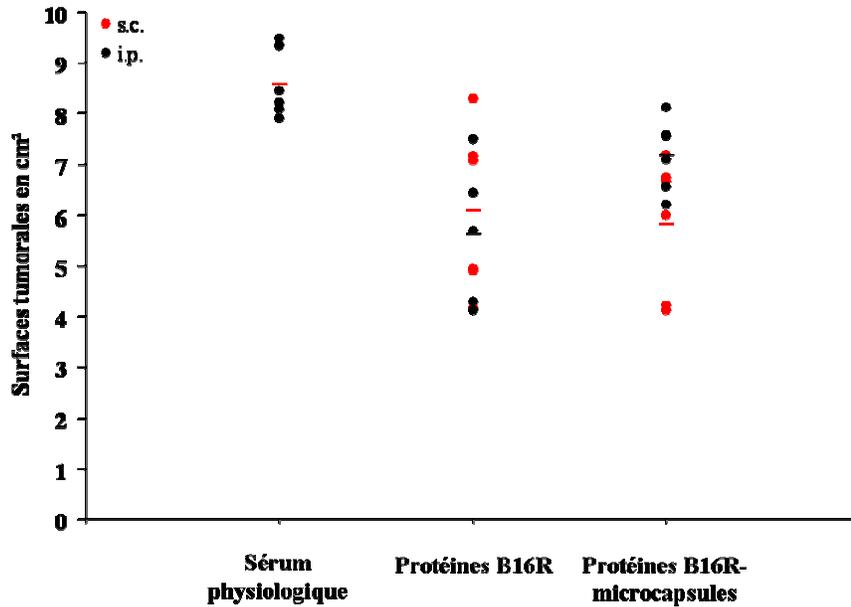
Chaque point représente la surface tumorale d'une souris au jour 21. (—) représente la surface tumorale moyenne de chaque lot. Dans cette expérience  $n = 6$  souris.

### 3. 1. 3. Comparaison des deux voies d'administrations utilisées

Nous avons dans un premier temps comparé pour une même voie d'administration, l'incidence du prétraitement sur la progression tumorale. Dans un deuxième temps, nous allons comparer pour un même prétraitement l'incidence de la voie d'administration sur la progression tumorale.

La Figure 39 montre que pour les lots de souris prétraitées avec des protéines B16R, quelle que soit la voie d'administration utilisée (*i.p.* ou *s.c.*), la moyenne des surface tumorales à J21 est la même. Par contre, pour les lots prétraités avec des protéines B16R chargées dans les microcapsules d'HEA, la voie d'administration *s.c.* entraîne un ralentissement plus important de la progression tumorale que la voie *i.p.*. En effet, comme le montre la Figure 39, la moyenne des surface tumorales à J21 est inférieure pour la voie *s.c.* ( $p < 0,05$ ).

Pour le prétraitement à base de protéines B16R chargées dans les microcapsules d'HEA, la voie d'administration *s.c.* est plus efficace que la voie *i.p.* en terme de ralentissement de la progression tumorale.



**Figure 39 :** Comparaison des surfaces tumorales 21 jours après l'inoculation des  $1.10^6$  cellules B16R viables en *s.c.* chez les souris B6D2F1 prétraitées par voie *i.p.* et *s.c.*.

Chaque point représente la surface tumorale d'une souris au jour 21. (—) représente la surface tumorale moyenne de chaque lot prétraité par voie *i.p.*, (—) représente la surface tumorale moyenne de chaque lot prétraité par voie *s.c.*. Dans cette expérience  $n = 6$  souris.

Compte tenu des résultats précédemment obtenus et de la non utilisation en vaccination de la voie d'administration *i.p.*, nous nous sommes intéressés pour la suite de l'étude sur la voie d'administration *s.c.*.

### 3. 2. Etude des mécanismes immunitaires impliqués dans les ralentissements de la progression tumorale observés suite aux traitements prophylactiques administrés par voie *s.c.*

Nous avons recherché une possible corrélation entre les ralentissements de progression tumorale observés et une stimulation des réponses immunitaires à médiation humorale et/ou cellulaire chez nos animaux prétraités.

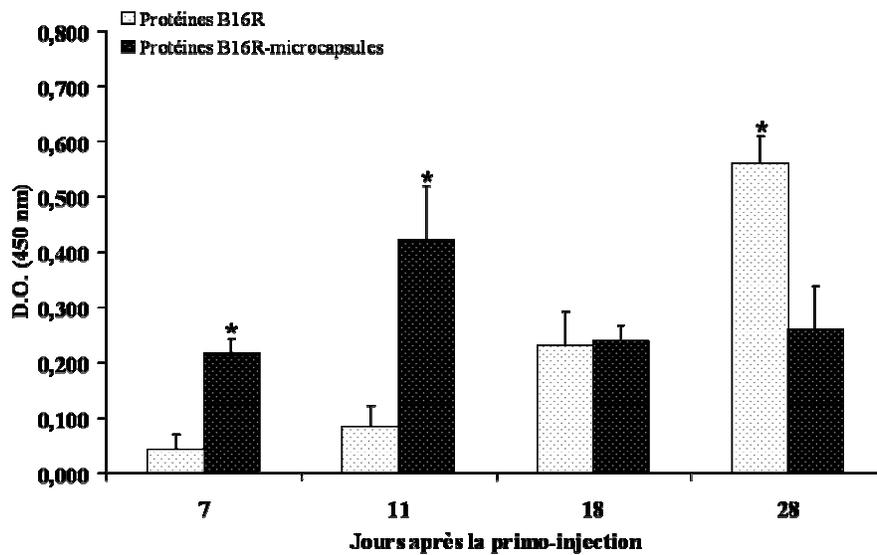
#### 3. 2. 1. La cinétique de production des IgG totales anti-cellules B16R

Dans un premier temps, la stimulation de la réponse immunitaire à médiation humorale a été testée.

Suite aux différents traitements administrés en *s.c.* aux souris, la cinétique de production des IgG anti-cellules B16R a été étudiée. Les souris ont été immunisées avec 200

µg de protéines B16R ou 200 µg de protéines B16R chargées dans des microcapsules d'HEA. Une primo-injection suivie de 3 rappels espacés de 7 jours ont été effectués, le sang des souris a été prélevé à intervalles réguliers tout au long de la période d'immunisation, et les IgG anti-cellules B16R ont été dosés par la technique ELISA.

La Figure 40 montre que la production d'IgG anti-cellules B16R est plus rapide pour la formulation à base de protéines B16R-microcapsules. En effet, 7 jours après la primo-injection, un taux plus important d'IgG est détecté chez les animaux immunisés avec des protéines B16R-microcapsules, mais ce taux atteint rapidement un seuil maximal qui sera rattrapé chez les souris immunisées avec protéines B16R seules. La production d'IgG anti-cellules B16R chez ces dernières est progressive et augmente proportionnellement avec le temps. Sept jours après le dernier rappel (J28), un taux deux fois plus important d'IgG anti-cellules B16R est dosé chez les animaux immunisés avec des protéines B16R seules.



**Figure 40 :** Comparaison des cinétiques de production des IgG totales anti-cellules B16R chez les animaux immunisés avec des protéines B16R et des protéines B16R chargées dans des microcapsules d'HEA.

Les résultats sont exprimés en moyenne des D.O. ± SEM (n=4). Les résultats de p sont donnés en comparaison des deux lots de souris immunisées. \* p<0,05.

### **3. 2. 2. Recherche des molécules de Classe I à la surface des cellules B16R**

Avant d'étudier la stimulation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire, nous avons recherché la présence des molécules de Classe I à la surface des cellules B16R. En effet, ces molécules interviennent dans la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules du système immunitaires, et notamment par les lymphocytes T CD8. En l'absence de ces molécules, les cellules CD8 effectrices sont incapables de détruire spécifiquement les cellules tumorales cibles.

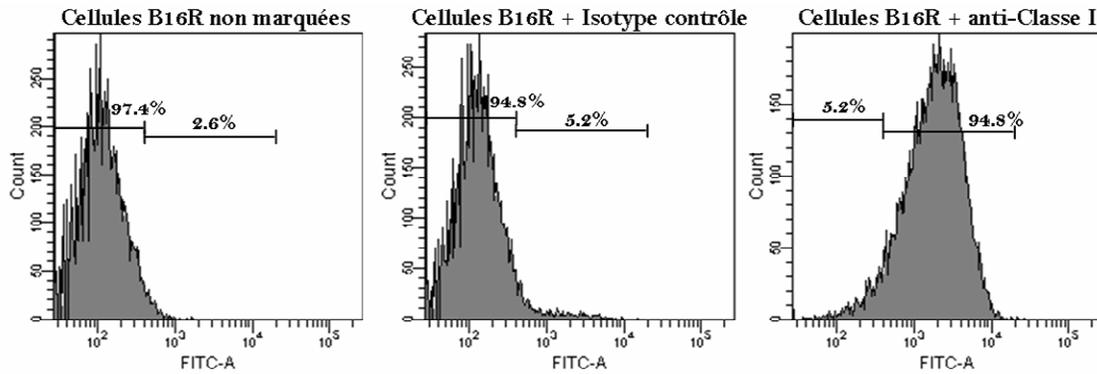
Nous avons analysé l'expression des molécules de Classe I à la surface des cellules B16R cultivées *in vitro*. L'analyse par cytométrie en flux démontre la non expression de ces molécules à la surface des cellules B16R cultivées *in vitro*.

Nous nous sommes intéressés, à l'expression des molécules de Classe I à la surface de cellules B16R récupérées *in vivo*. En effet, certaines molécules présentes dans l'environnement cellulaire *in vivo* pourraient intervenir dans la stimulation de l'expression des molécules du CMH par les cellules tumorales.

Pour cela,  $1.10^6$  cellules B16R viables en suspension dans 100  $\mu$ l de sérum physiologique ont été injectées *s.c.* à des souris B6D2F1. Les tumeurs *in vivo* obtenues ont été prélevées à différents temps (4, 15 et 21 jours après l'inoculation des cellules), dissociées et les cellules tumorales obtenues analysées au cytomètre de flux. Tout comme pour les cellules B16R cultivées *in vitro*, aucune molécule de Classe I n'a été mise en évidence à la surface des cellules B16R récupérées *in vivo*.

Suite à ces résultats, nous avons mis en présence les cellules B16R cultivées *in vitro* avec de l'IFN- $\gamma$ . L'IFN- $\gamma$  est une molécule capable de stimuler l'expression des molécules du CMH, et notamment les Classes I. L'analyse par cytométrie en flux des cellules tumorales stimulées démontre la présence de molécules de Classe I à leur surface (Fig. 41).

En conclusion, les cellules B16R *in vitro* et *in vivo* n'expriment pas de molécule de Classe I, mais sont capables grâce à un stimulus approprié d'en exprimer.



**Figure 41 :** Recherche de molécules de Classe I à la surface des cellules B16R incubées avec de l'IFN- $\gamma$ .

Les cellules sont analysées par cytométrie en flux. Les cellules sont non marquées, marquées avec l'isotype contrôle (IgG2a de souris) couplé au FITC, ou l'anticorps anti-Classe I (H-Kb) fait chez la souris et couplé au FITC. L'acquisition est faite avec le FACS Calibur (Becton Dickinson) et les résultats sont analysés avec le logiciel CellQuest 3.3.

### 3. 2. 3. Etude de la cytotoxicité des cellules spléniques vis-à-vis des cellules B16R

La stimulation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire a été étudiée après traitement des souris avec du sérum physiologique (témoins), 200  $\mu$ g de protéines B16R ou 200  $\mu$ g de protéines B16R chargées dans des microcapsules d'HEA. Une primo-injection suivie de 3 rappels espacés de 7 jours ont été effectués. Une semaine après le dernier rappel les rates des animaux ont été prélevées, dilacérées, et les activités cytolytiques de ces cellules spléniques vis-à-vis des cellules B16R ont été évaluées.

Compte tenu de la faible proportion de cellules effectrices actives spécifiques des cellules B16R dans les cellules spléniques isolées de l'animal, des co-cultures *in vitro* de ces cellules spléniques avec des cellules cibles ont été effectuées. L'activation et l'expansion des cellules effectrices actives grâce à cette rééducation, nous permet d'apprécier leur activité cytolytique. Cette activité cytolytique est évaluée en mesurant l'activité enzymatique de la LDH dans les surnageants de culture des cellules spléniques préalablement rééduquées avec des cellules B16R cibles cultivées en monocouche.

L'absence de molécule de Classe I à la surface des cellules B16R, nous incite à tester deux types de rééducation :

- Rééducation sur des cellules B16R « normales » cultivées *in vitro*.
- Rééducation sur des cellules B16R préalablement stimulées avec de l'IFN- $\gamma$ , c'est-à-dire sur des cellules B16R exprimant des molécules de Classe I à leur surface. Ceci dans le but de discuter de l'utilité de ces molécules.

De même, deux types de cellules cibles (cellules B16R « normales » et cellules B16R exprimant des molécules de Classe I) ont été choisies.

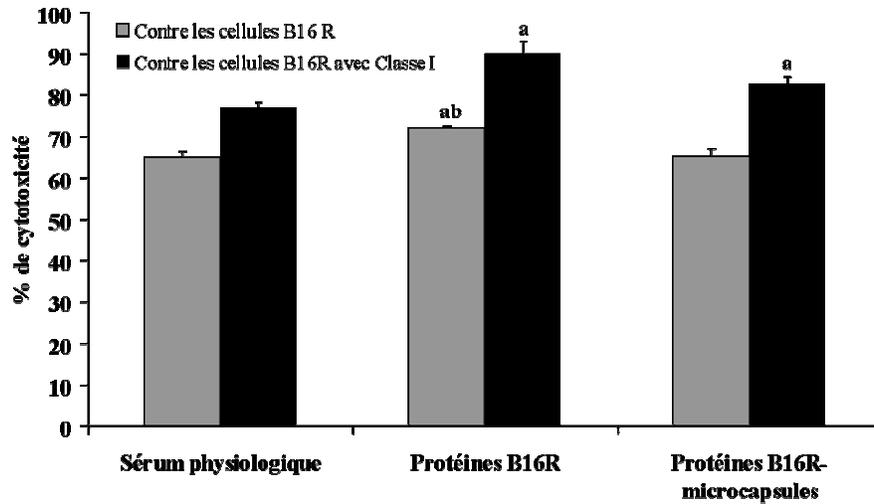
**3. 2. 3. 1. Cytotoxicité des cellules effectrices obtenues après rééducation sur cellules B16R « normales »**

Comme le montre la Figure 42, après rééducation sur cellules B16R « normales », la cytotoxicité des cellules spléniques contre des cellules B16R « normales » est plus importante pour le lot de souris prétraitées avec des protéines B16R seules que pour les deux autres lots.

Pour les 3 lots de souris, la cytotoxicité contre les cellules B16R exprimant des molécules de Classe I est supérieure à celle contre les cellules B16R « normales » ( $p < 0,05$ ). Cette cytotoxicité est plus importante pour les lots traités avec des protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA que pour le lot de souris témoins, et est la même pour les 2 lots.

En conclusion, l'activité cytolytique des cellules spléniques rééduquées sur des cellules B16R « normales » est supérieure lorsque les cellules cibles sont des cellules B16R exprimant des molécules de Classe I, et ceci quel que soit le lot de souris considéré. Seulement, cette cytotoxicité est améliorée par les traitements à base des protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA.

Lorsque les cellules cibles sont des cellules B16R « normales », seule une légère amélioration de l'activité cytolytique des cellules spléniques rééduquées sur des cellules B16R « normales » est mise en évidence dans le lot de souris prétraitées avec des protéines B16R seules.



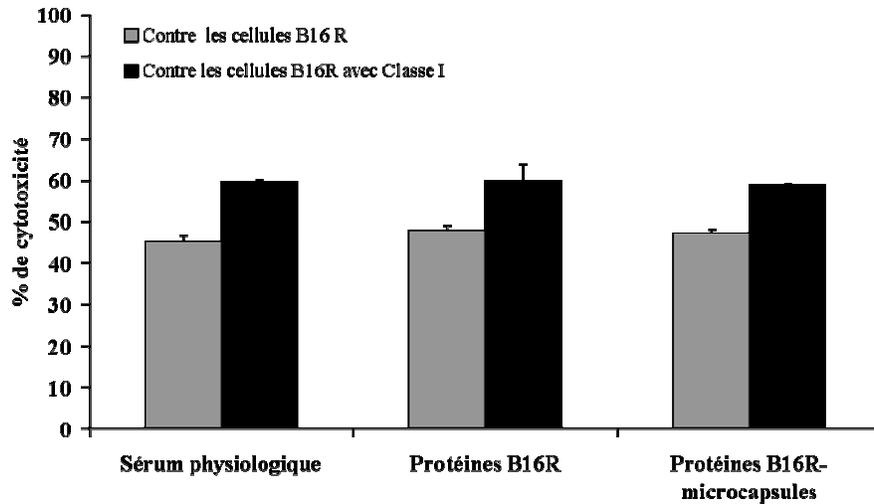
**Figure 42 :** Activité cytolytique des splénocytes des souris prétraitées rééduquées sur cellules B16R « normales » contre des cellules B16R « normales » ou exprimant des molécules de Classe I.

Les splénocytes des souris prétraitées sont récupérés une semaine après le dernier rappel et mis en rééducation avec des cellules B16R « normales » traitées à la mitomycine. Après 156 h de rééducation, les splénocytes sont récupérés, purifiés et mis en co-culture avec des cellules B16R « normales » ou exprimant des molécules de Classe I cultivées en monocouche. Leur cytotoxicité est estimée en mesurant l'activité de la LDH dans les surnageants de co-culture. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité cytolytique et correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM ( $n=4$ ). Les valeurs de  $p$  sont données (**a**) en comparaison avec le lot de souris témoins prétraité avec du sérum physiologique (**b**) en comparaison avec le second lot prétraité avec des protéines B16R (protéines B16R ou protéines B16R-microcapsules).

### 3. 2. 3. 2. Cytotoxicité des cellules effectrices obtenues après rééducation sur cellules B16R exprimant des molécules de Classe I

Comme le montre la Figure 43, après rééducation sur des cellules B16R exprimant des molécules de Classe I, la cytotoxicité des cellules spléniques contre des cellules B16R « normales » est identique pour les 3 lots de souris. Il en est de même pour la cytotoxicité contre des cellules B16R exprimant des molécules de Classe I. Mais, cette cytotoxicité est supérieure à celle obtenue contre des cellules B16R « normales » ( $p < 0,05$ ).

En conclusion, l'activité cytolytique des cellules spléniques rééduquées sur des cellules B16R exprimant des molécules de Classe I est meilleure lorsque les cellules cibles sont des cellules B16R exprimant aussi ces molécules, et ceci quel que soit le lot de souris considéré. Seulement, cette cytotoxicité n'est pas améliorée par les prétraitements à base de protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA.



**Figure 43 :** Activité cytolytique des splénocytes des souris prétraitées rééduqués sur cellules B16R exprimant des molécules de Classe I contre des cellules B16R « normales » ou exprimant ces mêmes molécules.

Les splénocytes des souris prétraitées sont récupérés une semaine après le dernier rappel et mis en rééducation avec des cellules B16R exprimant des molécules de Classe I traitées à la mitomycine. Après 156 h de rééducation, les splénocytes sont récupérés, purifiés et mis en co-culture avec des cellules B16R « normales » ou exprimant des molécules de Classe I cultivées en monocouche. Leur cytotoxicité est estimée en mesurant l'activité de la LDH dans les surnageants de co-culture. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité cytolytique et correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM ( $n=4$ ). Les valeurs de  $p$  sont données (a) en comparaison avec le lot de souris témoins prétraité avec du sérum physiologique (b) en comparaison avec le second lot prétraité avec des protéines B16R (protéines B16R ou protéines B16R-microcapsules).

### 3. 2. 4. Etude quantitative des cellules effectrices obtenues

Nous avons cherché à corréler les activités cytolytiques obtenues aux cellules potentiellement capables de les engendrer, c'est-à-dire aux cellules CD8 et NK. Pour cela, les nombres de cellules CD8 et NK dans les suspensions de cellules spléniques avant et après rééducation ont été analysés par cytométrie de flux.

#### 3. 2. 4. 1. Etude quantitative des cellules CD8

Avant rééducation, les 20 millions de cellules spléniques récupérées chez les souris des 3 lots d'animaux (sérum physiologique, protéines B16R et protéines B16R-microcapsules) contiennent un nombre équivalent de cellules CD8 (Fig. 44).

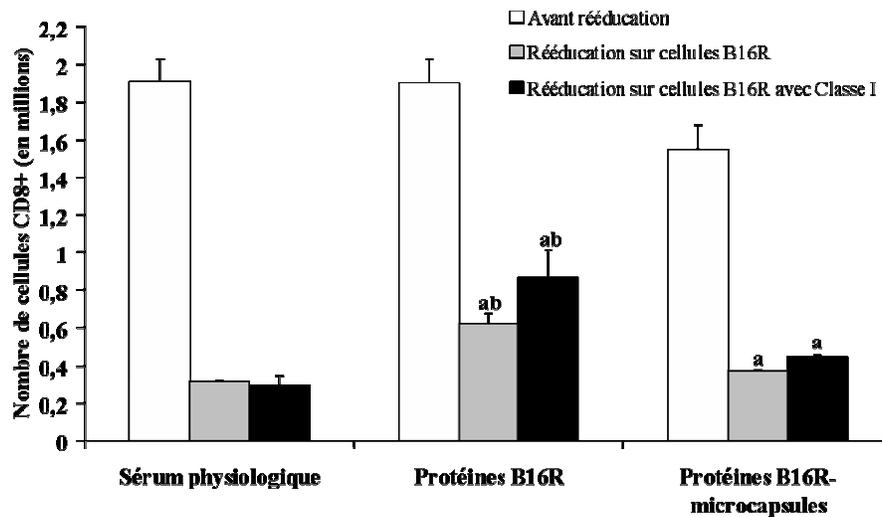
Après rééducation, nous avons une diminution importante du nombre de cellules CD8 au sein des 3 lots (Fig. 44).

Après rééducation sur cellules B16R « normales », comparé au lot témoin, un nombre plus important de cellules CD8 est mis en évidence chez les 2 lots de souris prétraitées avec des protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA. Le lot de souris prétraitées

avec des protéines B16R seules possède encore plus de cellules CD8 que le lot prétraité avec des protéines B16R chargées dans des microcapsules.

La rééducation sur cellules B16R avec des molécules de Classe I entraîne le même type de réponse.

La comparaison des deux types de rééducation met en évidence, pour les 2 lots de souris prétraitées avec des protéines B16R, un nombre légèrement plus important de cellules CD8 après rééducation sur cellules B16R avec des molécules de Classe I ( $p < 0,05$ ).



**Figure 44 :** Nombre de cellules CD8<sup>+</sup> dans les cellules spléniques récupérées chez les animaux prétraités.

Les splénocytes des souris prétraitées sont récupérés une semaine après le dernier rappel et 20 millions de cellules sont mises en co-culture avec des cellules B16R « normales » ou exprimant des molécules de Classe I. Avant et après rééducation, le nombre de cellules CD8<sup>+</sup> est analysé par cytométrie de flux. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules CD8<sup>+</sup> et correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). Les valeurs de  $p$  sont données (a) en comparaison avec le lot de souris témoins prétraités avec du sérum physiologique (b) en comparaison avec le second lot prétraité avec des protéines B16R (protéines B16R ou protéines B16R-microcapsules).

### 3. 2. 4. 2. Etude quantitative des cellules NK 1.1<sup>+</sup>

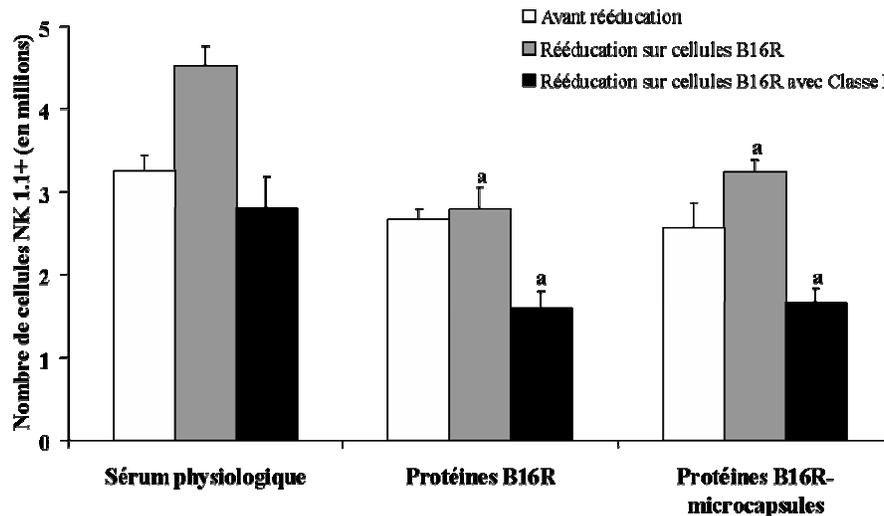
Avant rééducation, les 20 millions de cellules spléniques récupérées contiennent un nombre élevé de cellules NK, et ce nombre est équivalent pour les 3 lots d'animaux (sérum physiologique, protéines B16R et protéines B16R-microcapsules) (Fig. 45).

Après rééducation sur cellules B16R « normales », nous avons une augmentation du nombre de cellules NK au sein des 3 lots (Fig. 45). Cette augmentation est plus importante pour le lot de souris témoins (sérum physiologique), tandis que le nombre de cellules NK est

identique pour les 2 lots de souris prétraitées (protéines B16R et protéines B16R-microcapsules).

Après rééducation sur cellules B16R avec des molécules de Classe I, nous avons, contrairement à la rééducation sur cellules B16R « normales », une diminution du nombre de NK. Cette diminution est beaucoup moins importante pour le lot de souris témoins que pour les lots de souris prétraitées

Mais, quel que soit le type de rééducation, nous avons toujours au final un nombre de NK plus élevé dans le lot témoin que dans les lots prétraités, et un nombre équivalent de NK dans les 2 lots de souris prétraitées.



**Figure 45 :** Nombre de cellules NK 1.1<sup>+</sup> dans les cellules spléniques récupérées chez les animaux prétraités.

Les splénocytes des souris prétraitées sont récupérés une semaine après le dernier rappel et 20 millions de cellules sont mises en co-culture avec des cellules B16R « normales » ou exprimant des molécules de Classe I. Avant et après rééducation, le nombre de cellules NK 1.1<sup>+</sup> est analysé par cytométrie de flux. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules NK 1.1<sup>+</sup> et correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). Les valeurs de  $p$  sont données (a) en comparaison avec le lot de souris témoins prétraités avec du sérum physiologique (b) en comparaison avec le second lot prétraité avec des protéines B16R (protéines B16R ou protéines B16R-microcapsules).

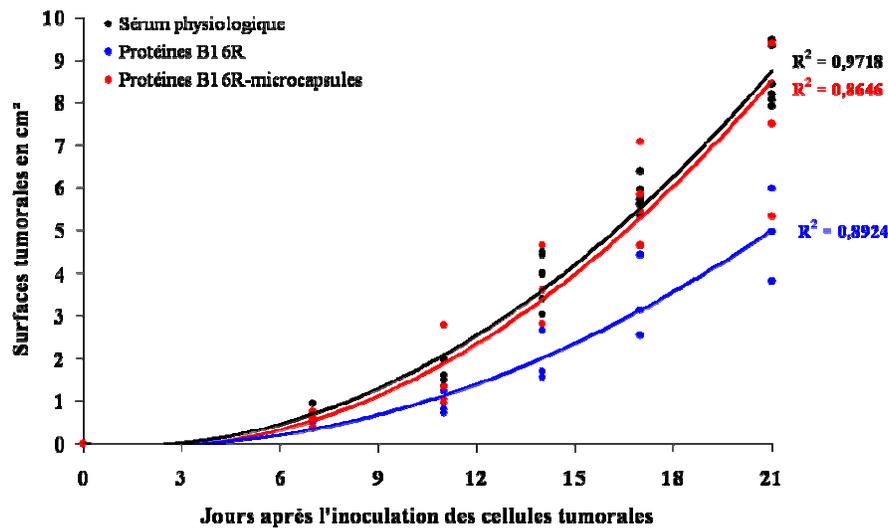
#### 4. Etude des effets des traitements curatifs à base de protéines solubles B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA administrés par voie sous-cutanée sur le développement tumoral

A partir du 4<sup>ème</sup> jour après l'inoculation des cellules tumorales ( $1.10^6$  cellules B16R viables en *s.c.*), 3 injections espacées de 7 jours ont été effectuées à proximité de la tumeur. Durant le traitement, le suivi du développement tumoral a été effectué. Ainsi, les effets des différents traitements curatifs (injection de protéines B16R et de protéines B16R chargées

dans les microcapsules d'HEA) sur le développement tumoral a été évalué en comparaison avec le développement tumoral chez des souris témoins ayant reçues des injections de sérum physiologique.

La Figure 46 montre que la progression tumorale moyenne est ralentie chez les souris traitées avec des protéines B16R seules, cependant, le prétraitement à base de protéines B16R chargées dans des microcapsules d'HEA n'a aucun effet sur le développement tumoral.

En conclusion, seul le traitement curatif à base de protéines B16R est efficace, en terme de ralentissement de la progression tumorale.



**Figure 46 :** Développement tumoral après l'inoculation de  $1.10^6$  cellules B16R viables en *s.c.* chez les souris B6D2F1 traitées curativement avec des protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA administrées par voie *s.c.*.

Chaque point représente la surface tumorale d'une souris au jour considéré, et la courbe (régression polynomiale) montre le développement tumoral moyen pour chaque lot de souris. Dans cette expérience  $n = 3$  souris. L'homogénéité du développement tumoral au sein d'un lot de souris est donnée par le coefficient de détermination  $R^2$  de la courbe. Plus  $R^2$  est proche de 1 et plus le développement est homogène.

## 5. Conclusions et Discussion

La mise au point de notre stratégie d'immunothérapie anti-mélanome B16R à base de protéines solubles totales B16R chargées dans des microcapsules d'HEA commence par l'étude de la capacité et de l'efficacité de chargement des microcapsules pour les protéines. Nous avons montré que l'efficacité de chargement des microcapsules pour les protéines B16R, tout comme pour la SAB, est fixe et que la capacité de chargement augmente proportionnellement avec les concentrations en protéines des solutions de chargement. L'efficacité de chargement est beaucoup plus importante pour les protéines solubles totales B16R ( $88\% \pm 2$ ) que pour la SAB ( $17\% \pm 4$ ). Cette différence doit provenir du fait qu'il s'agit d'un mélange de protéines de poids moléculaire hétérogène. Ainsi, l'analyse par Western-blot montre que certaines protéines du mélange vont être chargées plus efficacement que d'autres. Dans notre cas, il semble que, d'un point de vue général, les grosses protéines sont plus facilement captées par les microcapsules. Mais, en plus de la taille, un autre paramètre tel que la charge des protéines doit aussi intervenir. En effet, certaines protéines de haut poids moléculaire ne vont pas être chargées efficacement alors que d'autres de faible poids vont l'être. Cette sélection peut être un problème pour la suite de notre travail. Nous pouvons imaginer que des protéines fortement immunogènes, c'est-à-dire, importantes pour la stimulation d'une réponse immunitaire anti-mélanome B16R, peuvent ne pas être chargées dans les microcapsules.

Avant les traitements proprement dits, nous avons étudié la cytotoxicité *in vitro* des microcapsules d'HEA vis-à-vis des cellules B16R contre lesquelles nous souhaitons lutter. Nous avons montré que les microcapsules n'ont pas d'effet cytotoxique direct sur les cellules B16R. Précédemment, nous avons aussi démontré que les microcapsules d'HEA injectées seules ne sont pas immunogènes. Ainsi, les hypothétiques effets positifs des traitements prophylactiques et/ou curatifs à base de protéines B16R chargées dans des microcapsules d'HEA ne pourront pas être attribués aux microcapsules elles-mêmes.

### **Les traitements prophylactiques :**

En ce qui concerne les effets des traitements prophylactiques à bases de protéines solubles B16R chargées ou non dans des microcapsules sur la progression tumorale, le schéma d'immunisation utilisé (une primo-injection suivie de 3 rappels espacés de 7 jours) montre une efficacité plus importante de la formulation à base de protéines B16R seules lorsque celle-ci est administrée par voie *i.p.*, et une efficacité équivalente des deux

formulations lorsqu'elles sont administrées par voie *s.c.*. Cependant, la formulation à base de protéines B16R chargées dans les microcapsules est plus efficace par voie *s.c.* et cela peut s'expliquer par les différences qualitatives et quantitatives des cellules immunitaires rencontrées, et notamment des CPA. Dans ce modèle, les cellules tumorales sont inoculées en sous-cutanée, soit dans le cas des prétraitements en *s.c.*, à proximité du site d'injection des formulations vaccinales. Les adjuvants microparticulaires sont connus pour leur effet dépôt et leur capacité à créer au site d'injection une inflammation locale permettant le recrutement de cellules immunocompétentes (macrophages, cellules dendritiques, NK, cellules CD8 ... etc) (Schijns, 2000). Nous pouvons penser que nos microcapsules possèdent cette faculté et que les cellules immunocompétentes accumulées à proximité des cellules tumorales vont pouvoir migrer jusqu'à elles et les combattre.

Sachant que la voie *i.p.* n'est pas une voie communément utilisée en vaccination et que la voie *s.c.* semble la plus appropriée dans notre modèle, nous nous sommes intéressés aux mécanismes immunitaires impliqués dans les ralentissements de la progression tumorale observés suite aux traitements prophylactiques administrés par voie *s.c.*.

#### ***La stimulation de la réponse humorale par les traitements prophylactiques :***

Au début du prétraitement (à J7 et J11), la formulation à base de protéines B16R chargées dans les microcapsules est plus efficace car plus précoce. Mais, une semaine après les quatre injections (primo-injection et 3 rappels), le taux d'IgG totales anti-cellules B16R, le plus élevé est obtenu suite au prétraitement des animaux avec des protéines B16R seules. Ce taux est deux fois plus important pour ces souris que pour les souris prétraitées avec des protéines B16R-microcapsules. Soit, au moment de l'inoculation des cellules tumorales (à J28), les souris immunisées avec des protéines B16R seules possèdent deux fois plus d'anticorps susceptibles d'intervenir dans leur défense contre les cellules tumorales inoculées. Le schéma d'immunisation utilisé tranche en faveur de la formulation à base de protéines B16R seules, mais les résultats sous-entendent que la formulation à base de protéines B16R-microcapsules serait plus efficace dans un schéma d'immunisation dénombant une ou deux injections seulement.

Tout comme nous l'avons décrit dans la deuxième partie des résultats, la présence de protéines en surface des microcapsules constitue un signal d'activation supérieur des lymphocytes B avec une réponse humorale plus rapide (Bachmann *et coll.*, 1993 ; Fehr *et coll.*, 1998). Seulement, en comparaison avec l'injection des protéines B16R seules, la sélection des

protéines lors du chargement des microcapsules doit entraîner en plus des différences quantitatives, des différences qualitatives des IgG anti-cellules B16R produites.

***La stimulation de la réponse cellulaire par les traitements prophylactiques :***

Il est important de noter que les cellules B16R utilisées n'expriment pas naturellement de molécules du CMH de Classe I à leur surface, que ce soit *in vitro* ou récupérées *in vivo*. Une stimulation *in vitro* de cellules B16R avec de l'IFN- $\gamma$  permet de rétablir l'expression de ces molécules. Nous savons que les cellules tumorales utilisent de multiples mécanismes pour échapper au contrôle du système immunitaire et la perte ou la déficience de l'expression des molécules de Classe I impliquées dans la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T cytotoxiques en est un (Mocellin *et coll.*, 2004). Cette caractéristique des cellules B16R est intéressante non seulement pour comprendre les mécanismes immunitaires pouvant être impliqués dans les ralentissements de progression tumorale observés, mais aussi pour la mise au point de stratégie d'immunothérapie efficace contre ces cellules.

Les activités cytolytiques des cellules spléniques récupérées chez nos animaux prétraités vis-à-vis des cellules B16R ont été évaluées afin de rendre compte de la création, suite aux différents prétraitements, de cellules effectrices spécifiques capables de détruire les cellules tumorales cibles. Ainsi, après une rééducation des cellules spléniques avec des cellules B16R (« normales » ou exprimant des molécules de Classe I) permettant l'activation et l'expansion des cellules effectrices recherchées, ces même cellules sont mises en présence de cellules B16R cibles (« normales » ou exprimant des molécules de Classe I) et leur activité cytolytique évaluée. En parallèle, une étude quantitative des cellules susceptibles d'être à l'origine de cette activité cytolytique (cellules CD8 et NK) a été effectuée. En effet, les lymphocytes T CD8 (CTL) ont un rôle essentiel dans l'immunité adaptative anti-tumorale et la présence de CTL spécifiques de tumeurs chez des patients malades est associée à un bon pronostic (Lonchay *et coll.*, 2004). Les cellules NK représentent l'une des composantes effectrices majeurs du système immunitaire inné dont la quantification va nous aider dans l'interprétation des activités cytolytiques mesurées.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'étape de rééducation, que ce soit sur cellules B16R « normales » ou exprimant des molécules de Classe I, entraîne une diminution importante du nombre de cellules CD8. Ceci s'explique par la mort des cellules CD8 non spécifiques des cellules B16R et au maintien et à la prolifération des cellules CD8 spécifiques qui au départ étaient en nombre infime.

De plus, quel que soit le type de rééducation, le nombre de cellules CD8 chez les animaux prétraités avec des protéines B16R seules et des protéines B16R-microcapsules est supérieur au nombre de cellules CD8 des animaux témoins. Entre les 2 lots de souris prétraitées, ce nombre est plus élevé chez les animaux prétraités avec des protéines B16R seules.

Pour les cellules NK, selon le type de rééducation, nous observons deux phénomènes différents. Quel que soit le lot de souris, la rééducation sur cellules B16R « normales » (sans molécules de Classe I) entraîne une augmentation du nombre de cellules NK, augmentation qui est plus importante pour le lot de souris témoins que pour les souris prétraitées avec des protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules. Cela peut s'expliquer par l'absence de molécules de Classe I à la surface des cellules permettant une activation et une prolifération des cellules NK qui sont Classe I indépendantes. En effet, contrairement aux cellules CD8 qui ont besoin de reconnaître une molécule de Classe I pour lyser la cellule, ces molécules constituent chez les cellules NK un signal d'inhibition (Moretta *et coll.*, 2001). C'est pourquoi, la rééducation sur cellules B16R exprimant des molécules de Classe I entraîne au contraire une diminution du nombre de cellules NK, diminution qui est moins importante dans le lot de souris témoin que dans les deux autres lots.

Quel que soit le lot de souris considéré, l'étape de rééducation sur des cellules B16R « normales » engendre un nombre plus important de cellules NK que la rééducation sur des cellules B16R exprimant des molécules de Classe I. Quel que soit le type de rééducation, le nombre de cellules NK est toujours plus important pour le lot témoin, et est identique pour les deux lots de souris prétraitées.

Grâce au Tableau XIII récapitulatif, nous pouvons remarquer que pour une même activité cytolytique, les cellules immunitaires effectrices sont quantitativement différentes. Ainsi, chaque population de cellules effectrices (CD8 et NK principalement) possède une activité cytolytique intrinsèque, et la somme de ces activités donne les activités cytolytiques totales que nous avons évaluées. L'interprétation des activités cytolytiques obtenues doit prendre en compte le nombre plus élevé de NK chez les témoins par rapport aux deux autres lots, et le nombre plus élevé de CD8 chez ces deux autres lots par rapport aux témoins. Ainsi, s'expliquent les faibles différences de cytotoxicité entre les différents lots de souris. De plus s'ajoute un paramètre supplémentaire qui est la présence ou l'absence de molécules de classe I à la surface des cellules B16R utilisées comme cibles des cellules spléniques.

En comparaison avec la rééducation sur des cellules B16R avec des molécules de Classe I, la rééducation sur des cellules B16R « normales » engendre une activité cytolytique des cellules spléniques plus importante, et ceci quelle que soit la cible considérée (B16R « normales » ou avec des molécules de Classe I) et le prétraitement administré (sérum

physiologique, protéines B16R chargées ou non dans des microcapsules d'HEA). Ceci s'explique par le nombre supérieur de cellules NK chez les 3 lots de souris par rapport à la rééducation sur des cellules B16R avec des molécules de Classe I.

Quel que soit le type de rééducation, les activités cytolytiques supérieures vis-à-vis des cellules B16R exprimant des molécules de Classe I que vis-à-vis des cellules B16R « normales » est inhérente à la présence des molécules de Classe I à la surface des cellules cibles. Ainsi, les cellules immunitaires effectrices dépendantes de ces molécules, c'est-à-dire les cellules CD8, vont pouvoir agir spécifiquement. Cette cytotoxicité va s'ajouter à la cytotoxicité des cellules NK.

Dans le cas où les cellules cibles sont des cellules B16R « normales », les cellules CD8 ne peuvent agir spécifiquement, mais nous pouvons penser qu'une cytotoxicité de proximité peut intervenir. En effet, certains auteurs ont démontré que la libération de molécules telles que les perforines et les granzymes par les cellules CD8 et/ou CD4 dans l'environnement proche des cellules tumorales peut donner une cytotoxicité non spécifique (Homma *et coll.*, 2005). Cela permettrait d'expliquer les faibles différences d'activités cytolytiques entre les lots de souris, même si les nombres de CD8 et de NK sont différents. En effet, les lots témoins possédant plus de NK devraient avoir une activité cytolytique supérieure aux 2 autres lots, mais ces 2 lots possèdent plus de cellules CD8 qui, selon l'hypothèse de la cytotoxicité de proximité, comblent le déficit en NK.

En résumé, les prétraitements à base de protéines B16R seules ou de protéines B16R-microcapsules permettent la création de cellules CD8 effectrices spécifiques des cellules B16R. Dans ce schéma d'immunisation, le prétraitement à base de protéines B16R seules est légèrement plus efficace. Soit, au moment de l'inoculation des cellules tumorales, les souris prétraitées avec des protéines B16R seules possèdent plus de cellules CD8 effectrices spécifiques des cellules B16R susceptibles de détruire spécifiquement les cellules B16R inoculées. Seulement, les cellules B16R inoculées ne possèdent pas de molécules de Classe I et donc les cellules CD8 effectrices spécifiques engendrées par les prétraitements s'avèrent inutiles pour lutter contre la tumeur. Ainsi, les ralentissements de progression tumorale observés ne peuvent s'expliquer par la présence de cellules CD8 effectrices. La réponse humorale peut-être à l'origine de ces ralentissements. En effet, les anticorps sont impliqués dans différents mécanismes de l'immunité comme la lyse médiée par le complément ou encore la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, et se sont parfois avérés utiles contre certains cancers (Livingston *et coll.*, 1994 ; von Mensdorff-Pouilly *et coll.*, 2000). Cette réponse humorale étant plus importante chez les souris prétraitées avec des protéines B16R seules, le ralentissement de la progression tumorale devrait être plus important chez ces

animaux que chez les souris prétraitées avec des protéines B16R chargées dans les microcapsules. Un mécanisme supplémentaire doit donc intervenir chez ces dernières pour ralentir la progression, telle que l'inflammation locale évoquée précédemment, ou alors, l'immunité adaptative anti-tumorale anticorps dépendante mise en place est limitée.

La rééducation sur cellules B16R exprimant des molécules de Classe I ne nous apprend rien de plus que la rééducation sur cellules B16R « normales », sauf que la présence des molécules de Classe I permet une meilleure prolifération et peut-être activation des cellules CD8 effectrices spécifiques générées par les prétraitements (protéines B16R chargées ou non dans les microcapsules).

Par contre, la comparaison des 2 types de cellules cibles (B16R « normales » et B16R exprimant des molécules de Classe I) nous a permis de mettre en évidence l'importance de la présence de ces molécules. En effet, quel que soit le type de rééducation, l'activité cytolytique des cellules spléniques est plus importante quand les cellules cibles possèdent des Classes I. Les Classes I permettent aux cellules CD8 effectrices générées de pouvoir lyser spécifiquement les cellules B16R. Ainsi, nous pouvons prédire que les prétraitements utilisés seront plus efficaces sur des cellules B16R exprimant des molécules de Classe I. L'ajout, à nos prétraitements, d'un traitement par interféron (alpha ou gamma) capable de faire exprimer des molécules de Classe I aux cellules B16R est à envisager.

#### **Les traitements curatifs :**

En ce qui concerne les traitements curatifs, le traitement à base de protéines B16R seules permet un ralentissement de la progression tumorale. Dans ce cas, nous pouvons penser que, en plus de l'activation du système immunitaire créé par l'inoculation des cellules tumorales, les injections curatives de protéines B16R chargées dans les microcapsules d'HEA apportent une stimulation supplémentaire qui au lieu d'avoir des effets bénéfiques sur la réponse anti-tumorale entraînent un état de tolérance immunitaire.

**Tableau XIII :** Tableau récapitulatif des résultats de cytotoxicité et des études qualitatives et quantitatives réalisées sur les cellules spléniques rééduquées des animaux prétraités.

	Rééducation sur cellules B16R « normales »			Rééducation sur cellules B16R exprimant des molécules de Classe I		
	<i>Sérum physiologique</i>	<i>Protéines B16R</i>	<i>Protéines B16R- microcapsules</i>	<i>Sérum physiologique</i>	<i>Protéines B16R</i>	<i>Protéines B16R- microcapsules</i>
<b>CD8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1,5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>
<b>NK</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Cytotoxicité contre des cellules B16R « normales »</b>						
<b>Cytotoxicité contre des cellules B16R exprimant des molécules de Classe I</b>						

*Les quantités de cellules immunitaires effectrices (CD8 et NK) obtenues après rééducation sont symbolisées arbitrairement par des chiffres (1, 1.5, 2 et 3) dont la supériorité rend compte de la prépondérance des cellules.*

*Les pourcentages d'activités cytolytiques des cellules immunitaires effectrices obtenues après rééducation sont symbolisés arbitrairement par une couleur dont l'intensité de coloration rend compte de la grandeur du pourcentage.*

Dans le meilleur des cas, les adjuvants devraient être stables, avoir une longue durée de conservation, biodégradable, bon marché, immunologiquement inerte, avoir une immuno-réaction appropriée, à savoir une immunité cellulaire ou anticorps selon les conditions pour la protection et surtout être non toxique (ou le moins toxique possible).

Nous avons montré que les microcapsules d'HEA répondent à la majorité de ces critères. Elles sont biocompatibles, biodégradables, peu coûteuses, faciles à produire et à utiliser. Elles présentent divers avantages tels que leur composition, le moyen physique utilisé pour le chargement des antigènes et la localisation des antigènes chargés. Elles sont de plus immunologiquement inertes et capables d'induire à la fois une réponse humorale et cellulaire contre les antigènes chargés. En vaccination anti-cancéreuse, cette double immunité est très recherchée. Seulement, malgré toutes ces caractéristiques, elles se sont révélées d'efficacité limitée dans notre stratégie d'immunothérapie anti-mélanome B16R.

### **Quels points de notre stratégie d'immunothérapie anti-mélanome pourrions nous envisager d'améliorer ou de modifier ?**

#### ***1. Amélioration de la présentation des antigènes aux DC***

*a)* L'internalisation des microcapsules d'HEA par les DC est le point délicat de notre stratégie. Pour améliorer leur internalisation, la taille de nos microcapsules, actuellement comprise entre 4 et 15  $\mu\text{m}$  avec une médiane à 8.3  $\mu\text{m}$ , pourrait être légèrement diminuée. En effet, il est décrit dans la littérature, qu'une phagocytose optimale est obtenue avec des microparticules de taille comprise entre 5 et 10  $\mu\text{m}$  (O'Hagan *et coll.*, 2003 ; Johanson *et coll.*, 2000).

*b)* Les particules chargées positivement sont reconnues pour leurs propriétés d'adhérence aux cellules, telles que les DC, ce qui améliore leur internalisation (Wischke *et coll.*, 2006). La méthode de modification de charge pour améliorer la phagocytose est utilisée pour les microparticules de PLGA. Pour ces dernières, trois méthodes différentes sont rapportées dans la littérature: (i) l'incorporation de branches de polylysine (Caponetti *et coll.*, 1999) ou la conjugaison covalente de substances cationiques à la surface des particules (Kasturi *et coll.*, 2005), (ii) le mélange de PLGA avec un polymère cationique (Manuel *et coll.*, 2005), (iii) l'adsorption de molécules tensio-actives cationiques à la surface des particules durant l'étape d'émulsification, par exemple, adsorption de polylysine (Cui *et coll.*, 2001), de PEG-polylysine (Faraasen *et coll.*, 2003), de polyéthylèneimine (Shakweh *et coll.*, 2005), de chitosan (Kumar *et coll.*, 2004), ou de cétyltriméthylammonium bromide (Singh *et coll.*, 2000 ; Briones *et coll.*, 2001 ; Singh *et coll.*, 2001 ; Denis-Mize *et coll.*, 2003 ; O'Hagan *et coll.*, 2004).

La troisième approche semble être la plus simple, puisque aucune synthèse chimique n'est nécessaire, et la plus envisageable dans notre cas puisque la préparation des microcapsules d'HEA nécessite une étape d'émulsion.

*c)* L'activation des DC pourrait être améliorée par ajout d'un immunostimulant tel que le CpG. La mise en évidence de séquences immunostimulantes au sein des brins d'ADN en dehors de toute traduction est une découverte récente de la biologie de l'ADN. La présence de motifs CpG, reconnus par un récepteur spécifique (Toll-like receptor 9), induit l'activation des macrophages, des cellules natural killer (NK) et des lymphocytes B, et oriente la réponse lymphocytaire T vers le profil Th<sub>1</sub>. Les propriétés immunostimulantes des motifs CpG ont été utilisées avec succès dans de nombreux modèles animaux de vaccins, d'allergies ou de maladies infectieuses, et plusieurs essais cliniques sont en cours. Dans le cas des cancers, lorsqu'un antigène tumoral est connu, les motifs CpG peuvent être utilisés comme adjuvants dans un cadre vaccinal, ou combinés avec des anticorps monoclonaux. Dans les autres cas, des oligonucléotides de synthèse portant des motifs CpG (CpG-ODN) peuvent être utilisés de façon locale pour stimuler l'immunité innée et favoriser l'émergence d'une réponse immune spécifique. Plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours avec des CpG-ODN, seuls ou en association avec des anticorps monoclonaux, dans les mélanomes (Davila *et coll.*, 2000) ou les lymphomes (Warren *et coll.*, 2000).

Cette immunostimulation toute à fait intéressante est de plus en plus utilisée en addition d'un adjuvant microparticulaire (Malyala *et coll.*, 2007 ; Mansour *et coll.*, 2007).

## ***2. Modifier le schéma d'immunisation***

*a)* La primo-injection et les 3 rappels utilisés dans notre stratégie ne sont peut-être pas la meilleure fréquence d'immunisation pour notre traitement à base de protéines chargées dans les microcapsules d'HEA. Les systèmes microparticulaires ont la propriété d'engendrer une réponse immunitaire durable après seulement une immunisation (O'Hagan *et coll.*, 1998), la répétition des injections pouvant entraîner un effet délétère sur la réponse immunitaire. Ainsi, l'efficacité limitée du traitement à base de protéines solubles B16R chargées dans des microcapsules d'HEA par rapport au traitement à base de protéines solubles seules, que ce soit dans le modèle prophylactique ou curatif, pourrait être due à l'induction d'une tolérance immunitaire à cause d'une stimulation accrue du système immunitaire.

*b)* Une voie d'administration différente comme la voie orale pourrait être testée. En effet, les microparticules d'amidon, tels que les microparticules de polyacrylamidon, sont

d'excellents adjuvants pour la vaccination orale (Rydell *et coll.*, 2005). Leur atout principal est de protéger l'antigène pendant le transport jusqu'aux zones intestinales immunocompétentes. Ainsi transportés, les antigènes chargés dans les microparticules vont pouvoir être captés par les plaques de Peyer (Stertman *et coll.*, 2006). Les microcapsules d'HEA, modifiées pour être moins rapidement dégradées que les microcapsules d'amidon, sont susceptibles d'être aussi efficaces que les microparticules de polyacrylamidon dans un modèle de vaccination orale. De plus, la formulation récente d'un vaccin oral anti-mélanome utilisant des microparticules, confirme notre perspective (Lai *et coll.*, 2007).

### ***3. Contourner les problèmes de tolérance mis en œuvre par les cellules tumorales***

Même si la vaccination permet une réponse immunitaire anti-tumorale efficace, les tumeurs développent différentes stratégies pour échapper à la surveillance du système immunitaire. Parmi ces stratégies, nous pouvons trouver la perte d'expression d'antigène de tumeur, la régulation négative de l'expression des molécules du CMH, l'expression de Fas-L pouvant induire l'apoptose des cellules T activées, la sécrétion de VEGF et d'autres cytokines tels qu'IL-10 ou TGF- $\beta$ . D'autres mécanismes incluent la génération de cellules T régulatrices et des cellules myéloïdes suppressives (Mocellin *et coll.*, 2004). Ainsi, un bon vaccin anti-cancéreux doit permettre une présentation optimale des antigènes tumoraux aux cellules immunitaires afin de générer une réponse immunitaire cellulaire et humorale efficace, mais aussi permettre de contourner les problèmes de tolérance. Dans notre travail, nous avons démontré que les cellules B16R n'expriment pas de molécules de Classe I du CMH. Cette tolérance immunitaire développée par les cellules B16R empêche l'action des cellules CD8 spécifiques générées par nos traitements. Seulement, nous avons aussi démontré qu'elles sont capables de produire des molécules de Classe I du CMH après stimulation avec de l'IFN $\gamma$ , ce qui nous permet d'envisager d'associer à notre stratégie un tel traitement.

### ***4. Améliorer le choix des antigènes***

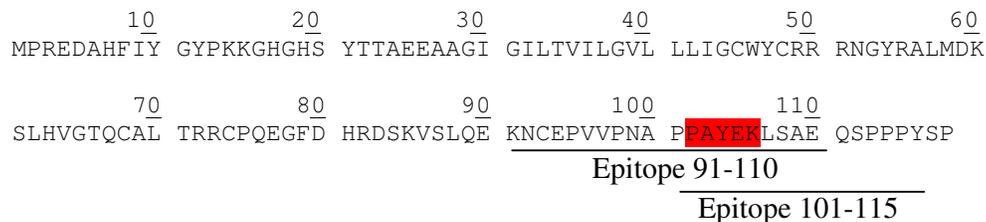
L'utilisation d'un ou plusieurs antigènes définis serait sans doute plus appropriée que celle des protéines totales extraites des cellules B16R à cause de la sélection des protéines chargées par les microcapsules d'HEA.

Durant la dernière décennie, de nombreux antigènes de tumeurs ont été identifiés par des approches génétiques et biochimiques (Renkvist *et coll.*, 2001) et les premiers ont été décrits en utilisant les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de tumeurs obtenus à partir

de patients atteints de cancer (Boon *et coll.*, 1994). Des lignées et des clones de ces CTL ont été générés à partir du sang des patients et utilisés pour créer une banque d'ADNc dérivée de la tumeur autologue. Cette approche a permis d'identifier un grand nombre d'antigènes reconnus par les cellules T. Dans le cas du mélanome, nous pouvons classer ces antigènes en 3 catégories : a) Les protéines mélanosomales qui interviennent dans la synthèse de la mélanine (ex : Melan A/MART-1, gp 100, tyrosinase, TRP-1 et TRP-2) ; b) Les protéines mutées spécifiques de la tumeur (ex :  $\beta$ -caténine) ; c) Les autres protéines (ex : p15). Les protéines mutées ne sont pas les cibles les plus utilisées en immunothérapie anti-mélanome, à cause du faible pourcentage de patients exprimant ces protéines et du manque de techniques efficaces pour l'identification de ces antigènes. Les antigènes les plus attractifs pour le développement d'approches thérapeutiques et/ou prophylactiques pour traiter le mélanome sont les protéines spécifiques des mélanosomes (Kawakami *et coll.*, 1998). De nombreux lymphocytes T spécifiques du mélanome reconnaissent des protéines mélanosomales non mutées, suggérant leur forte immunogénicité. Ces lymphocytes T peuvent être induits chez de nombreux patients de type HLA différent. Ainsi, ces protéines peuvent être utilisées pour le développement d'immunothérapie anti-mélanome chez un grand nombre de patients. Enfin, des régressions tumorales ont été observées chez des patients suite à un traitement d'immunothérapie à base de protéines Melan A/MART-1, gp 100 ou tyrosinase (Salgaller *et coll.*, 1995; Ribas *et coll.*, 2000 ; Schumacher *et coll.*, 2005). Ces nouveaux vaccins ciblent traditionnellement l'activation des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL) *via* les molécules de classe I du CMH. Récemment, il est devenu évident que seule l'activation des CTL est insuffisante pour l'obtention d'une réponse anticancéreuse efficace. Une activation optimale des CTL spécifiques de la tumeur requière la co-activation des lymphocytes T auxiliaires (T CD4+) (Knutson *et coll.*, 2005). Sans une activation simultanée des T CD4+, l'activation des CTL ne peut être soutenue. Ces cellules T CD4+ régulent de nombreux aspects de la réponse immune adaptative et permettent le recrutement des cellules de l'immunité innée tels que les macrophages (Hung *et coll.*, 1998 ; Knuston *et coll.* 2005). Ainsi, un vaccin anti-tumoral efficace doit permettre non seulement, l'activation des CTL mais surtout des cellules T CD4+. Mais aucun épitope spécifique des molécules de classe II du CMH n'a encore été testé.

Tiwari *et al* (2004) ont développé une approche informatique permettant de prédire l'antigénicité des épitopes d'un peptide (Tiwari *et coll.*, 2004). Les auteurs se sont intéressés au peptide de Melan A/MART-1 humain et en ont isolé un déterminant antigénique de 15 AA (PPAYEKLSAEQSPPP)<sub>101-115</sub> possédant une haute probabilité de fixation aux molécules de classe II du CMH et étant très immunogène. Un vaccin anti-Melan A/MART-1 dirigé

contre le segment PPAYEKLSAEQSPPP serait spécifique de la protéine Melan A/MART-1 des mélanocytes et permettrait, de part sa fixation aux molécules de classe II du CMH, d'activer les cellules T CD4+ et d'engendrer une réponse anti-mélanome peut-être plus efficace que les vaccins traditionnels ciblant l'activation des CTL. De plus, le peptide Melan A/MART-1 humain est immunogène aussi bien dans un modèle animal que dans un modèle humain. Ainsi, les expériences pratiquées *in vivo* chez la souris sont facilement transposables à l'homme. Le peptide de 15 AA possède un motif de 5 AA (PAYEK) qui constitue la partie immunogène du segment. Ce petit motif PAYEK est en fait, une séquence orthologue de la protéine Melan A/MART-1 retrouvée chez l'Homo-sapiens (Okazaki *et coll.*, 2002). Plus récemment, Godefroy *et coll.* (2006) ont mis en évidence, chez des patients atteints de mélanome, des cellules T CD4+ circulantes spécifiques de 2 épitopes de la protéine Melan-A/MART-1, à savoir l'épitope 1-20 et le 91-110. Ce dernier contient une partie de notre peptide d'intérêt (Fig.47.). Ils ont aussi démontré que cet épitope 91-110 était restreint à la molécule de classe II HLA-DR52 qui est exprimée très fréquemment dans la population, et que les T CD4+ spécifiques de cet épitope le reconnaissent suite à un mode endogène mais aussi exogène de présentation (Godefroy *et coll.*, 2006).



**Figure 47** : Séquence de la protéine Melan-A/MART-1

Tous ces éléments laissent suggérer que cet épitope 101-115 de la protéine Melan-A/MART-1 serait un candidat plus que prometteur en immunothérapie anti-mélanome. C'est pourquoi nous avons voulu nous en assurer.

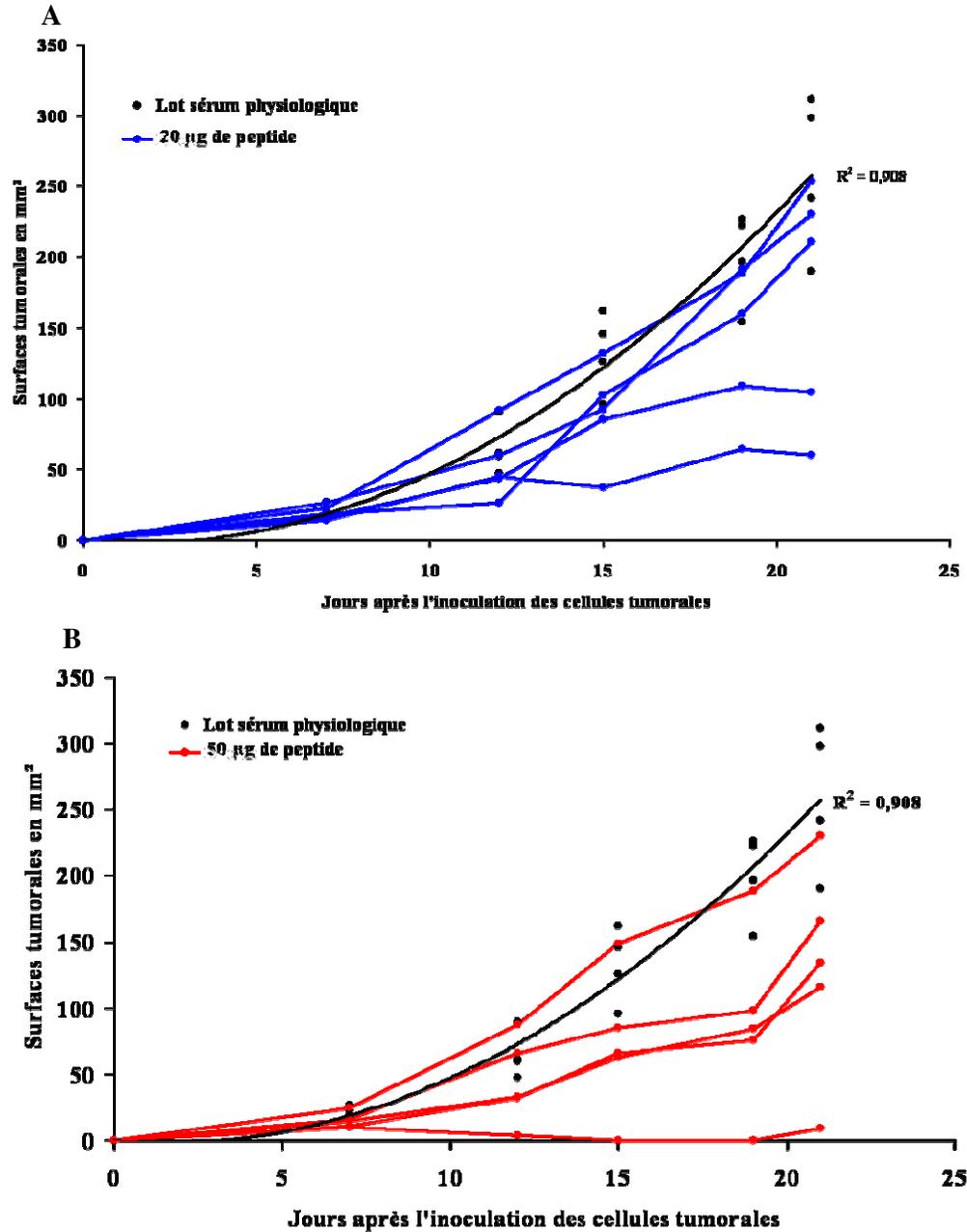
Le peptide (PPAYEKLSAEQSPPP) a été synthétisé et purifié par le Laboratoire de Chimie Thérapeutique, FRE CNRS 2715, U.F.R Pharmacie de Reims, avant d'être testé dans une approche prophylactique contre le mélanome B16R. Pour cela, deux quantités différentes de peptide (20 et 50 µg) ont été injectées par voie sous-cutanée à des groupes de 5 souris B6D2F1. Suite à la primo-injection, deux rappels espacés de 7 jours ont été effectués. Une semaine après le dernier rappel, 1.10<sup>6</sup> cellules B16R viables en suspension dans 100 µl de

sérum physiologique ont été injectés sur le flanc gauche des souris en sous-cutané. Après l'apparition tumorale, le suivi du développement tumoral a été réalisé.

Les courbes de progression tumorale (Fig. 48) montrent que par rapport aux souris témoins ayant reçu des injections de sérum physiologique :

- 40% des souris traitées avec 20 µg de peptides (2 souris sur 5) ont une progression tumorale ralentie (environ 60% à J21).
- 60% des souris traitées avec 50 µg de peptides (3 souris sur 5) ont une progression tumorale ralentie (environ 50% à J21), et 20% (1 souris sur 5) ont subi une régression tumorale entre J7 et J18 suivie d'une reprise du développement à J21.

Ces résultats préliminaires concernant le peptide (PPAYKLSAEQSPPP) sont encourageants. Il nous reste à déterminer les mécanismes immunitaires responsables des ralentissements de progression tumorale observés.



**Figure 48 :** Développement tumoral après inoculation de  $1.10^6$  cellules B16R viables en s.c. chez les souris B6D2F1 prétraitées avec le peptide Melan-A/MART-1<sub>101-115</sub> (PPAYKLSAEQSPPP) administré par voie s.c..

Chaque point représente la surface tumorale d'une souris au jour considéré. La courbe (régression polynomiale) montre le développement moyen pour le lot de souris témoin. L'homogénéité du développement tumoral au sein du lot témoin est donnée par le coefficient de détermination  $R^2$  de la courbe. Plus le  $R^2$  est proche de 1 et plus le développement est homogène. Dans cette expérience,  $n=4$  souris pour le lot témoin et  $n=5$  souris pour les lots traités. **A** souris prétraitées avec 20 µg de peptide. **B** souris prétraitées avec 50 µg de peptide.

Pour conclure, nous pourrions envisager une stratégie d'immunothérapie anti-mélanome prenant en compte toutes ces remarques, c'est-à-dire permettant:

- une présentation maximale des antigènes aux CPA.
- d'engendrer une réponse immunitaire anti-mélanome humorale et cellulaire.
- une activation simultanée des lymphocytes T CD4 et CD8.
- de contourner les problèmes de tolérance immunitaire mis en œuvre par les cellules tumorales.

Mansour *et coll.* (2007) ont imaginé un vaccin thérapeutique anti-mélanome B16-F10 à dose unique qui répond à la majorité des attentes répertoriées ci-dessus. En effet, ce vaccin est constitué d'un épitope de la protéine TRP2 et d'un de p53 tous deux MHC classe I spécifiques, d'un peptide synthétique (PADRE) considéré comme l'épitope universel des cellules T helper (Alexander *et coll.*, 2004), et de l'immunostimulant CpG, le tout encapsulé dans des liposomes (VacciMax®). Ainsi, ce vaccin combine une bonne présentation des antigènes aux DC, grâce à l'utilisation des liposomes et du CpG, à une activation concomitante des lymphocytes CD4 (avec PADRE) et CD8 (avec les épitopes de TRP2 et p53).

Prenons en compte ce modèle, pourquoi ne pas envisager un vaccin thérapeutique anti-mélanome B16R constitué de l'épitope Melan-A/MART-1<sub>26-35</sub> (MHC classe I spécifique) (Romero *et coll.*, 1997), de l'épitope Melan-A/MART-1<sub>101-115</sub> (peptide PPAYKLSAEQSPPP MHC classe II spécifique) et de l'immunostimulant CpG, le tout chargé dans les microcapsules d'HEA. Selon les résultats obtenus avec cette formulation, un traitement parallèle avec de l'IFN $\gamma$  pourrait être associé afin de rendre les cellules tumorales plus réceptives aux traitements.

L'immunothérapie en général, et les vaccins thérapeutiques sont très étudiés dans le cas du mélanome. Malgré les efforts considérables mis en œuvre, aucun n'est autorisé comme approche thérapeutique, et très peu d'entre eux ont été évalué en essai clinique de phase 3 sans résultat probant.

Le mélanome contre lequel nous voulons lutter est un mélanome murin hautement résistant à la Doxorubicine. Ainsi, notre stratégie peut être envisagée en parallèle d'une chimiothérapie afin de détruire les cellules tumorales résiduelles devenues résistantes ou non. Elle peut aussi être envisagée après l'exérèse d'une tumeur primaire, et dans ce cas, cela

permettrait à la fois de détruire les cellules tumorales qui auraient échappé au traitement chirurgical, mais aussi de prévenir l'apparition de métastases.

### **Quelle autre utilisation de nos microcapsules d'HEA pouvons nous développer ?**

Aujourd'hui les vaccins sont constitués de formes vivantes atténuées ou mortes de microorganismes pathogènes. La propriété principale de ces vaccins est que la forme particulière des pathogènes est conservée. Le respect de cette forme permet un meilleur ciblage des CPA et une persistance des antigènes grâce à une plus lente dégradation. De cela résulte une réponse immunitaire cellulaire efficace de type T. Seulement, ce type de vaccins à base de virus ou de bactéries inactivées se sont parfois révélés nocifs (Donnelly *et coll.*, 2001; Cherkasova *et coll.*, 2002 ; Piyasirisilp *et coll.*, 2002). Une des alternatives proposées à cette toxicité est l'utilisation d'antigènes purifiés issus de parasites, de bactéries, de virus pathogènes, ou encore l'utilisation de peptides synthétiques. Malheureusement, ces vaccins à base de peptides ou de protéines sont faiblement immunogènes, et même administrés avec un sel d'aluminium (seul adjuvant autorisé à être utilisé chez l'homme), l'obtention d'une réponse efficace de type T n'est pas reproduite.

L'utilisation d'adjuvants microparticulaires en vaccination traditionnelle fait l'objet de recherches intensives. Ces particules chargées en antigènes permettraient de retrouver les propriétés des vaccins à base de virus ou de bactéries inactivées. En plus de leur innocuité, ces vaccins particuliers permettent de contourner les problèmes d'allergies causés par la synthèse accrue d'IgE suite à l'injection de sels d'aluminium (Gupta, 1998).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### A :

ABBAS AK, MURPHY KM, SHER A.

Functional diversity of helper T lymphocytes.

Nature 1996; 383 (6603): 787-793.

AHMANN DL, CREAGAN ET, HAHN RG, EDMONSON JH, BISEL HF, SCHAID DJ.

Complete responses and long-term survivals after systemic chemotherapy for patients with advanced malignant melanoma.

Cancer 1989; 63 (2): 224-227.

ALEXANDER J, DEL GUERCIO MF, FRAME B, MAEWAL A, SETTE A, NAHM MH, *et al.*

Development of experimental carbohydrate-conjugate vaccines composed of Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharides and the universal helper T-lymphocyte epitope (PADRE).

Vaccine 2004; 22 (19): 2362-2367.

ANGEVIN E, ANDRE F, ZITVOGEL L.

Antitumor cellular immunotherapy: the breakthrough of dendritic cells.

Bull Cancer 2000; 87 (1): 107-115.

ATKINS MB.

Immunotherapy and experimental approaches for metastatic melanoma.

Hematol Oncol Clin North Am 1998; 12 (4): 877-902, viii.

ATKINS MB, LOTZE MT, DUTCHER JP, FISHER RI, WEISS G, MARGOLIN K, *et al.*

High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993.

J Clin Oncol 1999; 17 (7): 2105-2116.

AUDRAN R, PETER K, DANNULL J, MEN Y, SCANDELLA E, GROETTRUP M, *et al.*

Encapsulation of peptides in biodegradable microspheres prolongs their MHC class-I presentation by dendritic cells and macrophages in vitro.

Vaccine 2003; 21 (11-12): 1250-1255.

AVRIL MF, BONNETERRE J, DELAUNAY M, GROSSHANS E, FUMOLEUA P, ISRAEL L, *et al.*

Combination chemotherapy of dacarbazine and fotemustine in disseminated malignant melanoma. Experience of the French Study Group.

Cancer Chemother Pharmacol 1990; 27 (2): 81-84.

AVRIL MF, BONNETERRE J, CUISSOL D, GROB JJ, KALIS B, FUMOLEAU P, *et al.*

Fotemustine plus dacarbazine for malignant melanoma.

Eur J Cancer 1992; 28A (11): 1807-1811.

**B :**

BACHMANN MF, ROHRER UH, KUNDIG TM, BURKI K, HENGARTNER H, ZINKERNAGEL RM.

The influence of antigen organization on B cell responsiveness.

Science 1993; 262 (5138): 1448-1451.

BAJETTA E, DEL VECCHIO M, BERNARD-MARTY C, VITALI M, BUZZONI R, RIXE O, *et al.*

Metastatic melanoma: chemotherapy.

Semin Oncol 2002; 29 (5): 427-445.

BAJETTA E, DEL VECCHIO M, NOVA P, FUSI A, DAPONTE A, SERTOLI MR, *et al.*

Multicenter phase III randomized trial of polychemotherapy (CVD regimen) versus the same chemotherapy (CT) plus subcutaneous interleukin-2 and interferon-alpha2b in metastatic melanoma.

Ann Oncol 2006; 17 (4): 571-577.

BAKKER AB, SCHREURS MW, DE BOER AJ, KAWAKAMI Y, ROSENBERG SA, ADEMA GJ, *et al.*

Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes.

J Exp Med 1994; 179 (3): 1005-1009.

BANCHEREAU J, STEINMAN RM.

Dendritic cells and the control of immunity.

Nature 1998; 392 (6673): 245-252.

BANCHEREAU J, PALUCKA AK.

Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer.

Nat Rev Immunol 2005; 5 (4): 296-306.

BANCROFT GJ.

The role of natural killer cells in innate resistance to infection.

Curr Opin Immunol 1993; 5 (4): 503-510.

BOON T, CEROTTINI JC, VAN DEN EYNDE B, VAN DER BRUGGEN P, VAN PEL A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes.

Annu Rev Immunol 1994; 12: 337-365.

BORDET AL, MICHENET P, COHEN C, ARBION F, EKINDI N, BONNEAU C, *et al.*

Post-vaccination granuloma due to aluminium hydroxide.

Ann Pathol 2001; 21 (2): 149-152.

BOSSI G, GRIFFITHS GM.

Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells.

Nat Med 1999; 5 (1): 90-96.

BRADFORD MM.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
Anal Biochem 1976; 72: 248-254.

BREWER JM, CONACHER M, SATOSKAR A, BLUETHMANN H, ALEXANDER J.

In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production.  
Eur J Immunol 1996; 26 (9): 2062-2066.

BREWER JM, CONACHER M, HUNTER CA, MOHRS M, BROMBACHER F, ALEXANDER J.

Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling.  
J Immunol 1999; 163 (12): 6448-6454.

BRIONES M, SINGH M, UGOZZOLI M, KAZZAZ J, KLAKAMP S, OTT G, *et al.*

The preparation, characterization, and evaluation of cationic microparticles for DNA vaccine delivery.

Pharm Res 2001; 18 (5): 709-712.

BURNET FM.

The concept of immunological surveillance.

Prog Exp Tumor Res 1970; 13: 1-27.

## C :

CAPONETTI G, HRKACH JS, KRIWET B, POH M, LOTAN N, COLOMBO P, *et al.*

Microparticles of novel branched copolymers of lactic acid and amino acids: preparation and characterization.

J Pharm Sci 1999; 88 (1): 136-141.

CARCABOSO AM, HERNANDEZ RM, IGARTUA M, ROSAS JE, PATARROYO ME, PEDRAZ JL.

Potent, long lasting systemic antibody levels and mixed Th1/Th2 immune response after nasal immunization with malaria antigen loaded PLGA microparticles.

Vaccine 2004; 22 (11-12): 1423-1432.

CATROS-QUEMENER V, BOUET F, GENETET N.

Antitumor immunity and cellular cancer therapies.

Med Sci (Paris) 2003; 19 (1): 43-53.

CHAPUT N, TAIEB J, SCHARTZ N, FLAMENT C, NOVAULT S, ANDRE F, *et al.*

The potential of exosomes in immunotherapy of cancer.

Blood Cells Mol Dis 2005; 35 (2): 111-115.

CHAUX P, VANTOMME V, STROOBANT V, THIELEMANS K, CORTHALS J, LUITEN R, *et al.*

Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes.

J Exp Med 1999; 189 (5): 767-778.

CHEN YT, SCANLAN MJ, SAHIN U, TURECI O, GURE AO, TSANG S, *et al.*  
A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening.  
Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94 (5): 1914-1918.

CHERKASOVA EA, KOROTKOVA EA, YAKOVENKO ML, IVANOVA OE, EREMEEVA TP, CHUMAKOV KM, *et al.*  
Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease.  
J Virol 2002; 76 (13): 6791-6799.

COLEY WB.  
The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893.  
Clin Orthop Relat Res 1991; (262): 3-11.

COX JC, COULTER AR.  
Adjuvants—a classification and review of their modes of action.  
Vaccine 1997; 15 (3): 248-256.

CREMASCHI D, PORTA C, GHIRARDELLI R.  
The active transport of polypeptides in the rabbit nasal mucosa is supported by a specific vesicular transport inhibited by cytochalasin D.  
Biochim Biophys Acta 1996; 1283 (1): 101-105.

CUI C, SCHWENDEMAN SP.  
Surface entrapment of polylysine in biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles.  
Macromolecules 2001; 34: 8426-8433.

## **D :**

DAVILA E, CELIS E.  
Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity.  
J Immunol 2000; 165 (1): 539-547.

DE BACKER O, ARDEN KC, BORETTI M, VANTOMME V, DE SMET C, CZEKAY S, *et al.*  
Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis.  
Cancer Res 1999; 59 (13): 3157-3165.

DE PLAEN E, ARDEN K, TRAVERSARI C, GAFORIO JJ, SZIKORA JP, DE SMET C, *et al.*  
Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family.  
Immunogenetics 1994; 40 (5): 360-369.

DEGIM IT, CELEBI N.  
Controlled delivery of peptides and proteins.  
Curr Pharm Des 2007; 13 (1): 99-117.

DEGLING L, STJARNKVIST P.  
Biodegradable microspheres. XVIII: The adjuvant effect of polyacryl starch microparticles with conjugated human serum albumin.  
*Vaccine* 1995; 13 (7): 629-636.

DENIS-MIZE KS, DUPUIS M, SINGH M, WOO C, UGOZZOLI M, O'HAGAN DT, *et al.*  
Mechanisms of increased immunogenicity for DNA-based vaccines adsorbed onto cationic microparticles.  
*Cell Immunol* 2003; 225 (1): 12-20.

DEVY J, BALASSE E, KAPLAN H, MADOULET C, ANDRY MC.  
Hydroxyethylstarch microcapsules: a preliminary study for tumor immunotherapy application.  
*Int J Pharm* 2006; 307 (2): 194-200.

DONNELLY S, LOSCHER CE, LYNCH MA, MILLS KH.  
Whole-cell but not acellular pertussis vaccines induce convulsive activity in mice: evidence of a role for toxin-induced interleukin-1beta in a new murine model for analysis of neuronal side effects of vaccination.  
*Infect Immun* 2001; 69 (7): 4217-4223.

DORVAL T, MATHIOT C, BRANDELY M, ESCANDE MC, FRIDMAN WH, POUILLART P.  
Lack of effect of tumour infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma who failed to respond to interleukin 2.  
*Eur J Cancer* 1992; 28 (2-3): 615-616.

DOYLE MV, LEE MT, FONG S.  
Comparison of the biological activities of human recombinant interleukin-2(125) and native interleukin-2.  
*J Biol Response Mod* 1985; 4 (1): 96-109.

DUNN GP, KOEBEL CM, SCHREIBER RD.  
Interferons, immunity and cancer immunoediting.  
*Nat Rev Immunol* 2006; 6 (11): 836-848.

**E :**

ELAMANCHILI P, DIWAN M, CAO M, SAMUEL J.  
Characterization of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) based nanoparticulate system for enhanced delivery of antigens to dendritic cells.  
*Vaccine* 2004; 22 (19): 2406-2412.

ELDRIDGE JH, STAAS JK, MEULBROEK JA, MCGHEE JR, TICE TR, GILLEY RM.  
Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system.  
*Mol Immunol* 1991; 28 (3): 287-294.

ERAZO A, KUTCHUKHIDZE N, LEUNG M, CHRIST AP, URBAN JF, JR., CUROTTO DE LAFAILLE MA, *et al.*  
Unique maturation program of the IgE response in vivo.  
*Immunity* 2007; 26 (2): 191-203.

**F :**

FARAASEN S, VOROS J, CSUCS G, TEXTOR M, MERKLE HP, WALTER E.  
Ligand-specific targeting of microspheres to phagocytes by surface modification with poly(L-lysine)-grafted poly(ethylene glycol) conjugate.  
Pharm Res 2003; 20 (2): 237-246.

FEHR T, SKRASTINA D, PUMPENS P, ZINKERNAGEL RM.  
T cell-independent type I antibody response against B cell epitopes expressed repetitively on recombinant virus particles.  
Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95 (16): 9477-9481.

FORMELLI F, ROSSI C, SUPINO R, PARMIANI G.  
In vivo characterization of a doxorubicin resistant B16 melanoma cell line.  
Br J Cancer 1986; 54 (2): 223-233.

**G :**

GODEFROY E, SCOTTO L, SOULEIMANIAN NE, RITTER G, OLD LJ, JOTEREAU F, *et al.*  
Identification of two Melan-A CD4+ T cell epitopes presented by frequently expressed MHC class II alleles.  
Clin Immunol 2006; 121 (1): 54-62.

GOTTSCHALK S, HESLOP HE, ROONEY CM.  
Adoptive immunotherapy for EBV-associated malignancies.  
Leuk Lymphoma 2005; 46 (1): 1-10.

GROB JJ, DRENO B, DE LA SALMONIERE P, DELAUNAY M, CUISSOL D, GUILLOT B, *et al.*  
Randomised trial of interferon alpha-2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases. French Cooperative Group on Melanoma.  
Lancet 1998; 351 (9120): 1905-1910.

GUPTA RK.  
Aluminum compounds as vaccine adjuvants.  
Adv Drug Deliv Rev 1998; 32 (3): 155-172.

GUPTA RK, SINGH M, O'HAGAN DT.  
Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines.  
Adv Drug Deliv Rev 1998; 32 (3): 225-246.

GUTIERRO I, HERNANDEZ RM, IGARTUA M, GASCON AR, PEDRAZ JL.  
Influence of dose and immunization route on the serum Ig G antibody response to BSA loaded PLGA microspheres.  
Vaccine 2002; 20 (17-18): 2181-2190.

## **H :**

HAMILTON WB, HELLING F, LLOYD KO, LIVINGSTON PO.

Ganglioside expression on human malignant melanoma assessed by quantitative immune thin-layer chromatography.

Int J Cancer 1993; 53 (4): 566-573.

HELMBACH H, SINHA P, SCHADENDORF D.

Human melanoma: drug resistance.

Recent Results Cancer Res 2003; 161: 93-110.

HOMMA S, KOMITA H, SAGAWA Y, OHNO T, TODA G.

Antitumour activity mediated by CD4+ cytotoxic T lymphocytes against MHC class II-negative mouse hepatocellular carcinoma induced by dendritic cell vaccine and interleukin-12.

Immunology 2005; 115 (4): 451-461.

HSUEH EC, MORTON DL.

Antigen-based immunotherapy of melanoma: Canvaxin therapeutic polyvalent cancer vaccine.

Semin Cancer Biol 2003; 13 (6): 401-407.

HUNG K, HAYASHI R, LAFOND-WALKER A, LOWENSTEIN C, PARDOLL D, LEVITSKY H.

The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response.

J Exp Med 1998; 188 (12): 2357-2368.

## **I :**

ICHIHASHI N, KITAJIMA Y.

Chemotherapy induces or increases expression of multidrug resistance-associated protein in malignant melanoma cells.

Br J Dermatol 2001; 144 (4): 745-750.

## **J :**

JAGER D, JAGER E, KNUTH A.

Vaccination for malignant melanoma: recent developments.

Oncology 2001; 60 (1): 1-7.

JASINSKA J, WAGNER S, RADAUER C, SEDIVY R, BRODOWICZ T, WILTSCHKE C, *et al.*

Inhibition of tumor cell growth by antibodies induced after vaccination with peptides derived from the extracellular domain of Her-2/neu.

Int J Cancer 2003; 107 (6): 976-983.

JECHLINGER W.

Optimization and delivery of plasmid DNA for vaccination.

Expert Rev Vaccines 2006; 5 (6): 803-825.

JENNE L, ARRIGHI JF, JONULEIT H, SAURAT JH, HAUSER C.  
Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human CD8+ T cells for efficient tumor cell lysis.  
*Cancer Res* 2000; 60 (16): 4446-4452.

JOHANSEN P, MEN Y, MERKLE HP, GANDER B.  
Revisiting PLA/PLGA microspheres: an analysis of their potential in parenteral vaccination.  
*Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50 (1): 129-146.

JOHNSTON JB, NAVARATNAM S, PITZ MW, MANIATE JM, WIECHEC E, BAUST H, *et al.*  
Targeting the EGFR pathway for cancer therapy.  
*Curr Med Chem* 2006; 13 (29): 3483-3492.

JUNGHEINRICH C, SCHARPF R, WARGENAU M, BEPPERLING F, BARON JF.  
The pharmacokinetics and tolerability of an intravenous infusion of the new hydroxyethyl starch 130/0.4 (6%, 500 mL) in mild-to-severe renal impairment.  
*Anesth Analg* 2002; 95 (3): 544-551, table of contents.

**K :**

KASTURI SP, SACHAPHIBULKIJ K, ROY K.  
Covalent conjugation of polyethyleneimine on biodegradable microparticles for delivery of plasmid DNA vaccines.  
*Biomaterials* 2005; 26 (32): 6375-6385.

KAWAKAMI Y, ROBBINS PF, WANG RF, PARKHURST M, KANG X, ROSENBERG SA.  
The use of melanosomal proteins in the immunotherapy of melanoma.  
*J Immunother* (1997) 1998; 21 (4): 237-246.

KAZZAZ J, NEIDLEMAN J, SINGH M, OTT G, O'HAGAN DT.  
Novel anionic microparticles are a potent adjuvant for the induction of cytotoxic T lymphocytes against recombinant p55 gag from HIV-1.  
*J Control Release* 2000; 67 (2-3): 347-356.

KELLY DM, EMRE S, GUY SR, MILLER CM, SCHWARTZ ME, SHEINER PA.  
Liver transplant recipients are not at increased risk for nonlymphoid solid organ tumors.  
*Cancer* 1998; 83 (6): 1237-1243.

KERSTEN GF, CROMMELIN DJ.  
Liposomes and ISCOMs.  
*Vaccine* 2003; 21 (9-10): 915-920.

KHAJURIA A, GUPTA A, MALIK F, SINGH S, SINGH J, GUPTA BD, *et al.*  
A new vaccine adjuvant (BOS 2000) a potent enhancer mixed Th1/Th2 immune responses in mice immunized with HBsAg.  
*Vaccine* 2007; 25 (23): 4586-4594.

KIRKWOOD JM, STRAWDERMAN MH, ERNSTOFF MS, SMITH TJ, BORDEN EC, BLUM RH.

Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684.

J Clin Oncol 1996; 14 (1): 7-17.

KIRKWOOD JM, IBRAHIM JG, SOSMAN JA, SONDAK VK, AGARWALA SS, ERNSTOFF MS, *et al.*

High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801.

J Clin Oncol 2001; 19 (9): 2370-2380.

KNUTSON KL, DISIS ML.

Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy.

Cancer Immunol Immunother 2005; 54 (8): 721-728.

KNUTSON KL, DISIS ML.

Augmenting T helper cell immunity in cancer.

Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 2005; 5 (4): 365-371.

KRAUSE SW, NEUMANN C, SORURI A, MAYER S, PETERS JH, ANDREESEN R.

The treatment of patients with disseminated malignant melanoma by vaccination with autologous cell hybrids of tumor cells and dendritic cells.

J Immunother (1997) 2002; 25 (5): 421-428.

KRUGER A, UMANSKY V, ROCHA M, HACKER HJ, SCHIRRMACHER V, VON HOEGEN P.

Pattern and load of spontaneous liver metastasis dependent on host immune status studied with a lacZ transduced lymphoma.

Blood 1994; 84 (9): 3166-3174.

KUPPNER MC, HAMOU MF, DE TRIBOLET N.

Immunohistological and functional analyses of lymphoid infiltrates in human glioblastomas.

Cancer Res 1988; 48 (23): 6926-6932.

**L :**

LAI YH, D'SOUZA MJ.

Formulation and evaluation of an oral melanoma vaccine.

J Microencapsul 2007; 24 (3): 235-252.

LANGERON O, DOELBERG M, ANG ET, BONNET F, CAPDEVILA X, CORIAT P.

Voluven, a lower substituted novel hydroxyethyl starch (HES 130/0.4), causes fewer effects on coagulation in major orthopedic surgery than HES 200/0.5.

Anesth Analg 2001; 92 (4): 855-862.

LARIONOVA NV, PONCHEL G, DUCHENE D, LARIONOVA NI.

Biodegradable cross-linked starch/protein microcapsules containing proteinase inhibitor for oral protein administration.

Int J Pharm 1999; 189 (2): 171-178.

LEJEUNE FJ.

The impact of surgery on the course of melanoma.

Recent Results Cancer Res 2002; 160: 151-157.

LEVY MC, ANDRY MC.

Microparticles prepared through interfacial cross-linking of starch derivatives.

Int. J. Pharm. 1990; 62: 27-35.

LEVY MC, LEFEBVRE S, RAHMOUNI M, ANDRY MC, MANFAIT M.

Fourier transform infrared spectroscopic studies of human serum albumin microcapsules prepared by interfacial cross-linking with terephthaloylchloride: influence of polycondensation pH on spectra and relation with microcapsule morphology and size.

J Pharm Sci 1991; 80 (6): 578-585.

LI Y, MCCLAY EF.

Systemic chemotherapy for the treatment of metastatic melanoma.

Semin Oncol 2002; 29 (5): 413-426.

LIVINGSTON PO, WONG GY, ADLURI S, TAO Y, PADAVAN M, PARENTE R, *et al.*

Improved survival in stage III melanoma patients with GM2 antibodies: a randomized trial of adjuvant vaccination with GM2 ganglioside.

J Clin Oncol 1994; 12 (5): 1036-1044.

LONCHAY C, VAN DER BRUGGEN P, CONNEROTTE T, HANAGIRI T, COULIE P, COLAU D, *et al.*

Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen.

Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101 Suppl 2: 14631-14638.

LOTZE MT, HELLERSTEDT B, STOLINSKI L, TUETING T, WILSON C, KINZLER D, *et al.*

The role of interleukin-2, interleukin-12, and dendritic cells in cancer therapy.

Cancer J Sci Am 1997; 3 Suppl 1: S109-114.

## **M :**

MACCALLI C, LI YF, EL-GAMIL M, ROSENBERG SA, ROBBINS PF.

Identification of a colorectal tumor-associated antigen (COA-1) recognized by CD4(+) T lymphocytes.

Cancer Res 2003; 63 (20): 6735-6743.

MALYALA P, CHESKO J, UGOZZOLI M, GOODSELL A, ZHOU F, VAJDY M, *et al.*

The potency of the adjuvant, CpG oligos, is enhanced by encapsulation in PLG microparticles.

J Pharm Sci 2007:

MANICI S, STURNIOLO T, IMRO MA, HAMMER J, SINIGAGLIA F, NOPPEN C, *et al.*

Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11.

J Exp Med 1999; 189 (5): 871-876.

MANSOUR M, POHAJDAK B, KAST WM, FUENTES-ORTEGA A, KORETS-SMITH E, WEIR GM, *et al.*

Therapy of established B16-F10 melanoma tumors by a single vaccination of CTL/T helper peptides in VacciMax.

J Transl Med 2007; 5: 20.

MANUEL WS, ZHENG JI, HORNSBY PJ.

Transfection by polyethyleneimine-coated microspheres.

J Drug Target 2001; 9 (1): 15-22.

MECHL Z, KREJCI P.

Cis-diamminedichloroplatinum in the treatment of disseminated malignant melanoma.

Neoplasma 1983; 30 (3): 371-377.

MOCELLIN S, ROSSI CR, NITTI D.

Cancer vaccine development: on the way to break immune tolerance to malignant cells.

Exp Cell Res 2004; 299 (2): 267-278.

MORETTA A, BOTTINO C, VITALE M, PENDE D, CANTONI C, MINGARI MC, *et al.*

Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity.

Annu Rev Immunol 2001; 19: 197-223.

MOSMANN T.

Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.

J Immunol Methods 1983; 65 (1-2): 55-63.

**O :**

O'HAGAN DT, SINGH M.

Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems.

Expert Rev Vaccines 2003; 2 (2): 269-283.

O'HAGAN DT, SINGH M, DONG C, UGOZZOLI M, BERGER K, GLAZER E, *et al.*

Cationic microparticles are a potent delivery system for a HCV DNA vaccine.

Vaccine 2004; 23 (5): 672-680.

O'HAGAN DT, SINGH M, ULMER JB.

Microparticle-based technologies for vaccines.

Methods 2006; 40 (1): 10-19.

O'ROURKE MG, JOHNSON M, LANAGAN C, SEE J, YANG J, BELL JR, *et al.*

Durable complete clinical responses in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine.

Cancer Immunol Immunother 2003; 52 (6): 387-395.

ODOT J, ALBERT P, CARLIER A, TARPIN M, DEVY J, MADOULET C.

In vitro and in vivo anti-tumoral effect of curcumin against melanoma cells.

Int J Cancer 2004; 111 (3): 381-387.

OKAZAKI Y, FURUNO M, KASUKAWA T, ADACHI J, BONO H, KONDO S, *et al.*  
Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs.  
Nature 2002; 420 (6915): 563-573.

**P :**

PALMER KJ, HARRIES M, GORE ME, COLLINS MK.  
Interferon-alpha (IFN-alpha) stimulates anti-melanoma cytotoxic T lymphocyte (CTL) generation in mixed lymphocyte tumour cultures (MLTC).  
Clin Exp Immunol 2000; 119 (3): 412-418.

PALUCKA K, BANCHEREAU J.  
Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity.  
J Clin Immunol 1999; 19 (1): 12-25.

PARDOLL DM.  
Cancer vaccines.  
Nat Med 1998; 4 (5 Suppl): 525-531.

PARHAM P.  
Le système immunitaire.  
Paris: De Boeck; 2003.

PARMIANI G, CASTELLI C, DALERBA P, MORTARINI R, RIVOLTINI L, MARINCOLA FM, *et al.*  
Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going?  
J Natl Cancer Inst 2002; 94 (11): 805-818.

PETROVSKY N, AGUILAR JC.  
Vaccine adjuvants: current state and future trends.  
Immunol Cell Biol 2004; 82 (5): 488-496.

PETROVSKY N.  
Novel human polysaccharide adjuvants with dual Th1 and Th2 potentiating activity.  
Vaccine 2006; 24 Suppl 2: S2-26-29.

PIJPERS F, FAINT R, SAINI N.  
Therapeutic cancer vaccines.  
Nat Rev Drug Discov 2005; 4 (8): 623-624.

PIYASIRISILP S, HEMACHUDHA T.  
Neurological adverse events associated with vaccination.  
Curr Opin Neurol 2002; 15 (3): 333-338.

PLANT A, WILLIAMS NA.  
Modulation of the immune response by the cholera-like enterotoxins.  
Curr Top Med Chem 2004; 4 (5): 509-519.

PREHN RT.

Tumor immunogenicity: how far can it be pushed?

Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90 (10): 4332-4333.

PUTNEY SD, BURKE PA.

Improving protein therapeutics with sustained-release formulations.

Nat Biotechnol 1998; 16 (2): 153-157.

**Q :**

QUAGLIANA JM, STEPHENS RL, BAKER LH, COSTANZI JJ.

Vindesine in patients with metastatic malignant melanoma: a Southwest Oncology Group study.

J Clin Oncol 1984; 2 (4): 316-319.

**R :**

RAVI KUMAR MN, BAKOWSKY U, LEHR CM.

Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers.

Biomaterials 2004; 25 (10): 1771-1777.

REDDY ST, SWARTZ MA, HUBBELL JA.

Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines.

Trends Immunol 2006; 27 (12): 573-579.

RELYVELD EH, BIZZINI B, GUPTA RK.

Rational approaches to reduce adverse reactions in man to vaccines containing tetanus and diphtheria toxoids.

Vaccine 1998; 16 (9-10): 1016-1023.

RENKVIST N, CASTELLI C, ROBBINS PF, PARMIANI G.

A listing of human tumor antigens recognized by T cells.

Cancer Immunol Immunother 2001; 50 (1): 3-15.

RIBAS A, BUTTERFIELD LH, HU B, DISSETTE VB, CHEN AY, KOH A, *et al.*

Generation of T-cell immunity to a murine melanoma using MART-1-engineered dendritic cells.

J Immunother (1997) 2000; 23 (1): 59-66.

ROCK KL, ROTHSTEIN L, GAMBLE S, FLEISCHACKER C.

Characterization of antigen-presenting cells that present exogenous antigens in association with class I MHC molecules.

J Immunol 1993; 150 (2): 438-446.

ROMERO P, GERVOIS N, SCHNEIDER J, ESCOBAR P, VALMORI D, PANNETIER C, *et al.*

Cytolytic T lymphocyte recognition of the immunodominant HLA-A\*0201-restricted Melan-A/MART-1 antigenic peptide in melanoma.

J Immunol 1997; 159 (5): 2366-2374.

ROSENBERG SA, YANNELLI JR, YANG JC, TOPALIAN SL, SCHWARTZENTRUBER DJ, WEBER JS, *et al.*

Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2.

J Natl Cancer Inst 1994; 86 (15): 1159-1166.

RYDELL N, STERTMAN L, SJOHOLM I.

Starch microparticles as vaccine adjuvant.

Expert Opin Drug Deliv 2005; 2 (5): 807-828.

S :

SALGALLER ML, AFSHAR A, MARINCOLA FM, RIVOLTINI L, KAWAKAMI Y, ROSENBERG SA.

Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by peripheral blood lymphocytes stimulated in vitro with synthetic peptides.

Cancer Res 1995; 55 (21): 4972-4979.

SANDERSON K, SCOTLAND R, LEE P, LIU D, GROSHEN S, SNIVELY J, *et al.*

Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 monoclonal antibody with multiple melanoma peptides and Montanide ISA 51 for patients with resected stages III and IV melanoma.

J Clin Oncol 2005; 23 (4): 741-750.

SCHIJNS VE.

Immunological concepts of vaccine adjuvant activity.

Curr Opin Immunol 2000; 12 (4): 456-463.

SCHUMACHER R, AMACKER M, NEUHAUS D, ROSENTHAL R, GROEPER C, HEBERER M, *et al.*

Efficient induction of tumoricidal cytotoxic T lymphocytes by HLA-A0201 restricted, melanoma associated, L(27)Melan-A/MART-1(26-35) peptide encapsulated into virosomes in vitro.

Vaccine 2005; 23 (48-49): 5572-5582.

SHAKWEH M, BESNARD M, NICOLAS V, FATTAL E.

Poly (lactide-co-glycolide) particles of different physicochemical properties and their uptake by peyer's patches in mice.

Eur J Pharm Biopharm 2005; 61 (1-2): 1-13.

SHRESTA S, PHAM CT, THOMAS DA, GRAUBERT TA, LEY TJ.

How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?

Curr Opin Immunol 1998; 10 (5): 581-587.

SINGH M, BRIONES M, OTT G, O'HAGAN D.

Cationic microparticles: A potent delivery system for DNA vaccines.

Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97 (2): 811-816.

SINGH M, OTT G, KAZAZ J, UGOZZOLI M, BRIONES M, DONNELLY J, *et al.*

Cationic microparticles are an effective delivery system for immune stimulatory cpG DNA.

Pharm Res 2001; 18 (10): 1476-1479.

- SINGH M, O'HAGAN DT.  
Recent advances in vaccine adjuvants.  
Pharm Res 2002; 19 (6): 715-728.
- SINGH M, KAZZAZ J, UGOZZOLI M, MALYALA P, CHESKO J, O'HAGAN DT.  
Polylactide-co-glycolide microparticles with surface adsorbed antigens as vaccine delivery systems.  
Curr Drug Deliv 2006; 3 (1): 115-120.
- SINHA VR, TREHAN A.  
Biodegradable microspheres for protein delivery.  
J Control Release 2003; 90 (3): 261-280.
- SMYTH MJ, O'CONNOR MD, TRAPANI JA.  
Granzymes: a variety of serine protease specificities encoded by genetically distinct subfamilies.  
J Leukoc Biol 1996; 60 (5): 555-562.
- SMYTH MJ, GODFREY DI, TRAPANI JA.  
A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy.  
Nat Immunol 2001; 2 (4): 293-299.
- SOKOLOVSKA A, HEM SL, HOGENESCH H.  
Activation of dendritic cells and induction of CD4(+) T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants.  
Vaccine 2007; 25 (23): 4575-4585.
- SONDAK VK, SOSMAN JA.  
Results of clinical trials with an allogenic melanoma tumor cell lysate vaccine: Melacine.  
Semin Cancer Biol 2003; 13 (6): 409-415.
- SOSMAN JA, SONDAK VK.  
Melacine: an allogeneic melanoma tumor cell lysate vaccine.  
Expert Rev Vaccines 2003; 2 (3): 353-368.
- SPANER DE, ASTSATUROV I, VOGEL T, PETRELLA T, ELIAS I, BURDETT-RADOUX S, *et al.*  
Enhanced viral and tumor immunity with intranodal injection of canary pox viruses expressing the melanoma antigen, gp100.  
Cancer 2006; 106 (4): 890-899.
- STALDER T, HAHN S, ERB P.  
Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity.  
J Immunol 1994; 152 (3): 1127-1133.
- STERTMAN L, LUNDGREN E, SJOHOLM I.  
Starch microparticles as a vaccine adjuvant: only uptake in Peyer's patches decides the profile of the immune response.  
Vaccine 2006; 24 (17): 3661-3668.

STREET SE, HAYAKAWA Y, ZHAN Y, LEW AM, MACGREGOR D, JAMIESON AM, *et al.*

Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells.

J Exp Med 2004; 199 (6): 879-884.

**T :**

THIELE L, MERKLE HP, WALTER E.

Phagocytosis of synthetic particulate vaccine delivery systems to program dendritic cells.

Expert Rev Vaccines 2002; 1 (2): 215-226.

THYRELL L, ERICKSON S, ZHIVOTOVSKY B, POKROVSKAJA K, SANGFELT O, CASTRO J, *et al.*

Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells.

Oncogene 2002; 21 (8): 1251-1262.

TIRELLI U, BERNARDI D, SPINA M, VACCHER E.

AIDS-related tumors: integrating antiviral and anticancer therapy.

Crit Rev Oncol Hematol 2002; 41 (3): 299-315.

TIWARI R, GELIEBTER J, LUCCHESI A, MITTELMAN A, KANDUC D.

Computational peptide dissection of Melan-a/MART-1 oncoprotein antigenicity.

Peptides 2004; 25 (11): 1865-1871.

TOES RE, OSSENDORP F, OFFRINGA R, MELIEF CJ.

CD4 T cells and their role in antitumor immune responses.

J Exp Med 1999; 189 (5): 753-756.

TRINCHIERI G.

Biology of natural killer cells.

Adv Immunol 1989; 47: 187-376.

**V :**

VALTULINI S, MACCHI C, BALLANTI P, CHEREL Y, LAVAL A, THEAKER JM, *et al.*

Aluminium hydroxide-induced granulomas in pigs.

Vaccine 2005; 23 (30): 3999-4004.

VAN DEN EYNDE B, LETHE B, VAN PEL A, DE PLAEN E, BOON T.

The gene coding for a major tumor rejection antigen of tumor P815 is identical to the normal gene of syngeneic DBA/2 mice.

J Exp Med 1991; 173 (6): 1373-1384.

VAN DER BRUGGEN P, TRAVERSARI C, CHOMEZ P, LURQUIN C, DE PLAEN E, VAN DEN EYNDE B, *et al.*

A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma.

Science 1991; 254 (5038): 1643-1647.

VERMOUT S, DENIS M, LOSSON B, MIGNON B.

Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination.

Ann. Méd. Vét. 2003; 147: 393-401.

VON MARSCHALL Z, SCHOLZ A, CRAMER T, SCHAFFER G, SCHIRNER M, OBERG K, *et al.*

Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis.

J Natl Cancer Inst 2003; 95 (6): 437-448.

VON MENSCHDORFF-POUILLY S, VERSTRAETEN AA, KENEMANS P, SNIJDEWINT FG, KOK A, VAN KAMP GJ, *et al.*

Survival in early breast cancer patients is favorably influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin.

J Clin Oncol 2000; 18 (3): 574-583.

## **W :**

WAECKERLE-MEN Y, GROETTRUP M.

PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines.

Adv Drug Deliv Rev 2005; 57 (3): 475-482.

WAGNER DE, RAMIREZ G, WEISS AJ, HILL G, JR.

Combination phase I-II study of imidazole carboxamide (NCS45388).

Oncology 1972; 26 (2): 310-316.

WALTER E, DREHER D, KOK M, THIELE L, KIAMA SG, GEHR P, *et al.*

Hydrophilic poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres for the delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells.

J Control Release 2001; 76 (1-2): 149-168.

WAN CP, PARK CS, LAU BH.

A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay.

J Immunol Methods 1993; 162 (1): 1-7.

WARREN TL, DAHLE CE, WEINER GJ.

CpG oligodeoxynucleotides enhance monoclonal antibody therapy of a murine lymphoma.

Clin Lymphoma 2000; 1 (1): 57-61.

WISCHKE C, BORCHERT HH, ZIMMERMANN J, SIEBENBRODT I, LORENZEN DR.

Stable cationic microparticles for enhanced model antigen delivery to dendritic cells.

J Control Release 2006; 114 (3): 359-368.

WOLFEL T, VAN PEL A, BRICHARD V, SCHNEIDER J, SELIGER B, MEYER ZUM BUSCHENFELDE KH, *et al.*

Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes.

Eur J Immunol 1994; 24 (3): 759-764.

WUSTROW TP, ZENNER HP.

Natural killer cell activity in patients with carcinoma of the larynx and hypopharynx.

Laryngoscope 1985; 95 (11): 1391-1400.

**Y :**

YIN CC, JONES D.

Molecular approaches towards characterization, monitoring and targeting of viral-associated hematological malignancies.

Expert Rev Mol Diagn 2006; 6 (6): 831-841.

**Z :**

ZAROOR HM, KIRKWOOD JM, KIERSTEAD LS, HERR W, BRUSIC V, SLINGLUFF CL, JR., *et al.*

Melan-A/MART-1(51-73) represents an immunogenic HLA-DR4-restricted epitope recognized by melanoma-reactive CD4(+) T cells.

Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97 (1): 400-405.

ZENG G, TOULOUKIAN CE, WANG X, RESTIFO NP, ROSENBERG SA, WANG RF.

Identification of CD4+ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by HLA-DR molecules.

J Immunol 2000; 165 (2): 1153-1159.

ZITVOGEL L, TESNIERE A, KROEMER G.

Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion.

Nat Rev Immunol 2006; 6 (10): 715-727.

## Hydroxyethylstarch microcapsules: A preliminary study for tumor immunotherapy application

J. Devy<sup>a,b</sup>, E. Balasse<sup>b</sup>, H. Kaplan<sup>b</sup>, C. Madoulet<sup>b</sup>, M.-C. Andry<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratoire de Pharmacotechnie, FRE CNRS 2715, IFR53, Faculté de Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France*

<sup>b</sup> *Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, EA 3796-IPCM, IFR53 Faculté de Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France*

Received 11 September 2005; accepted 30 September 2005

Available online 28 November 2005

### Abstract

The objective of this work was to prepare microcapsules which would allow protection and slow release of antigens used for melanoma immunotherapy treatment. Hydroxyethylstarch (HES) microcapsules were prepared using interfacial cross-linking with terephthaloyl chloride (TC). They were characterized with respect to morphology (microscopy) and size (in the 4–15  $\mu\text{m}$  range). Bovine serum albumin (BSA) was used as model protein for loading and release studies. Microcapsules were loaded with solutions at different protein concentrations (0.5–5%). The maximum loading efficiency (20%) was observed with the concentration of 2.5%, which allowed a loading capacity near 100%. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) visualization showed that BSA was entrapped within the microcapsules and not only associated to their outer surface. BSA-release studies showed a 20% BSA release within 30 min while 80% remained entrapped in the microcapsules for 4 days. Microcapsules were degraded by  $\alpha$ -amylase and addition of esterase to  $\alpha$ -amylase enhanced slightly their degradation. In vitro studies on melanoma cells showed that HES microcapsules were non-toxic. Preliminary in vivo studies demonstrated that microcapsules were biodegradable after intraperitoneal injection (i.p.). The observation of peritoneal wash showed a complete degradation within 7 days, indicating a possible application as an in vivo drug delivery system especially to enhance the presentation of antigens.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Hydroxyethylstarch; Biodegradable microcapsules; Confocal microscopy; Loading efficiency; Cytotoxicity; Enzymatic degradation

### 1. Introduction

The relative resistance of melanoma cells to chemotherapy has led to search for alternative treatment options, including immunotherapy (Komenaka et al., 2004). This technique involves the treatment of cancer through manipulation of the immune system (Pardoll, 1998; Nawrocki and Mackiewicz, 1999; Vasey, 2000; Hoffman et al., 2000; Jager et al., 2001). Such an approach needs an appropriate presentation of tumor-specific antigens (Thumann et al., 2003). The use of biodegradable, polymeric systems for tumor immunotherapy has received limited consideration as compared to more conventional cell-based approaches (Golumbek et al., 1993; Egilmez et al., 2000; Kuriakose et al., 2000; Denis-Mize et al., 2000). Microparticulate antigen delivery systems are of special interest as stable

carriers and effective adjuvants for the delivery of vaccines (Thomasin et al., 1996; Raychaudhuri and Rock, 1998; Strindelius et al., 2002). Attraction is based on different advantages, such as the enhancement of drug stability and the controlled drug release (Pappo et al., 1991; Eldridge et al., 1991; Degling and Stjärnkvist, 1995; Men et al., 1996; Putney and Burke, 1998). We focused our attention on the development of such devices to enhance the presentation of antigens in immunotherapy. Starch-based microparticles are suitable carriers for protein delivery systems due to their biocompatibility, shelf-life stability, high loading capacity, biodegradability, and controlled release of the encapsulated drug (Laakso et al., 1987; Heritage et al., 1996; Larionova et al., 1999; Sturesson and Wikingsson, 2000). Native starch may not be appropriate to prepare parenteral controlled drug delivery systems, since it is rapidly degraded in vivo and many drugs are released too quickly from such unmodified starch systems (Henrist et al., 1999; Pereswetoff-Morath, 1998; Michailova et al., 2001). In contrast, hydroxyethylstarch (HES) is a less quickly degraded

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 26 91 37 22; fax: +33 3 26 91 37 44.  
E-mail address: [mc.andry@univ-reims.fr](mailto:mc.andry@univ-reims.fr) (M.-C. Andry).

starch derivative, widely used for therapy and prophylaxis of all kinds of volume deficiencies. Because of its major attractions including biocompatibility and biodegradation properties, HES was chosen for the production of microcapsules intended to further vectorization *in vivo*. Moreover, we have previously shown that HES leads to stable microparticles by interfacial cross-linking (Levy and Andry, 1990). These HES microparticles had never been used for the encapsulation of large molecules like proteins and they had never been tested *in vivo*. So different studies were realised to characterize these particles. The morphology and the size of HES microparticles were evaluated using light microscopy, confocal laser scanning microscopy (CLSM), scanning electron microscopy (SEM) and laser diffraction granulometry. Loading and release characteristics were investigated with a model protein: bovine serum albumin (BSA). Degradation was evaluated *in vitro* in presence of amylase and esterase. Furthermore, cytotoxicity studies on melanoma cell line, and *in vivo* biodegradation were evaluated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Hydroxyethylstarch (Voluven<sup>®</sup>) was purchased from Fresenius Kabi (Sèvres, France) and terephthaloyl chloride from Acros Organics. Esterase (19 IU/mg) from porcine liver,  $\alpha$ -amylase (19.5 IU/mg) from porcine pancreas and bovine serum albumin were from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). Chloroform, cyclohexane and ethanol, were of analytical grade and provided by SDS (Peypin, France). Texas red labeled BSA was purchased from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Surfactants were polysorbate (Tween<sup>®</sup> 20) and sorbitan trioleate (Span<sup>®</sup> 85) from Seppic (Paris, France). Methylene Blue and fluoresceinamine were from Fluka (St. Quentin Fallavier, France).

### 2.2. Preparation of HES microparticles

Microcapsules were prepared by the interfacial cross-linking method according to our protocol (Levy and Andry, 1990). Briefly, a 20% (w/v) HES solution was prepared in carbonate buffer pH 9.8. This aqueous phase (6 ml) was emulsified under mechanical agitation (5000 rpm) in cyclohexane (30 ml) containing 5% (v/v) Span<sup>®</sup> 85. After 5 min, 40 ml of a 5% (w/v) solution of terephthaloyl chloride in chloroform/cyclohexane (1/4, v/v) were added to the emulsion and stirring was prolonged for 30 min. The reaction was stopped by dilution with 40 ml of chloroform/cyclohexane (1/4, v/v). Then, microparticles were washed with cyclohexane (4 $\times$ ), with ethanol 95% (v/v) containing 2% (v/v) Tween<sup>®</sup> 20 (1 $\times$ ), then with ethanol 95% (v/v) (2 $\times$ ) and with water (4 $\times$ ). Finally, microcapsules were re-suspended in water and lyophilized.

### 2.3. Microparticles characterization

#### 2.3.1. Morphology and size

Light microscopy (Olympus BH-2, Olympus, Shibuya-Ku, Tokyo, Japan) was performed for initial visualization of the

HES microcapsules. Further morphology studies were carried out by means of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and scanning electron microscopy (SEM). For CLSM study, fluorescent microparticles were prepared by incorporating 30 mg of fluoresceinamine in the HES solution before the emulsification step. A Bio-Rad MRC 1024 system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mounted on Olympus IX70 Axioplan optical microscope (Olympus, Shibuya-Ku, Tokyo, Japan) was used. All acquisitions were made using UPlan FI $\times$ 63, 1.4 numerical aperture objective. Acquisitions were performed by exciting fluoresceinamine with the 488-nm line of an air-cooled argon ion laser. Eighty sections per microparticle were recorded with a 0.30- $\mu$ m z-step to collect the whole volume with a sufficient z-sampling. Files were then transferred to a Sun Sparc 20 workstation (Sun Microsystems, Mountain View, CA, USA) for further processing.

For SEM, lyophilized microparticles were deposited on double-faced adhesive and coated with palladium/gold before observation. Samples were observed under a scanning electron microscope (JEOL 5400 LV) (JEOL, Schiphol, The Netherlands) at 15 kV to study the shape and surface morphology.

The samples for Fourier transform-infrared (FT-IR) study were prepared according to the standard technique: 1 mg of lyophilized microcapsules or HES was ground with 190 mg of KBr. The mixture was compressed in tablets, 1 mm thick, under a pressure of 10 kPa. FT-IR spectra were obtained from a Perkin-Elmer Spectrum BXII spectrometer (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France).

Particles were sized by a laser diffraction technique (Coulter Particle Sizer, type LS 200, Coultronics, France). Size distribution was displayed in terms of volume versus particle size.

#### 2.3.2. Enzymatic degradation of HES microparticles

Lyophilized microcapsules (10 mg) were suspended in 5 ml phosphate buffer (20 mM sodium phosphate, 6 mM NaCl, pH 7) containing either  $\alpha$ -amylase (19.5 IU/ml), esterase (19 IU/ml) or a mixture of both enzymes. The samples were incubated under shaking at 37 °C. The microparticle morphology was observed by light microscopy and the concentration was evaluated on Malassez cell in aliquots withdrawn at appropriate time intervals.

#### 2.3.3. Bovine serum albumin loading

The BSA loading of microparticles was obtained by incubating 5 mg of HES microparticles in 1 ml of a 0.5–5% (w/v) BSA solution in phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4. Tubes were incubated 3 h under shaking at 37 °C. Then, they were centrifuged (1400 rpm for 30 min) to remove the unloaded BSA. The unloaded BSA in the supernatant was quantified with the Bradford protein assay method (Bradford, 1976). Loading efficiency (LE) was determined as:  $LE = [(total\ amount\ of\ BSA) - (unloaded\ BSA)] / total\ amount\ of\ BSA$  (Van der Lubben et al., 2001).

CLSM was used to demonstrate effective BSA loading. Microparticles were incubated with a 2.5% Texas red labeled-BSA solution (Molecular Probes, Invitrogen) as afore-

mentioned. Acquisitions were performed by exciting with the 568 nm line of an air-cooled krypton/argon ion laser.

#### 2.3.4. Bovine serum albumin release

For BSA release, 5 mg of microparticles were loaded as previously described. After centrifugation, loaded microcapsules were re-suspended in PBS pH 7.4 to make a 1% (w/v) microparticles suspension. Samples were incubated under gentle shaking at 37 °C during 30, 60, 90, 120, 180 and 240 min, 24 and 48 h and 4 days (one tube for each time). The tubes were given a spin-off and unbound BSA present in the supernatant was determined with the Bradford protein assay method (Bradford, 1976).

#### 2.4. Cell and culture conditions

A murine melanoma cell subline, denoted B16-R, resistant to  $3.5 \times 10^{-7}$  M doxorubicin, derived from the ATCC stock was isolated at the National Tumor Institute in Milan (Mariani and Supino, 1990) by stepwise selection in increasing concentrations of doxorubicin. B16-R cells were grown in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C, in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (Invitrogen). To generate spheroids, exponentially monolayer growing B16-R cells were detached by trypsinization and 100 µl culture medium containing  $50 \times 10^3$  cells were added to each well of a 96-well microplate, previously coated with 40 µl 1.33% agarose (Sigma). Microplates were placed on a 3-D stirring machine (Polymax 1040, Heidolph, Germany) for overnight incubation. After 3 days at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, the medium was changed and the cytotoxicity assays could be initiated.

#### 2.5. Microparticle cytotoxicity

A MTT (Sigma) colorimetric assay was performed. Cell viability was determined by measuring the optical density differences between 550 and 650 nm using the 550 microplate reader model (Bio-rad, Marnes la Coquette, France). The cell surviving fraction was determined by dividing the mean absorbance values of treated samples by the mean absorbance of untreated control samples.

#### 2.6. Animals

Female B6D2F1 mice (6-week-old) were obtained from Charles River Laboratories (Iffa Credo, L'Arbresle, France) and housed at the maintenance facility of the School of Pharmacy of Reims. All experiments were carried out in compliance with the regulations of the Animal Care and Use at the School of Pharmacy of Reims.

#### 2.7. In vivo biodegradation studies

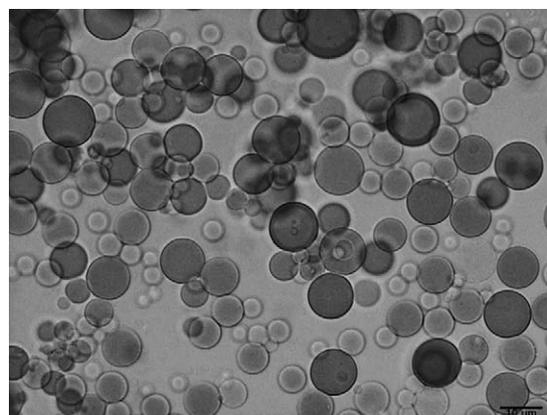
Blank lyophilized microparticles (5 mg) were re-suspended in 200 µl of sterile physiological saline (a 0.9% NaCl (w/v) aqueous solution) and incubated at 37 °C with permanent shaking until adequate re-swelling. Then the microparticle suspension

was administered by intraperitoneal injection (i.p.) on a group of 21 female B6D2F1 mice. Daily, three mice were sacrificed, the intraperitoneal cavity was washed twice with 10 ml of physiological saline and the microparticle degradation was assessed by light microscopy.

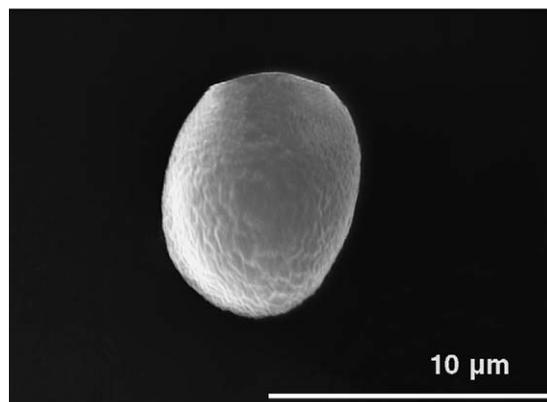
### 3. Results and discussion

#### 3.1. Morphology and size of microparticles

The morphology of the microparticles prepared from a 20% (w/v) HES solution with 5% (w/v) terephthaloyl chloride concentration was analyzed by light microscopy after suspension in water and staining with Methylene Blue. They appeared transparent, spherical and well individualised (Fig. 1a). The size of these HES microparticles was found to range from 4 to 15 µm with an average of  $8.3 \pm 1.9$  µm. Microcapsule lyophilization gave white and free-flowing powders. Moreover, the particles were intact and easily recovered their spherical shape after re-hydration in aqueous solutions. These particles exhibited a continuous and smooth surface, as shown by scanning electron microscopy (Fig. 1b). Three-dimensional reconstruction of the microparticles, using CLSM, allowed us to visualize a cross-section and perfectly illustrated that particles were hollow spheres with a concave membrane (Fig. 2a).

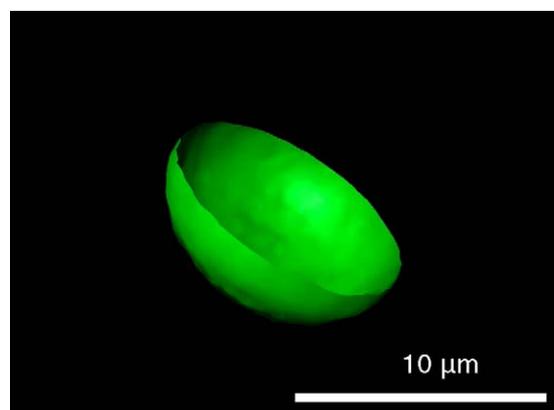


(a)

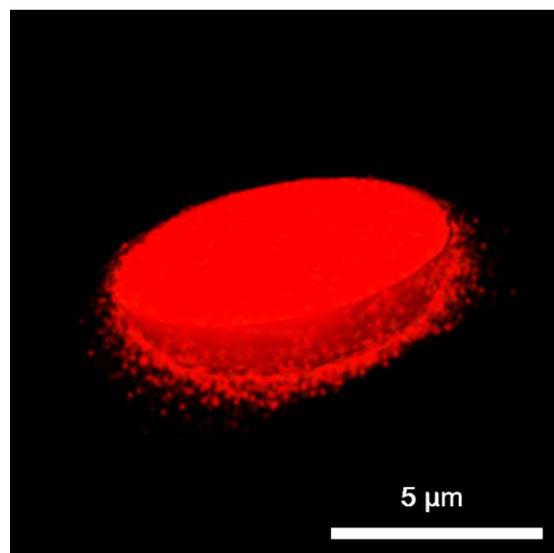


(b)

Fig. 1. HES microparticles: (a) optical photomicrograph (scale bar = 10 µm) and (b) SEM (scale bar = 10 µm).



(a)



(b)

Fig. 2. Three-dimension reconstruction of the maximum projection from  $z$ -series ( $n = 80$ ) of confocal fluorescent image of optical section of single microcapsule: (a) labeled with fluoresceinamin; scale bar =  $10 \mu\text{m}$  and (b) loaded with BSA-Texas red (2.5%); scale bar =  $5 \mu\text{m}$  (all sections were recorded using magnification  $\times 63$  and zoom  $3\times$ ).

The IR spectra of the microcapsules were compared with the spectrum of original HES in Fig. 3. As it was expected with our previous studies (Andry et al., 1998), the main modifications on microcapsules spectra were two bands at  $1717$  and  $1277 \text{ cm}^{-1}$ , which reflected the formation of esters bonds from hydroxy groups of HES.

### 3.2. *In vitro* degradation of HES microparticles

Degradation by various enzyme solutions was studied: esterase,  $\alpha$ -amylase or both enzymes. Esterase usually allows the disruption of ester bonds involved in the microparticles wall formation and  $\alpha$ -amylase is the enzyme which degrades starch and derivatives like HES. The enzyme concentration used in these assays were the same that allowed the degradation of particles prepared by cross-linking of soluble starch with terephthaloyl chloride (Larionova et al., 1999). We observed that the microcapsules were resistant to digestion by the esterase solution ( $19 \text{ IU/ml}$ ). However,  $\alpha$ -amylase ( $19.5 \text{ IU/ml}$ ) exhibited a

progressive degradation activity: 10% of microcapsules were degraded after 2 h and 50% after 24 h. Addition of esterase ( $19 \text{ IU/ml}$ ) to  $\alpha$ -amylase enhanced slightly the rate of microcapsules degradation; after incubation times of 6 and 24 h, the degradation of microcapsules (%) were, respectively, 40% versus 50% and 50% versus 70% with amylase alone versus both enzymes (Table 1). The same observation was performed for microcapsules prepared with soluble starch (Larionova et al., 1999). This phenomenon is to link with the esterase activity which is only possible after partial degradation of HES by amylase.

### 3.3. Bovine serum albumin loading efficiencies of HES microparticles

Five milligram of HES microcapsules were suspended in 1 ml of BSA solution in PBS pH 7.4 (5 mg will be the quantity of microcapsules used for further *in vivo* tests). Loading efficiency was determined with 0.5–5% (w/v) BSA solutions. Fig. 4 shows that the LE presented a maximum value for the concentration of 2.5% (w/v). The obtained loading efficiency was  $19.64 \pm 0.48\%$  ( $n = 5$ ) for independently prepared batches. Therefore, 2.5% (w/v) BSA in the loading solution was selected as the optimal concentration. Under these conditions, the loading capacity value ( $\text{LC} = [\text{loaded BSA}/\text{weight microcapsules}] \times 100$ ) was  $98.2 \pm 2.4\%$ . With CLSM studies, it was possible to visualize both the inside and the surface of the Texas red labeled particles. Results obtained with this technique showed that BSA was not only associated to the surface, but also entered within the HES microcapsules (Fig. 2b). The repartition of BSA was homogeneous in the microcapsule and did not present aggregates. These particles, with a thin wall allowed the encapsulation of an important amount of protein in their cavity. While microspheres in the same range of size allow a smaller albumin loading, near 40% (Van der Lubben et al., 2001). This high loading capacity is a good point for further uses since large amount of protein was encapsulated in a minimal amount of polymer. This reduces the mass of the material to be administered (Sinha and Thehan, 2003). Moreover, HES microcapsules loading does not require a coupling reaction as it has to be done with polyacryl starch microparticles (Degling and Stjärnkvist, 1995).

### 3.4. BSA release from HES microparticles

BSA release from HES microparticles re-suspended in PBS pH 7.4 was determined after 30, 60, 90, 120, 180 and 240 min, 24 and 48 h and 4 days. After an initial release of 20% during the first 30 min, no BSA was released for the following 4 days. These results indicated that 80% of the BSA remained entrapped in the microcapsules under these conditions. These results are to be correlated with those obtained by Van der Lubben et al. (2001); chitosan microparticles (in the same range of size) loaded with ovalbumin allowed a release of about 10% of the loaded protein. So, an important part of albumin will only be released after complete degradation of the HES microcapsules since they are degradable. The protein is likely to be protected within the particle and this would allow a progressive release *in vivo*.

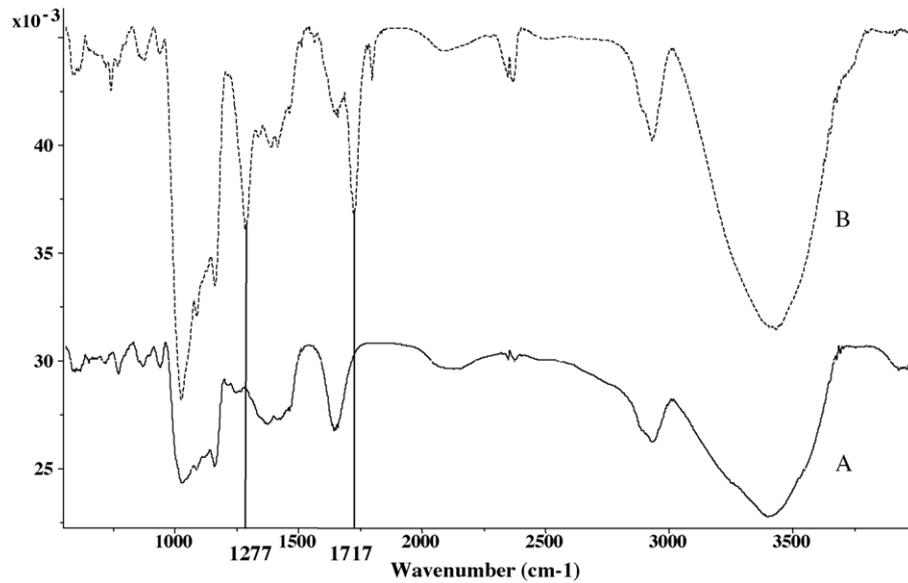


Fig. 3. FT-IR spectra: (A) original HES and (B) hydroxyethylstarch microcapsules.

Table 1  
Degradation of microcapsules in presence or absence of enzymes as a function of enzymatic incubation time; percentage of degraded microcapsules counted on a Malassez cell

Incubation time (h)	Without enzymes (%)	Amylase (19.5 IU/ml) (%)	Esterase (19 IU/ml) (%)	Amylase + Esterase (19.5 IU/ml + 19 IU/ml) (%)
2	–	10 ± 2	–	10 ± 2
4	–	35 ± 3	–	35 ± 3
6	–	40 ± 4	–	50 ± 4
24	–	50 ± 5	–	70 ± 5

Results are the mean of three determinations ± S.D.

### 3.5. *In vitro* studies of HES microcapsules cytotoxicity on B16-R melanoma cells

The microcapsules cytotoxicity was tested on the B16-R melanoma cell line, resistant to doxorubicin, cultivated in monolayers or as tri-dimensional models. One milliliter of microcapsule suspension was added in each well of a 96-well microplate, each filled with 100 µl of suspension containing  $50 \times 10^3$  cells. Results (Table 2) show that microcapsules, in the concentration

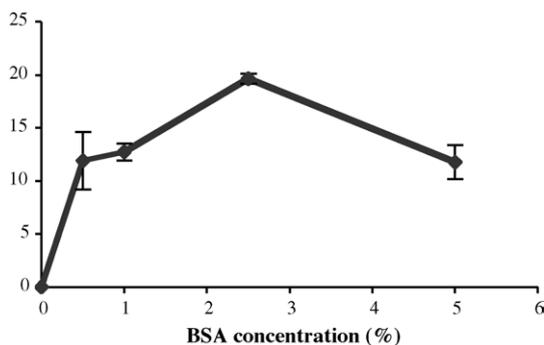


Fig. 4. The influence of BSA initial concentration on loading efficiency of HES microcapsules. Data are expressed as mean ± S.D. of five experiments.

range of 0.1–1 mg/ml, did not exhibit a significant cytotoxicity against this cell line after 72 h (all values <10%,  $n = 9$ ).

### 3.6. *In vivo* biodegradation studies

Administration by intraperitoneal route was used because in our future experiments, microcapsules loaded with antigens will be injected by this route since it was shown that it is a particularly effective route for stimulating immune responses (Degling and Stjärnkvist, 1995; Cleland, 1999).

In a preliminary assay, HES microcapsules (5 mg) were re-suspended in 200 µl of sterile physiological saline and injected intraperitoneally in two groups of three female B6D2F1 mice.

Table 2  
Growth inhibition of B16-R melanoma cells cultured in monolayers or in spheroids ( $50 \times 10^3$  cells/100 µl), incubated with different concentrations of microparticles (mg/ml) after a 72 h incubation time

	Microcapsules (mg/ml)					
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.8	1
Growth inhibition (%)						
B16-R monolayers	0.5 ± 1	1 ± 1	3 ± 1	5 ± 1	7 ± 1	8 ± 1
B16-R spheroids	0	0	3 ± 1	5 ± 1	6 ± 1	7 ± 1

Results are given as means ± S.D. ( $n = 9$ ).

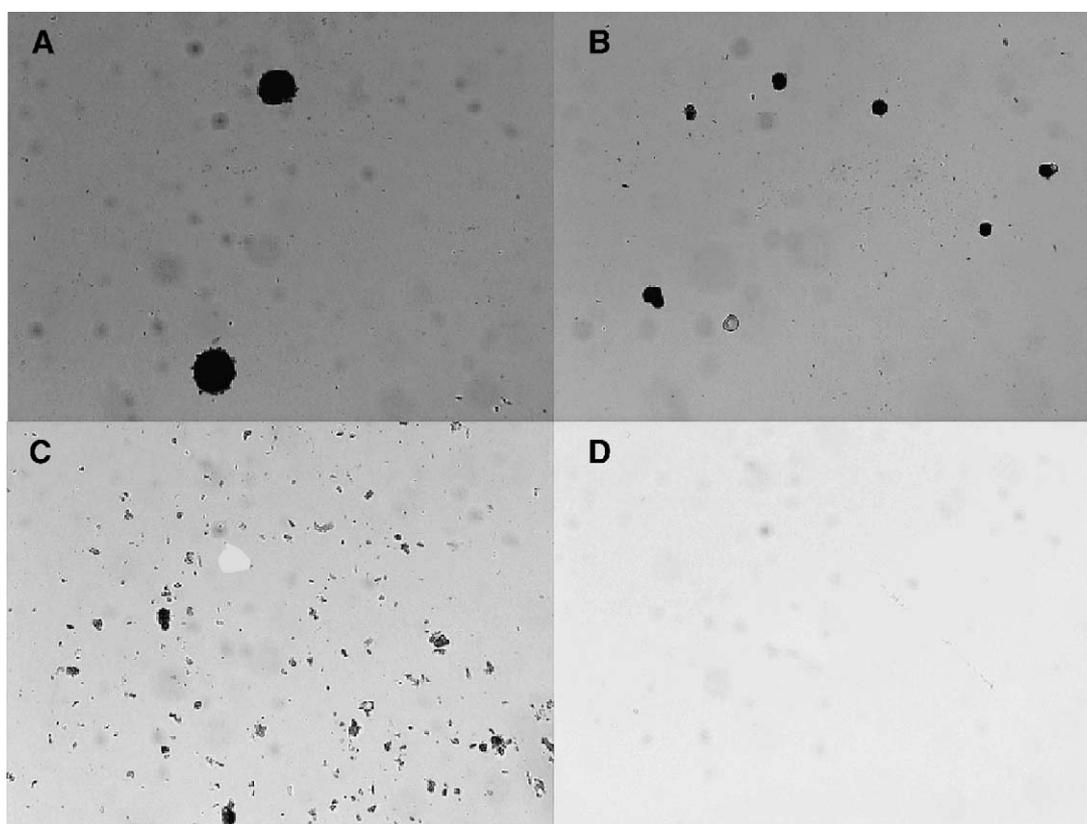


Fig. 5. Optical photomicrographs of intraperitoneal cavity washings after injection of HES microcapsules in female B6D2F1 mice: day 1 (A), day 3 (B), day 5 (C) and day 7 after injection (D); magnification  $\times 40$ .

Animals were followed for 3 weeks and no inflammatory signs could be observed. The microcapsules seemed subsequently well-tolerated.

Then, the *in vivo* degradation study was realized: microcapsules were injected *i.p.* to 21 mice, and each day one group of three mice was sacrificed to evaluate microcapsules degradation by light microscopy (Fig. 5). The day after administration, the microcapsules stained with Methylene Blue presented a lesser smooth surface (Fig. 5A). Three days later, the microcapsules were cracked (Fig. 5B) and at day 5, only some small fragments could be visualized (Fig. 5C). Seven days after the injection, nothing remained observable, which meant that the totality of microcapsules was degraded within a week (Fig. 5D). After *i.p.* administration, a depot of microcapsules was formed at the injection site which could increase the immune response comparable with the effect seen with other depot adjuvants (Sinha and Thehan, 2003). This interesting result showed that HES microcapsules prepared by interfacial cross-linking could be used to allow a slow release of loaded protein (e.g. antigens); most of the associated protein would only be released after biodegradation of the HES microcapsules.

#### 4. Conclusion

The aim of this work was to study HES microcapsules for future *in vivo* applications. This study demonstrated that these microcapsules showed an important loading capacity for the model protein BSA. CLSM analyses fully demonstrated that

the loaded BSA was present at the surface as well as entrapped inside the microparticles. Furthermore, a significant part of BSA (80%) was left to be released after complete degradation of the microparticles. From BSA loading experiments and the *in vivo* degradation profile of HES microparticles, we could deduce that high amounts of the model protein are expected to be released with a suitable controlled release profile. Moreover, both the absence of cytotoxicity and the observed microparticles tolerance reinforce the suitable *in vitro* and *in vivo* characteristics for drug delivery especially to enhance the presentation of antigens. The HES microparticles are currently under further investigations in order to increase immune response against melanoma resistant cancer cells after loading with soluble melanoma proteins.

#### Acknowledgements

We would like to thank Dr. Daniel Royer of the FRE/CNRS 2715 for his help during FT-IR experiments and V.G. Roullin of the FRE/CNRS 2715 for stimulating discussions. The “Association de la Recherche contre le Cancer” is thanked for financial support.

#### References

- Andry, M.C., Vezin, H., Duminstracel, I., Bernier, J.L., Levy, M.C., 1998. Proanthocyanidin microcapsules: preparation, properties and free radical scavenging activity. *Int. J. Pharm.* 171, 217–226.

- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cleland, J.L., 1999. Single administration vaccine: controlled release technology to mimic repeated immunisations. *Trends Biotechnol.* 17, 25–29.
- Degling, L., Stjärnkvist, P., 1995. Biodegradable microspheres XVIII: the adjuvant effect of polyacryl starch microparticles with conjugated human serum albumin. *Vaccine* 13, 629–636.
- Denis-Mize, K.S., Dupuis, M., MacKichan, M.L., Singh, M., Doe, B., O'Hagan, D., Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., McDonald, D.M., Ott, G., 2000. Plasmid DNA absorbed onto cationic microparticles mediates target gene expression and antigen presentation by dendritic cells. *Gene Ther.* 7, 2105–2112.
- Egilmez, N.K., Jong, Y.S., Sabel, M.S., Jacob, J.S., Mathiowitz, E., Bankert, R.B., 2000. In situ tumor vaccination with interleukin-12 delivered by biodegradable microspheres: induction of tumor regression and potent antitumor immunity. *Cancer Res.* 60, 3832–3837.
- Eldridge, J.H., Staas, J.K., Meulbroeck, J.A., McGhee, J.R., Tice, T.R., Gilley, R.M., 1991. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Mol. Immunol.* 28, 287–294.
- Golumbek, P.T., Azhari, R., Jafee, E.M., Levitski, H.I., Lazenby, A., Leong, K., Pardoll, D.M., 1993. Controlled release, biodegradable cytokine depots: a new approach in cancer vaccine design. *Cancer Res.* 53, 5841–5844.
- Henrist, D., Lefebvre, R.A., Remon, J.P., 1999. Bioavailability of starch based hot stage extrusions formulations. *Int. J. Pharm.* 187, 185–191.
- Heritage, P.L., Loomes, L.M., Jianxiang, J., Brook, M.A., Underdown, B.J., McDermott, M.R., 1996. Novel polymer-grafted starch microparticles for mucosal delivery of vaccines. *Immunology* 68, 162–168.
- Hoffman, D.M., Gitlitz, B.J., Beldegrun, A., Figlin, R.A., 2000. Adoptive cellular therapy. *Semin. Oncol.* 27, 221–233.
- Jager, D., Jager, E., Knuth, A., 2001. Vaccination for malignant melanoma. *Oncology* 260, 1–7.
- Komenaka, I., Hoerig, H., Kaufman, H.L., 2004. Immunotherapy for melanoma. *Clin. Dermatol.* 22, 251–265.
- Kuriakose, M.A., Chen, F.A., Egilmez, N.K., Jong, Y.S., Mathiowitz, E., DeLacure, M.D., Hicks Jr., W.L., Loree, T.L., Bankert, R.B., 2000. Interleukin-12 delivered by biodegradable microspheres promotes the anti-tumor activity of human peripheral blood lymphocytes in a human head and neck tumor xenograft/SCID mouse model. *Head Neck* 22, 57–63.
- Laako, T., Stjärnkvist, P., Sjöholm, I., 1987. Biodegradable microspheres VI: lysosomal release of covalently bound antiparasitic drugs from starch microparticles. *J. Pharm. Sci.* 76, 185–194.
- Larionova, N.V., Ponchel, G., Duchene, D., Larionova, N.I., 1999. Biodegradable cross-linked starch/protein microcapsules containing proteinase inhibitor for oral administration. *Int. J. Pharm.* 189, 171–178.
- Levy, M.C., Andry, M.C., 1990. Microparticles prepared through interfacial cross-linking of starch derivatives. *Int. J. Pharm.* 62, 27–35.
- Mariani, M., Supino, R., 1990. Morphological alterations induced by doxorubicin in B16 melanoma cells. *Cancer Lett.* 51, 209–212.
- Men, Y., Gander, B., Merkle, H.P., Corradin, G., 1996. Induction of sustained and elevated immune responses to weakly immunogenic synthetic malarial peptides by encapsulation in biodegradable polymer microspheres. *Vaccine* 14, 1442–1450.
- Michailova, V., Titeva, St., Kotsilkova, R., Krusteva, E., Minkova, E., 2001. Influence of hydrogel structure on the presence of water penetration and drug release from mixed hydropropylmethyl cellulose/thermally pregelatinized waxy maize starch hydrophilic matrices. *Int. J. Pharm.* 222, 7–17.
- Nawrocki, S., Mackiewicz, A., 1999. Genetically modified tumour vaccines—where we are today. *Cancer Treat. Rev.* 25, 29–46.
- Pappo, J., Ermak, T.H., Steger, H.J., 1991. Monoclonal antibody-directed targeting of fluorescent polystyrene microspheres to Peyer's patch M cells. *Immunology* 73, 277–280.
- Pardoll, D.M., 1998. Cancer vaccines. *Nat. Med.* 4, 521–531.
- Pereswetoff-Morath, L., 1998. Microspheres as nasal drug delivery systems. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 29, 185–194.
- Putney, S.D., Burke, P.A., 1998. Improving protein therapeutics with sustained-release formulations. *Nat. Biotechnol.* 16, 153–157.
- Raychaudhuri, S., Rock, K.L., 1998. Fully mobilizing host defense: building better vaccines. *Nat. Biotechnol.* 16, 1025–1031.
- Sinha, V.R., Thehan, A., 2003. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J. Control. Release* 90, 261–280.
- Strindeli, L., Degling Wikingsson, L., Sjöholm, I., 2002. Extracellular antigens from *Salmonella enteridis* induce effective immune response in mice after oral vaccination. *Infect. Immun.* 70, 1434–1442.
- Sturesson, C., Wikingsson, L.D., 2000. Comparison of poly(acryl starch) and poly(lactide-co-glycoside) microspheres as drug delivery system for a rotavirus vaccine. *J. Control. Release* 68, 441–450.
- Thomasin, C., Corradin, G., Men, Y., Merkle, H.P., Gander, B., 1996. Tetanus toxoid and synthetic malaria antigen containing poly(lactide)/poly(lactide-co-glycolide) microspheres: importance of polymer degradation and antigen release for immune response. *J. Control. Release* 41, 131–145.
- Thumann, P., Moc, I., Humrich, J., Berger, T.G., Schultz, E.S., Schuler, G., Jenne, L., 2003. Antigen loading of dendritic cells with whole tumor cell preparations. *J. Immunol. Methods* 277, 1–16.
- Vasey, P.A., 2000. Immunotherapy for renal carcinoma: theoretical basis and current standard of care. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 50, 521–529.
- Van der Lubben, I.M., Verhoef, J.C., Van Aelst, A.C., Borchard, G., Junginger, H.E., 2001. Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary in vivo uptake studies in murine Peyer's patches. *Biomaterials* 22, 687–694.

## **Enhanced immune response induced by BSA loaded in hydroxyethylstarch microparticles**

Emilie Balasse<sup>a</sup>, Johann Odot<sup>a</sup>, Gregory Gatouillat<sup>a</sup>, Marie-Christine Andry<sup>b</sup>, Claudie Madoulet<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Biochemistry, EA 3796-IPCM, IFR53 Biomolecules, Faculty of Pharmacy, 51096 Reims Cedex, France, <sup>b</sup> Laboratory of Pharmacotechny, FRE CNRS 2715, IFR53 Biomolecules, Faculty of Pharmacy, 51096 Reims Cedex, France.

\* To whom correspondence should be addressed: Pr Claudie Madoulet, Laboratory of Biochemistry, EA 3796-IPCM, IFR53 Biomolecules, Faculty of Pharmacy, 51 rue Cognac-Jay, 51096 Reims Cedex, France.

Tél: +33 3 26 91 37 32. Fax: +33 3 26 91 37 30.

E-mail: [claudie.madoulet@univ-reims.fr](mailto:claudie.madoulet@univ-reims.fr)

**Keywords:** hydroxyethylstarch microparticles, vaccine adjuvant, Th1/Th2 response, immunization route.

## **Introduction**

Historically, vaccine design is a largely empirical process based on the use of attenuated microorganisms. However, the increasing emphasis for improved vaccine safety has led to the use of highly-purified products such as protein subunits or naked DNA. Although these compounds offer greater safety than live-attenuated or killed pathogens, they are poorly immunogenic when administered without adjuvants. Adjuvants were originally described as substances used in combination with a specific antigen that produced a more robust immune response than the antigen alone (Ramon, 1924; Sanchez et al., 1980; Vogel et al., 1995). Three kinds of the most frequently used adjuvants can be distinguished: (i) particulate, (ii) non particulate (such as saponins and lipid A) and (iii) combined adjuvant composition, each exerting a specific immune modulation (Lovgren-Bengtsson, 1998). The only adjuvant licensed for human use is aluminium hydroxide (alum) (Glenny et al., 1926; Sesardic et al., 2004). However, alum does not potentiate the immune response against many antigens and is not efficient to generate a cell-mediated immunity (Gupta and Siber, 1995; Gupta, 1998). Consequently, over the last decade, significant research efforts have been undertaken for the development of new, improved vaccine adjuvants and antigen delivery and presentation systems (O'Hagan and Valiante, 2003).

Particulate adjuvants act as delivery systems that promote the presentation of antigens to the immune system and can differ in chemical composition: liposomes, virosomes, ISCOMS, emulsions, or biopolymers nano- and microparticles (Kersten and Crommelin, 2003; O'Hagan et al., 2006a). These delivery systems facilitate antigen uptake, transport or presentation by antigen presenting cells (APCs) which are thought to directly activate T cells (Reddy et al., 2006). The biodegradable and biocompatible polyesters, poly-lactide-co-glycolides (PLG), are the primary candidates for the development of microparticles as vaccine or delivery systems, since they have been use in humans for many years as resorbable suture material and as

controlled release drug delivery systems (Walter et al., 2001; Elamanchili et al., 2004; Waeckerle and Groettrup, 2005). Similarly, our hydroxyethylstarch (HES) microparticles were prepared from the biodegradable and biocompatible molecule, hydroxyethylstarch (Voluven<sup>®</sup>), which is widely used in humans as artificial colloids for intravascular volume replacement (Langeron et al., 2001; Jungheinrich et al., 2002).

In a previous study, we have characterized and demonstrated that HES microparticles developed in our laboratory exhibited properties required for antigen delivery systems, especially to enhance the presentation of antigens, such as *in vivo* biocompatibility, shelf-life stability, high loading capacity, *in vivo* biodegradability, the controlled release and the localization of the loaded proteins (Devy et al., 2006).

In this work, we assessed the ability of HES microparticles in inducing an immune response in mice against the bovine serum albumin (BSA) protein in comparison with the alum adjuvant. We showed that the immunization of mice with BSA loaded in HES microparticles triggered an immune response against BSA and that both magnitude and type of the response were affected depending on the route of administration. The capacity of HES microparticles to be phagocytosed by APCs was also assessed.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Mice*

Female B6D2F1 mice, 6 weeks old, weighing 19-22 g, were purchased from Charles River Laboratories (Iffa Credo, l'Arbresle, France) and housed at the animal maintenance facility under controlled conditions ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , humidity of  $50 \pm 10\%$ , and a 12/12 h light/dark cycle). All experiments were conducted according to the animal care and use of the European Community.

## 2. 2. *Materials*

Hydroxyethylstarch (Voluven®) was purchased from Fresenius Kabi (Sèvres, France) and terephthaloyl chloride from Acros Organics (Noisy-le-grand, France); Ovalbumin (Ova), BSA, tween 20®, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), HEPES buffer, trypan blue and cytochalasin D were from Sigma (St Quentin Fallavier, France); chloroform, cyclohexane, ethanol, were provided by SDS (Peypin, France); sorbitan trioleate (Span® 85) was from Seppic (Sepiprod, Castres, France); RPMI 1640 medium, fetal calf serum (FCS), phosphate buffer saline (PBS) were from Gibco-Invitrogen (Cergy-Pontoise, France); 3, 3', 5, tetramethylbenzidine (TMB) and lymphoprep™ 1.077 (Ficoll) from AbCys (Paris, France); horse radish peroxidase (HRP) goat-anti-mouse IgG was from Interchim (Montluçon, France); horse radish peroxidase rat-anti-mouse IgG1 and rat-anti-mouse IgG2a antibodies were from Pharmingen (San Diego, CA, USA) and alhydrogel 1.3% (Alum) was from Brenntag Biosector (Frederikssund, Danemark).

## 2. 3. *Preparation of HES microparticles*

The microparticles were prepared by the interfacial cross-linking method according to our protocol (Levy and Andry, 1990; Devy et al., 2006). A 20% (w/v) HES solution was prepared in carbonate buffer pH 9.8. This aqueous phase (6 mL) was emulsified under mechanical agitation in 30 ml cyclohexane containing 5% (v/v) Span® 85. After 5 min, 40 mL of a 5 % (w/v) solution of terephthaloyl chloride in chloroform/cyclohexane (1/4) were added to the emulsion and stirring was prolonged for 30 min. The reaction was stopped by dilution with 40 mL of chloroform/cyclohexane (1/4). Microparticles were successively washed in cyclohexane, 95 % ethanol containing 2% Tween 20®, 95 % ethanol and water. Finally, microparticles were suspended in water and lyophilized. Particles were sized by a laser diffraction technique (Coulter Particle Sizer, type LS 200 Coultronics, France). Size

distribution was displayed in terms of volume versus particle size. The mean diameter was  $8.3 \pm 1.9 \mu\text{m}$ . Scanning electron microscopy was used to study the shape and the surface of HES microparticles and to check total removal of terephthaloyl chloride in microparticle wall.

For *in vitro* phagocytosis assay, fluorescent microparticles were prepared by incorporating 30 mg of fluoresceinamine in the HES solution before the emulsification step.

BSA loading was obtained according to our protocol (Devy et al., 2006). Five micrograms of HES microparticles were incubated in 0.5 mL of 0.15% (w/v) BSA diluted in 0.9% NaCl for 3 h under shaking at 37°C, and were then centrifuged to remove unloaded BSA. BSA-loaded HES microparticles were resuspended in saline and were immediately inoculated in mice.

#### 2. 4. *In vitro* phagocytosis assay

Mice were sacrificed and peritoneal cells were collected by flushing the peritoneal cavity with 10 mL of 0.9% NaCl. Mononuclear cells were isolated using a ficoll gradient and resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin (complete medium).  $10^6$  cells were incubated in culture chambers (Nunc). After 12 h, the medium was replaced by 200  $\mu\text{l}$  HEPES buffer (0,2 M, pH 7,4) fluoresceinamine-labelled microparticles for 4 h at 37°C. The microparticles suspension was replaced by 200  $\mu\text{l}$  of trypan blue solution (250  $\mu\text{g/ml}$  in citrate buffer pH 4.4) to quench extracellular fluorescence. After 1 min, phagocytosis was observed using a fluorescence microscope (Olympus IX70).

For control experiments, phagocytosis was inhibited by adding cytochalasin D (10  $\mu\text{g/mL}$ ) to the culture medium 1h prior to the addition of microparticles and to the microparticles suspensions (Wan et al., 1993).

## 2. 5. Immunization protocol

On days 1 and 21, each group of mice was immunized with saline, 100 µg BSA, 100 µg BSA in Alum (130 µg per injection) or 100 µg BSA loaded in HES microparticles. Each mouse received 200 µL of suspension per injection for *i.p.* route and 100 µl for *s.c.* route. Blood samples were collected from the tail artery on days 7, 11, 15, 21, 30, 38, 48 and 77 after the first immunization. Each sample was processed and serum was collected and stored at -20°C for further experiments.

## 2. 6. Anti-BSA antibody measurement

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out to assess anti-BSA antibody synthesis. A 96-well microtiter plate (Nunc-immunoplate Maxisorp) was coated with 50 µg of BSA in PBS per well overnight at 4°C. After washing, the plate was blocked with a 1% OVA in PBS/Tween 20<sup>®</sup> (PBS/T) for 1 h to avoid non-specific binding. The plate was washed and diluted serum samples were added to the wells for 2 h at RT. Serum from mice immunized with saline was used as a control. 100 µL of HRP-conjugated goat-anti-mouse IgG, rat-anti-mouse IgG1 or rat-anti-mouse IgG2a (1:1000 dilution) were added to each well for 2 h at RT. After washing with PBS/T, TMB was added for 10 min and the reaction was stopped with 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance was determined with a microplate reader (Multiskan Ascent, Labsystems) at 450 nm. The normal serum absorbance value was subtracted of all absorbance values. Results are given as (absorbance values) x (-log<sub>2</sub> (dilution x 10)).

## 2. 7. Splenocyte proliferation assay

Five weeks after the last immunization, spleens from treated (BSA, BSA/Alum or BSA/microparticles) or control (saline-immunized) mice were removed and cell suspensions were prepared in complete growth medium. Red blood cells were depleted using ficoll

centrifugation and  $5 \times 10^5$  cells were incubated in a 96-well plate in the presence of 2.5 mg/mL BSA. After incubation for 60 h at 37°C, 50  $\mu$ L of MTT (2 mg/ml) were added to each well during 4 h. The plates were centrifuged (1400 x g, 5 min) and 200  $\mu$ L of DMSO were added to each well. Absorbance was measured using a microplate reader at 540 nm. The stimulation index (SI) was calculated according to the following formula: SI = Absorbance (treated mice splenocytes) / Absorbance (control mice splenocytes).

### 2. 8. Cytokine assays

IFN- $\gamma$  and IL-4 were quantified by a sandwich enzyme immunoassay in the supernatants collected from treated or control splenocytes cultured with BSA. Microtiter plates were coated with anti-mouse IFN- $\gamma$  (R&D systems) or IL-4 (AbCys) overnight in a moist chamber at 4°C. After blocking, the supernatants from splenocytes culture were added for 2 h at RT. IFN- $\gamma$  or IL-4 were diluted to appropriate concentrations in assay buffer to create appropriate standard curves. The plates were washed and a secondary antibody conjugated with biotin was added, followed by avidine-peroxidase for 2 h at RT. The plates were washed and TMB was added for 10 min at RT. The reaction was stopped with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and absorbance was measured 450 nm. Cytokine concentrations were determined in each sample from curves established with standard dilutions of purified IFN- $\gamma$  and IL-4.

### 2.9. Statistical analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  S.E. The statistical significance was estimated with a Student's *t*-test for unpaired observations. A *P* value < 0.05 was considered to be significant.

### 3. Results

#### 3. 1. Phagocytosis of HES microparticles by mononuclear cells

The capacity of HES microparticles to be phagocytosed by peritoneal mononuclear cells was first examined. Phagocytosis of fluoresceinamine-labelled microparticles was monitored by fluorescence microscopy. In the absence of trypan blue, fluorescence emitted from microparticles in the culture medium was observed (Fig. 1a). Trypan blue does not quench intracellular fluorescence of phagocytosed HES microparticles in mononuclear cells. Therefore, only phagocytosed microparticles were detectable in the presence of trypan blue (Fig. 1b). The addition of cytochalasin D, a potent inhibitor of actin polymerization, resulted in complete inhibition of phagocytosis (Fig. 1c). These results show that peritoneal mononuclear cells can take HES microparticles up. Fig. 1d shows a HES microparticle internalized into a mononuclear cell.

#### 3. 2. Anti-BSA IgG responses

To investigate the effect of HES microparticles on the induction of a humoral immune response against BSA, mice were immunized twice with BSA, BSA/alum or BSA/microparticles by *i.p.* or *s.c.* routes and antibody titers were determined by ELISA. When injected *i.p.*, the three formulations did not induce antibody synthesis during the primary immune response, i.e. after the first immunization (Fig. 2a). The loading of BSA into HES microparticles elicited anti-BSA IgG during the secondary response (after the second injection), with a maximal titre at day 38. However, *i.p.* immunization with BSA/microparticles remained less efficient than BSA/alum. When injected *s.c.*, the antibody response was increased in the three groups following the first injection (Fig. 2b). However, BSA/microparticles and BSA/alum were more efficient than free BSA. After reboosting, the highest antibody titres were observed at day 30 and remained stable until day 77. No

significant differences in immunization with BSA/microparticles and free BSA were observed during the secondary IgG response. Therefore, the injection of BSA in s.c. resulted in a stronger IgG response than in *i.p.*.

To determine whether the immunization with BSA loaded in HES microparticles induced a Th1- or a Th2-mediated immune response, the titres of IgG1 and IgG2a subsets were measured for each group. As shown in Fig. 3a, alum, and to a lesser extent HES microparticles, enhanced the anti-BSA IgG1 levels in mice immunized by *i.p.* route compared to the injection of free BSA. Alum and microparticles also enhanced IgG2a titres compared to the injection of free BSA (Fig. 3b), but no significant differences were observed between the two groups. The immunization with BSA/microparticles elicited a higher IgG1 than IgG2a titre, as demonstrated by a positive IgG1/IgG2a ratio (Fig. 3c). However, this ratio was more elevated in mice immunized with BSA/alum, indicating that the alum adjuvant was more efficient than HES microparticles in triggering a Th2-type immune response against BSA.

The loading of BSA in HES microparticles did not improve both IgG1 and IgG2a responses compared to the injection of free BSA by s.c. route (Figs. 4a and 4b), although a predominating IgG1 response was observed (Fig. 4c). On the contrary, the alum adjuvant induced both a sustained IgG1 response against BSA (Fig. 4a), and an increasing IgG2a response from days 30 to 77 (Fig. 4b).

### 3.3. Splenocytes proliferation assay and cytokine profiles

Spleen cell proliferation was measured in mice immunized with BSA, BSA/alum or BSA/microparticles. As shown in Fig. 5, the loading of BSA in microparticles did not significantly enhance splenocyte proliferation compared to free BSA. The strongest proliferation was obtained with the s.c. injected BSA/alum formulation.

The cytokine profile of splenocytes can also be used to distinguish the Th1/Th2 type of immune responses. The supernatants from splenocytes stimulated with BSA were used for IL-

4 and IFN- $\gamma$  assays. In mice immunized *i.p.*, no detectable production of IFN- $\gamma$  was found in BSA- and BSA/alum-immunized mice (Table 1). In contrast, the level of IFN- $\gamma$  was dramatically increased in mice immunized *i.p.* with BSA/microparticles. The levels of IL-4 were unchanged in BSA and BSA/alum groups, whereas it was significantly increased in BSA/microparticles. When injected *s.c.*, BSA/microparticles were more efficient to induce IFN- $\gamma$  secretion by spleen cells

#### **4. Discussion**

Development of new adjuvant, particularly for peptides and proteins, is growing in importance and attracting increased interest (Sinha and Trehan, 2003; Degim and Celebi, 2007). Protein- or peptide-based vaccines need to be formulated in appropriate adjuvants and administered through the adequate route to elicit either a Th1 or a Th2 type of immune response. In this study, HES microparticles were used as a delivery and antigen presentation system to induce immune responses against BSA. Several microspheres such as poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(D,L-lactide) (PLA) microparticles and nanoparticles have been used in humans as antigen delivery systems (Walter et al., 2001; Elamanchili et al., 2004; Waeckerle and Groettrup, 2005). Particulate adjuvants (e.g. microparticles, ISCOMs, liposomes, virosomes, and virus-like particles) offer several attributes for their use as vaccine delivery systems (O'Hagan et al., 2006b). They have a size similar to pathogens that the immune system has evolved to combat and consequently, are efficiently internalized by APCs (Elamanchili et al., 2007). We have shown that HES microparticles exhibited a size which allows their internalization by peritoneal mononuclear cells. This phenomenon was totally abolished when cells were pre-incubated with cytochalasin D. The internalization of epitope-containing microparticles by APCs such as dendritic cells (DCs) and their subsequent migration to lymph nodes is required to present antigens to T cells (Banchereau and Steinman, 1998; Thiele et al., 2002). Audran et al. (Audran et al., 2003) have reported that

biodegradable microspheres whose size allows them to be phagocytosed, prolonged *in vitro* peptide presentation to APCs.

We previously showed that BSA was contained into HES microparticles, and was also presented at the surface of the microparticles (Devy et al., 2006). The loading of BSA into HES microparticles enables the presentation of several antigens on their surface, which have been shown to be optimal for B cell activation. Organized arrays of surface-bound antigens efficiently cross-link B cell receptors and constitute a strong activation signal (Bachmann et al., 1993; Fehr et al., 1998).

On the contrary, the immunostimulatory effects of HES microparticles do not appear to be associated with an antigen release. In a previous study we showed that after an initial release of 20% BSA during the first 30 min, no BSA entrapped in HES microparticles was released for the following 4 days. Moreover, HES microparticles exhibited a smooth surface which minimizes the antigen release contrary to a porous structure (Alonso et al., 1993) and it is generally believed that the antigen depot effect contributes to the adjuvant effects of many antigen delivery vehicles (Liang et al., 2006).

A long-lasting IgG response against BSA was obtained in mice *i.p.* immunized with BSA-loaded microparticles. This response was higher than the response induced by injection of BSA alone when injected *i.p.*, but not *s.c.*. However, the primary immune response was higher when BSA/microparticles were *s.c.* injected, suggesting that the route of injection may affect the extent of the antibody response. DCs, the professional APCs involved in the establishment of the immune response may be activated in a different manner following *i.p.* or *s.c.* injection, as there are different subsets of DCs depending on their localization. Moreover the influence of the immunization route to induce an IgG response against proteins loaded in microparticles has been demonstrated by several studies (Gutierrez et al., 2002). In all cases, HES microparticles elicited a weaker antibody response compared to the commonly used alum

adjuvant which is known to induce strong humoral immune responses (Petrvsky and Aguilar, 2004).

Adjuvants have been used to shift the immune response toward a Th1 or a Th2-mediated immune response depending on their mode of action. The Th1 immune response, which is mediated by Th1 helper cells, is characterized by the production of IL-2, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  and by an enhanced production of IgG2a, IgG2b and IgG3 subclasses. A Th1 immune response is a requisite for cytotoxic T lymphocyte (CTL) production. The Th2 response is characterized by the production of IL-4, IL-5 and IL-10, and by an enhanced production of IgG1 subset and secretory IgA. The Th1 response is required for protective immunity against intracellular infectious agents, such as viruses, bacteria and protozoa, and against cancer cells. Th2 immunity is effective for a protection against most bacteria as well as against certain viral infections (Cox and Coulter, 1997). The currently available adjuvants mainly stimulate the Th2 type immune response, which is frequently ineffective against intracellular pathogens and malignant cells.

We have shown here that HES microparticles induce a mixed Th1/Th2 response. Several studies reported the induction of a predominant Th1 response by microparticles, mediated by the production of the IgG2a subset (Vordermeier et al., 1995). Immunization by *i.p.* route with BSA/microparticles enhanced both IgG1 and IgG2a production, although the predominant subset was IgG1, as demonstrated by an elevated IgG1/IgG2a ratio. The use of alum as adjuvant elicited high IgG1 titres compared to HES microparticles. The production of high IgG1 levels associated with secretion of IgE has been involved in inflammation (Relyveld et al., 1998; Erazo et al., 2007). However, the *s.c.* injection of BSA loaded in microparticles did not enhance neither IgG1 nor IgG2a secretion compared to free BSA, demonstrating the importance of the choice of the route of administration.

The i.p. immunization with HES microparticles enhanced the production of Th1 and Th2-related cytokines. The levels of IFN- $\gamma$  and IL-4 released from splenocytes were significantly increased in comparison to mice immunized with BSA or BSA/alum. Only IFN- $\gamma$  secretion was increased when BSA/microparticles were s.c. injected. The proliferation of spleen cells was not significantly different in BSA and in BSA/microparticles groups. Therefore, HES microparticles may be more efficient to activate rather than expand the number of splenocytes.

The immunization with HES microparticles did not induce any change in the behaviour of mice. Peritoneal granulomas were found after i.p. immunization of mice with BSA/alum, but not with BSA/microparticles. Several other studies reported the appearance of post-vaccination granulomas in animals or children immunized with aluminium-adsorbed vaccines (Bordet et al., 2001; Valtulini et al., 2005).

In conclusion, this study shows that the loading of BSA in HES microparticles can induce both a Th1 and a Th2 immune response. Such a mixed Th1/Th2 response is critical for the control of malignant cells as well as infectious pathogens. In addition, HES-microparticles are industrially easy to prepare, use and applicable to a wide range of vaccines. The physical loading of the antigen by HES-microparticles is an advantage compared to other conjugation procedures. Indeed, the conjugation procedure is not without difficulties and may involve modification of peptide epitope as well as complication in respect to the characterization and reproductibility of conjugate structures (Kazzaz et al., 2000; Singh et al., 2006). Therefore, HES microparticles may be used as a suitable drug delivery system for a broad range of antigens to generate vaccines useful in the field of tumor immunotherapy.

## References

- Alonso, M.J., Cohen, S., Park, T.G., Gupta, R.K., Siber, G.R., Langer, R., 1993. Determinants of release rate of tetanus vaccine from polyester microspheres. *Pharm. Res.*, 10, 945-953.
- Audran, R., Peter, K., Dannull, J., Men, Y., Scandella, E., Groettrup, M., Gander, B., Corradin, G., 2003. Encapsulation of peptides in biodegradable microspheres prolongs their MHC class-I presentation by dendritic cells and macrophages in vitro. *Vaccine*, 21, 1250-1255.
- Bachmann, M.F., Rohrer, U.H., Kundig, T.M., Burki, K., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1993. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science*, 262, 1448-1451.
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-252.
- Bordet, A.L., Michenet, P., Cohen, C., Arbion, F., Ekindi, N., Bonneau, C., Kerdraon, R., Coville, M., 2001. Post-vaccination granuloma due to aluminium hydroxide. *Ann. Pathol.*, 21, 149-152.
- Cox, J.C., Coulter, A.R., 1997. Adjuvants - a classification and review of their mode of action. *Vaccine*, 5, 48-56.
- Devy, J., Balasse, E., Kaplan, H., Madoulet, C., Andry, M.C., 2006. Hydroxyethylstarch microcapsules: a preliminary study for tumor immunotherapy application. *Int. J. Pharm.*, 307, 194-200.
- Degim, I.T., Celebi, N., 2007. Controlled delivery of peptides and proteins. *Curr. Pharm. Des.*, 13, 99-117.
- Elamanchili, P., Lutsiak, C.M., Hamdy, S., Diwan, M., Samuel, J., 2007. "Pathogen-mimicking" nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cells. *J. Immunother.*, 30, 378-395.

- Elamanchili, P., Diwan, M., Cao, M., Samuel, J., 2004. Characterisation of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) based nanoparticulate system for enhanced delivery of antigens to dendritic cells. *Vaccine*, 22, 2406-2412.
- Erazo, A., Kutchukhidze, N., Leung, M., Christ, A.P., Urban, J.F., Curotto de Lafaille, M.A., Lafaille, J.J., 2007. Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity*, 26, 191-203.
- Fehr, T., Skrastina, D., Pumpens, P., Zinkernagel, R.M., 1998. T cell-independent type I antibody response against B cell epitopes expressed repetitively on recombinant virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 9477-9481.
- Glenny, A., Pope, C., Waddington, H., Falacce, U., 1926. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J. Pathol. Bacteriol.*, 29, 31-40.
- Gupta, R.K., 1998. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 32, 155-172.
- Gupta, R.K., Siber, G.R., 1995. Adjuvants for human vaccines - Current status, problems and future prospects. *Vaccine*, 13, 1263-1276.
- Gutierrez, I., Hernández, R.M., Igartua, M., Gascón, A.R., Pedraz, J.L., 2002. Influence of dose and immunization route on the serum Ig G antibody response to BSA loaded PLGA microspheres. *Vaccine*, 20, 181-2190.
- Jungheinrich, C., Scharpf, R., Wargenau, M., Bepperling, F., Baron, J.F., 2002. The pharmacokinetics and tolerability of an intravenous infusion of the new hydroxyethylstarch 130/0.4 (6%, 500 mL) in mild-to-severe renal impairment. *Anesth. Analg.*, 95, 544-551.
- Kazzaz, J., Neidleman, J., Singh, M., Ott, G., O'Hagan, D.T., 2000. Novel anionic microparticles are a potent adjuvant for the induction of cytotoxic T lymphocytes against recombinant p55 gag from HIV-1. *J. Control. Release*, 67, 347-356.
- Kersten, G.F.A., Crommelin, D.J.A., 2003. Liposomes and ISCOMs. *Vaccine*, 21, 915-920.

- Langeron, O., Doelberg, M., Ang, E.T., Bonnet, F., Capdevila, X., Coriat, P., 2001. Voluven<sup>®</sup>, a lower substituted novel hydroxyethyl starch (HES 130/0.4), causes fewer effects on coagulation in major orthopedic surgery than HES 200/0.5. *Anesth. Analg.*, 92, 855-862.
- Levy, M.C., Andry, M.C., 1990. Microparticles prepared through interfacial cross-linking of starch derivatives. *Int. J. Pharm.*, 62, 27-35.
- Liang, M.T., Davies, N.M., Blanchfield, J.T., Toth, I., 2006. Particulate systems as adjuvants and carriers for peptide and protein antigens. *Curr. Drug Deliv.*, 3, 379-388.
- Lovgren-Bengtsson, K., 1998. In: S.H.E. Kaufmann, D. Kabelitz (Ed.), *Methods in microbiology*, Vol. 25, Academic Press, San Diego, pp. 471-502.
- O'Hagan, D.T., Valiante, N.M., 2003. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2, 727-735.
- O'Hagan, D.T., Singh, M., Ulmer, J.B., 2006a. Microparticles-based technologies for vaccines. *Methods*, 40, 10-19.
- O'Hagan, D.T., Singh, M., Ulmer, J.B., 2006b. Microparticles-based technologies for vaccines. *Methods*, 40, 10-19.
- Petrvsky, N., Aguilar, J.C., 2004. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol. Cell. Biol.*, 82, 488-496.
- Ramon, G., 1924. Sur la toxine et surranatoxine diphtériques. *Ann. Inst. Pasteur*, 38, 1-7.
- Reddy, S.T., Swartz, M.A., Hubbell, J.A., 2006. Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *Trends Immunol.*, 27, 573-579.
- Relyveld, E.H., Bizzini, B., Gupta, R.K., 1998. Rational approaches to reduce adverse reactions in man to vaccines containing tetanus and diphtheria toxoids. *Vaccine*, 16, 1016-1023.

- Sanchez, Y., Ionescu-Matin, I., Dreesman, G.R., Kramp, W., Six, H.R., Hollinger, F.B., Mellnick, J.L., 1980. Humoral and cellular immunity to hepatitis B virus-derived antigen: comparative activity of Freund's complete adjuvant, alum and liposome. *Infect. Immunity*, 30, 728-733.
- Sesardic, D., Dobbelaer, R., 2004. European union regulatory developments for new vaccine adjuvants and delivery systems. *Vaccine*, 22, 2452-2456.
- Singh, M., Kazzaz, J., Ugozzoli, Malyala, P., Chesko, J., O'Hagan, D.T., 2006. Polylactide-co-glycolide microparticles with surface adsorbed antigens as vaccine delivery systems. *Curr. Drug. Deliv.*, 3, 115-120.
- Sinha, V.R., Trehan, A., 2003. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J. Control. Release*, 90, 261-280.
- Thiele, L., Merkle, H.P., Walter, E., 2002. Phagocytosis of synthetic particulate vaccine delivery systems to program dendritic cells. *Expert. Rev. Vaccines*, 1, 215-226.
- Valtulini, S., Macchi, C., Ballanti, P., Cherel, Y., Laval, A., Theaker, J.M., Bake, M., Ferretti, E., Morvan, H., 2005. Aluminium hydroxide induced granulomas in pigs. *Vaccine*, 23, 3999-4004.
- Vogel, F.R., Powell, M.F., 1995. A compendium of vaccine adjuvants and excipients. *Pharm. Biotechnol.*, 6, 141-228.
- Vordermeier, H.M., Coombes, A.G., Jenkins, P., McGee, J.P., O'Hagan, D.T., Davis, S.S., Singh, M., 1995. Synthetic delivery system for tuberculosis vaccines: immunological evaluation of the *M. tuberculosis* 38 kDa protein entrapped in biodegradable PLG microparticles. *Vaccine*, 13, 1576-1582.
- Waeckerle-Men, Y., Groettrup, M., 2005. PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 10, 475-482.

- Walter, E., Dreher, D., Kok, M., Thiele, L., Kiama, S.G., Gehr, P., Merkle, H.P., 2001. Hydrophilic poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres for the delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells. *J. Control. Release*, 76, 149-168.
- Wan, C.P., Park, C.S., Lau, B.H., 1993. A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. *J. Immunol. Methods*, 162, 1-7.

Fig 1.

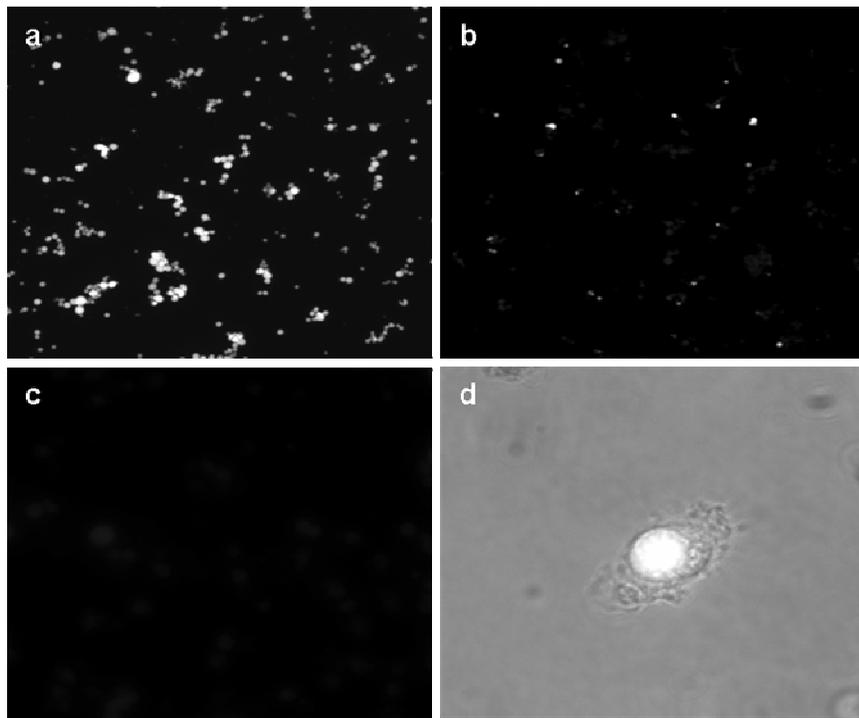


Fig 2.

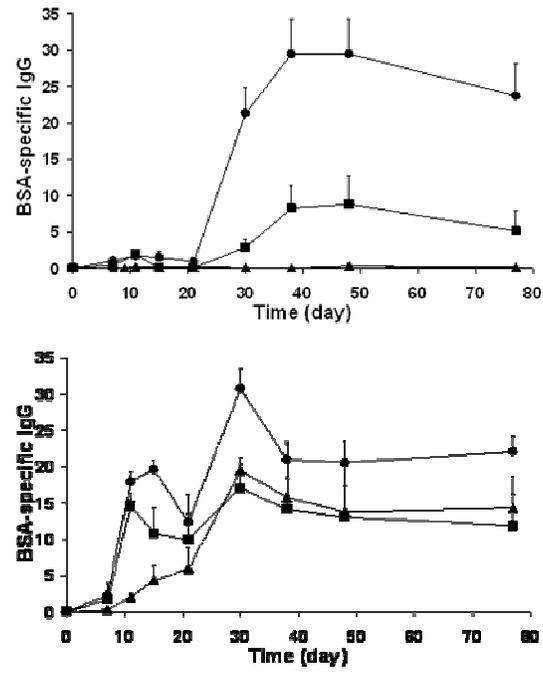


Fig 3.

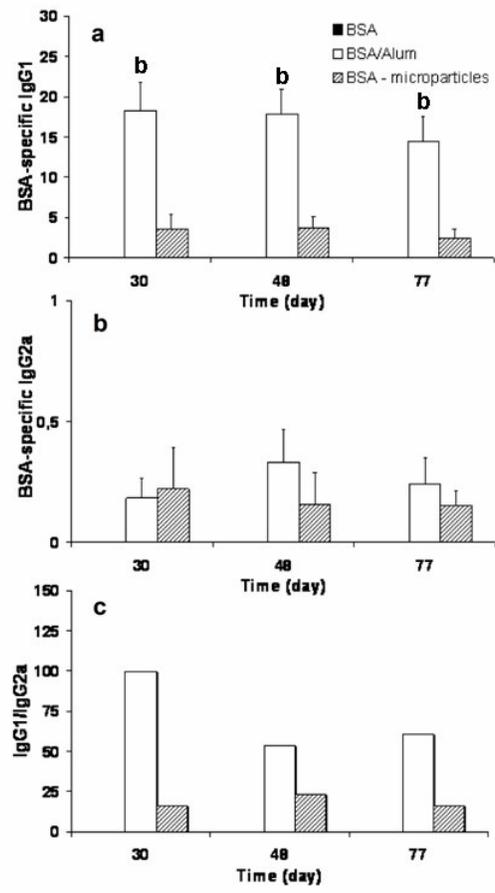


Fig 4.

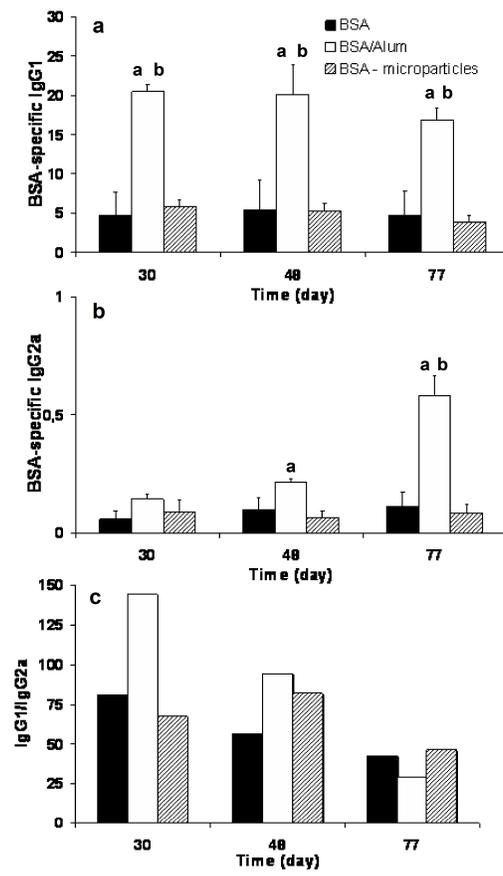


Fig 5.

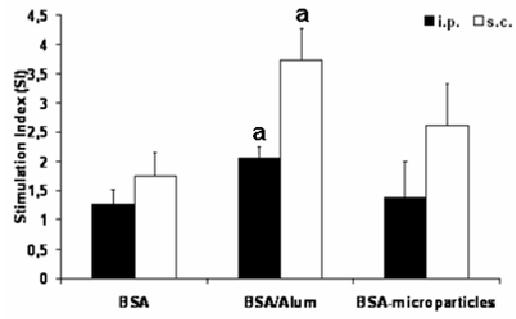


Fig. 1. Phagocytosis of fluoresceinamine-labelled HES microparticles by mononuclear cells observed under fluorescence microscopy. (a) fluorescence emitted by microparticles in culture supernatant or internalized by mononuclear cells; (b) fluorescence emitted after trypan blue quenching; (c) cells were treated with cytochalasin D before incubation with microparticles; (d) detail of a phagocytosed microparticle into a cell using simultaneous phase contrast and fluorescence microscopy. Magnification x 20 (a, b, c) and x 60 (d).

Fig. 2. Serum IgG levels after immunization with BSA (▲), BSA/alum (●) or BSA/microparticles (■) by *i.p.* (a) or *s.c.* (b) route. Values represent means  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). Arrows indicate immunizations (days 1 and 21).

Fig. 3. Serum IgG1 and IgG2a levels in mice immunized with BSA, BSA/alum or BSA/microparticles by *i.p.* route. Values represent means  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). <sup>a</sup> $P < 0.05$  between BSA and BSA/alum, <sup>b</sup> $P < 0.05$  between BSA/alum and BSA/microparticles.

Fig. 4. Serum IgG1 and IgG2a levels in mice immunized with BSA, BSA/alum or BSA/microparticles by *s.c.* route. Values represent means  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). <sup>a</sup> $P < 0.05$  between BSA and BSA/alum, <sup>b</sup> $P < 0.05$  between BSA/alum and BSA/microparticles.

Fig. 5. Proliferation of spleen cells following immunization with BSA, BSA/alum or BSA/microparticles by *i.p.* or *s.c.* route. Values represent means  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). <sup>a</sup> $P < 0.05$  between BSA and BSA/alum.

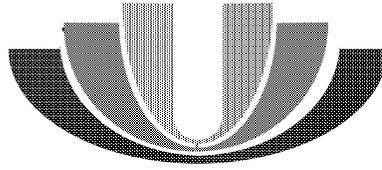
Table 1.

groups	Cytokines (pg/ml)			
	i.p.		s.c.	
	IL-4	IFN- $\gamma$	IL-4	IFN- $\gamma$
BSA	27 $\pm$ 13	N.D.	55 $\pm$ 22	47 $\pm$ 26
BSA/alum	35 $\pm$ 5	N.D.	101 $\pm$ 43	150 $\pm$ 65
BSA/microparticles	77 $\pm$ 15 <sup>ab</sup>	333 $\pm$ 115 <sup>ab</sup>	67 $\pm$ 16	172 $\pm$ 56 <sup>a</sup>

Table 1. Levels of IL-4 and IFN- $\gamma$  released from splenocytes from mice immunized with BSA, BS/alum or BSA/microparticles<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Results expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 3). <sup>a</sup> $P < 0.05$  between BSA and BSA/microparticles,

<sup>b</sup> $P < 0.05$  between BSA/alum and BSA/microparticles. ND, not detected.



UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE ARDENNE  
*UFR de Pharmacie*

**« Les propriétés adjuvantes des microcapsules  
d'hydroxyéthyl amidon.  
Application en immunothérapie anti-mélanome ».**

*Emilie Balasse*

**Directeur de Thèse :** Pr Claudie Madoulet

**Ecole Doctorale :** STS (Sciences Technologies Santé) de Reims

**Mentor ABG :** Jean-Marie Fétrot

Date de soutenance prévue : Septembre-Octobre 2007

---



## *Sommaire*

<b>I/ Cadre général et enjeux de mon projet de recherche</b>	<b>3</b>
1. Présentation générale de mon projet de recherche	3
2. Les enjeux et les impacts pour mon laboratoire	4
3. Les résultats attendus	5
4. Mon projet de recherche dans son contexte	6
5. Moi dans ce contexte	6
<b>II/ Déroulement, gestion et coût de mon projet</b>	<b>6</b>
1. Cadrage du projet	6
2. Conduite du projet	7
3. Coût du projet	7
4. Conditions de travail	9
<b>III/ Compétences, savoir faire, qualités professionnelles et personnelles acquises et/ou mises en œuvre</b>	<b>10</b>
<b>IV/ Conséquences notamment en termes de pistes professionnelles identifiées</b>	<b>12</b>

### *Qu'est ce que le nouveau chapitre de thèse ?*

Cette initiative a été imaginée en 2000 par trois écoles doctorales en Sciences de l'Univers, en partenariat avec l'Institut National des Sciences de l'Univers du CNRS (INSU) et l'association Bernard Gregory (ABG) pour faciliter l'insertion professionnelle des doctorants.

L'objectif est d'aider les doctorants à faire le point sur les compétences et savoir-faire professionnels développés au cours de la préparation de leur doctorat. En effet, dans l'absolu, les jeunes docteurs ont acquis des compétences très intéressantes pour leur insertion dans la vie active, que ce soit dans l'univers de l'entreprise ou dans celui de l'enseignement supérieur et de la recherche académique. Toutefois, passer de cette observation générale à son appropriation personnelle constitue encore souvent, pour le doctorant, un véritable « challenge ». De plus, au-delà des compétences scientifiques spécifiques mises en œuvre au cours de la thèse, il peut éprouver des difficultés à discerner et, par conséquent, à mettre en avant d'autres acquis tout aussi fondamentaux, tels que la conduite de projet, la gestion du temps, le montage de partenariats, ... etc en vue de la valorisation de ces aptitudes pour son insertion professionnelle.

## I/ Cadre général et enjeux de mon projet de recherche

### 1. Présentation générale de mon projet de recherche

L'incidence du mélanome est en augmentation constante. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime à 132 000 le nombre annuel de mélanomes malins et à 66 000 le nombre de décès imputables à ce dernier et aux autres cancers cutanés. Ces chiffres sont en progression constante.

A l'heure actuelle, la chirurgie reste le premier traitement du mélanome. L'épaisseur du mélanome au moment de la prise en charge est l'un des facteurs déterminants pour la réussite du traitement. En effet, la chirurgie permet de guérir plus de deux malades sur trois aux stades I et II et la quasi-totalité d'entre eux si le diagnostic est fait très tôt et si la tumeur est superficielle. Malheureusement, dans les cas où la chirurgie est impossible, les possibilités thérapeutiques deviennent limitées. Les résultats décevants de la chimiothérapie classique ont amené à multiplier les voies de recherche thérapeutique de ce type de tumeur :

- étude de nouvelles molécules de chimiothérapie,
- essais d'associations de drogues entre elles,
- associations immuno-chimiothérapie,
- thérapies géniques,
- thérapies vaccinales, etc...

Les progrès considérables réalisés ces dernières années dans les domaines de l'immunologie, de la biologie moléculaire d'une part, de la description de marqueurs (protéines, peptides...) tumoraux d'autre part, ont permis le développement récent de stratégies vaccinales anti-tumorales spécifiques dans divers types de cancers, et en particulier dans le mélanome. Il a été démontré que les cellules tumorales portent à leur surface des marqueurs (aussi nommés antigènes) qui peuvent être reconnus par le système immunitaire, et notamment les lymphocytes T capables de détruire les cellules tumorales. Les recherches actuelles tentent de déterminer s'il est possible, par une vaccination des patients contre les antigènes portés par leur tumeur, de déclencher une régression tumorale. Pour cela, une nouvelle stratégie d'immunothérapie anti-mélanome vise à injecter des protéines solubles ou des cellules mélaniques broyées. Mais, cette nouvelle stratégie reste peu efficace à cause notamment de sa faible capacité à stimuler le système immunitaire. Afin d'activer plus efficacement le système immunitaire, différents composés peuvent être ajoutés aux préparations vaccinales : les adjuvant vaccinaux. En vaccination traditionnelle, l'adjuvant utilisé chez l'homme est l'Alun (sels d'aluminium). Les adjuvants sont de 2 types,

soit les immunostimulants (dérivant pour la plupart de pathogènes), soit les systèmes de présentation des antigènes (généralement microparticulaires).

Les adjuvants microparticulaires offrent de nombreux avantages. Entre autre, ils ont une taille similaire à celle des pathogènes rencontrés habituellement par le système immunitaire et contre lesquels il doit combattre. Ils permettent également de protéger les protéines de la dégradation.

Au cours de mon projet de recherche, nous avons tenté de développer un tout nouvel adjuvant microparticulaire : les microcapsules d'hydroxyéthyl amidon. Une fois nos microcapsules caractérisées et leurs propriétés adjuvantes étudiées, nous avons testé une nouvelle approche d'immunothérapie anti-mélanome à base de protéines solubles totales extraites de cellules de mélanome en combinaison avec ces microcapsules d'hydroxyéthyl amidon. Le but étant d'améliorer la stimulation du système immunitaire contre les antigènes portés par les cellules de mélanome et ainsi déclencher une régression tumorale.

## **2. Les enjeux et les impacts pour mon laboratoire**

Les enjeux de ces travaux résident principalement dans le développement d'une nouvelle stratégie de lutte anti-mélanome. Stratégie pouvant être étendue à d'autres types de cancers ou de maladies infectieuses et basée sur l'utilisation d'un nouvel adjuvant, les microcapsules d'hydroxyéthyl amidon.

Ainsi, nous voulons démontrer l'efficacité de ce nouvel adjuvant et les avantages de celui-ci par rapport aux adjuvants traditionnellement utilisés que ce soit en immunothérapie ou en vaccination plus traditionnelle. Le choix des antigènes, à savoir les protéines solubles totales extraites de cellules de mélanome, s'inscrit dans un contexte de vaccination à base de multiples antigènes, suite à la faible efficacité des vaccins n'utilisant qu'un seul antigène bien défini.

De plus, les microcapsules d'HEA sont très faciles à produire industriellement (procédé de fabrication déjà utilisé en industrie pour d'autres microcapsules en cosmétique). Leur coût de fabrication étant nettement inférieur au coût des autres systèmes de présentation des antigènes déjà développés, à savoir les liposomes ou encore les virosomes.

Le mélanome est une des tumeurs les plus agressives de l'organisme, les plus envahissantes et les plus métastasantes. Devant ce fléau, les traitements de référence apparaissent décevants et de nouvelles stratégies de lutte contre le mélanome telles que des stratégies d'immunothérapies sont en train de se développer. Dans un premier temps, si notre stratégie s'avère efficace, elle pourrait être associée aux traitements anticancéreux conventionnels (chimiothérapie, radiothérapie...). Elle permettrait ainsi de minimiser les

doses d'anticancéreux ou de rayons à administrer aux patients et ainsi de diminuer les effets secondaires. L'immunothérapie permet un traitement général pouvant être par conséquent à prescrire en cas de prévention ou d'apparition de métastases. Cette stratégie pourrait aussi être utilisée après « guérison » pour prévenir les récurrences.

Les impacts de mon projet pour le laboratoire se traduisent essentiellement en terme de publications scientifiques :

- Devy J., Balasse E., Kaplan H., Madoulet C., Andry M.C., Hydroxyethylstarch microcapsules: a preliminary study for tumor immunotherapy application. *Int. J. Pharm.* 2006, 307(2): 194-200.
- Balasse E., Odot J., Gatouillat G., Andry M.C., Madoulet C., Mixed Th1/Th2 immune response induced by BSA loaded in hydroxyethylstarch microparticles. *Int J Pharm*, 2007, IJP-D-07-00692, Submitted Article.

Un troisième article regroupant les résultats d'immunothérapie anti-mélanome à base de protéines solubles totales extraites de cellules de mélanome en combinaison avec les microcapsules d'hydroxyéthyl amidon est en phase de réalisation.

### **3. Les résultats attendus**

En termes généraux : **1)** Efficacité/capacité des microcapsules d'HEA à induire une réponse immunitaire contre le ou les antigènes chargés. Réponse immunitaire plus importante que celle obtenue avec le ou les antigènes administrés seuls ; **2)** Cette activation de la réponse immunitaire devrait être double, c'est-à-dire, activer à la fois la composante anticorps et cellulaire (lymphocyte T) de la réponse immunitaire. La composante cellulaire étant très importante dans la lutte anti-tumorale ; **3)** Cette activation de la réponse immunitaire contre les antigènes chargés devra se traduire en termes de protection, défense de l'organisme contre les cellules cancéreuses et en ce qui nous concerne, contre les cellules de mélanome.

Les résultats obtenus jusqu'ici sont en accord avec nos attentes, seulement, la stimulation du système immunitaire à moins d'effet sur la protection contre les cellules cancéreuses qu'escompter. Ceci devant être dû aux mécanismes d'échappement au contrôle du système immunitaires mis en place par les cellules cancéreuses.

En perspectives, l'ajout de molécules (ex :IFN) ou d'anticorps (ex : anti-CTLA4) à nos traitements afin de contourner ces mécanismes d'échappement est à envisager.

#### **4. Mon projet de recherche dans son contexte**

Ma thèse s'insère parfaitement dans les objectifs de mon équipe, qui tournent autour de la lutte anti-tumorale (problèmes de résistance aux médicaments anti-cancéreux) et notamment l'immunothérapie anti-mélanome. Il existe d'autres pôles qui s'intéressent à cette problématique (Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France ; Institut Ludwig, Bruxelles, Belgique...etc). Cependant, le chemin de la réussite est encore long et les voies de recherche ouvertes.

#### **5. Moi dans ce contexte**

Mon intérêt pour la recherche est parti de mon année de licence de biologie cellulaire et moléculaire. En effet, mon goût pour les sciences, notamment l'immunologie et la cancérologie, ainsi que mon souci de pratiquer un métier stimulant ne m'entraînant pas dans une routine ennuyeuse, m'ont naturellement menés à la recherche et à la thèse. Thèse qui est pour moi beaucoup moins désagréable que ce que j'avais pu en entendre dire. En effet, à la fin de mon DEA, une allocation ministérielle et un contrat de moniteur de 3 ans m'ont été attribués, donc contrairement à la majorité des thésards je n'ai aucun problème de financement. De plus, mon laboratoire d'accueil de DEA est le même que celui au sein duquel j'effectue ma thèse et avec lequel j'entretiens des rapports plus que satisfaisants. Il est pour moi primordial d'évoluer dans une atmosphère saine où l'on se sent soutenu et considéré. Pour finir mon sujet de thèse porte sur l'immunologie et la cancérologie, mes deux domaines favoris.

## **II/ Déroulement, gestion et coût de mon projet**

### **1. Cadrage du projet**

Le sujet de ma thèse a été défini en fonction des problématiques des projets de recherche en cours. Sur ce sujet mon équipe travaille en collaboration avec le laboratoire de Pharmacotechnie dirigé par le professeur Marie-Christine Andry (laboratoire CNRS). Leur rôle principal étant la mise au point et la fabrication des microcapsules d'hydroxyéthyl amidon. Le professeur Claudie Madoulet, Marie-Christine Andry et moi-même nous consultons régulièrement pour tenir compte de la direction et des avancées du projet.

## 2. Conduite du projet

Pour ce qui est de la conduite du projet, mes deux chefs me laissent totalement libre. J'ai la chance de travailler avec des personnes qui ont confiance en moi, ce qui me motive d'autant plus et en même temps développe chez moi un besoin de perfection afin de ne pas les décevoir. Je tiens néanmoins avant de commencer des manipulations qui vont demander beaucoup de temps et d'argent à consulter mes chefs. Ce qui me semble la moindre des choses et me permet d'être confortée dans mes choix, de ne pas trop me disperser et d'être en accord avec leurs attentes. Cependant, nous sommes conscients des facteurs de risques que comporte mon projet, à savoir les manipulations sur du vivant (des souris) entraînant souvent des résultats hétérogènes parfois difficiles à interpréter, et le risque que les microcapsules à tester n'aient aucune efficacité probante.

## 3. Coût du projet

Personnel		Temps (mois)	Salaire Mensuel brut (€)	Coût (€)
Doctorant (Allocation ministérielle+ Monitorat)		36	$(1417,38 + 335,39) \times 36$ mois	63 099,72
Directeur de thèse (Pr Claudie Madoulet)		3	274,41 x 60 jours	16 464,6
Autres chercheurs	Professeurs	1	274,41 x 20 jours	5 488,2
	Maîtres de Conférence	0,5	237,94 x 10 jours	2 379,4
Autres doctorants		3	0	0
Coût total				72 613,92

**Tab 1.** Coût en ressources humaines

<b>Matériel</b>	<b>Coût (€)</b>
Biologique (Souris, Anticorps, Cytokines...)	5 500
Autres (matériel de culture cellulaire, Kit de dosage de cytokine, produits chimiques, Kit de dosage de la LDH...)	4 900
Gros matériel (Cytomètre et microscope confocal, électronique, à fluorescence...)	2 000
Equipement de bureau (ordinateur, imprimante...)	1 200
<b>Coût total</b>	<b>13 600</b>

**Tab 2.** Coût matériel

<b>Infrastructure</b>	<b>Coût (€)</b>
Animalerie (250 souris x 360 jours x 0,1 €)	9 000
Bureau (600 jours x 1,05 € x 8,75 m <sup>2</sup> )/2 étudiants	2 765.25
Laboratoire (600 jrs x 3 € x 25 m <sup>2</sup> )/3	15 000
Salle de culture (600 jours x 1,62 € x 13,5 m <sup>2</sup> )/3	4 374
<b>Coût total</b>	<b>31 130.25</b>

**Tab 3.** Coût des Infrastructures

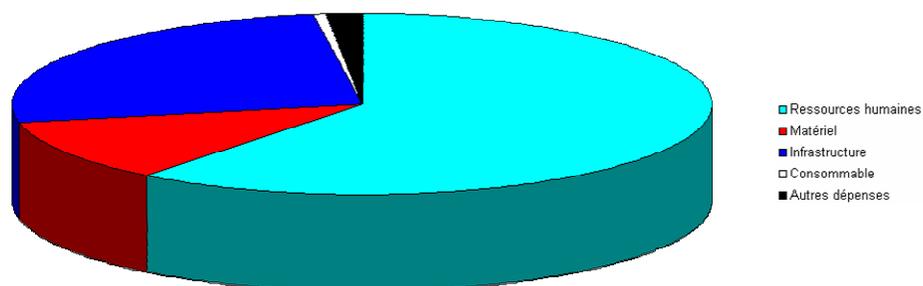
<b>Consommable</b>	<b>Coût (€)</b>
Feuilles, stylos, colle, ...	800

**Tab 4.** Coût du consommable

<b>Autres dépenses</b>	<b>Coût (€)</b>
Formations (Doctoriales, Nouveau chapitre de Thèse)	900
Missions (Congrès, impression de posters scientifiques,..)	1 000
<b>Coût total</b>	<b>1 900</b>

*Tab 5. Coût des autres dépenses*

<b>Coût total</b>	<b>120 044,17</b>
-------------------	-------------------



#### 4. Conditions de travail

Mes conditions de travail sont excellentes. J'ai la chance d'avoir un bureau que je partage avec un autre thésard de mon équipe avec qui je m'entends très bien, et un ordinateur neuf avec INTERNET (primordial pour les recherches bibliographiques). Pour ce qui est des laboratoires, le matériel mis à notre disposition est suffisant (matériel de notre équipe, IFR et du laboratoire de Pharmacotechnie avec qui nous collaborons).

### **III/ Compétences, savoir faire, qualités professionnelles et personnelles acquises et/ou mises en œuvre**

Ce projet de recherche m'a beaucoup appris que se soit d'un point de vue scientifique, technique, méthodologique ou même humain.

D'un point de vue technique, j'ai utilisé diverses techniques de biologie cellulaire, de biologie moléculaire, d'immunologie, ou encore de microscopie. J'ai essayé de me diversifié le plus possible afin d'enrichir mes pôles de compétences car souvent notre sujet de thèse nous limite à seulement quelques techniques particulières (ce qui ne veut pas dire que nous ne sachons pas faire autre chose).

D'un point de vue scientifique mes domaines « d'expertises » sont **1)** la vaccination antitumorale, **2)** le mélanome et la cancérologie en général, **3)** les adjuvants vaccinaux et **4)** l'immunologie.

Le fait de travailler sur les animaux nécessite beaucoup de rigueur et de méthode. Cela demande aussi un gros travail de planification des manipulations, de gestion du temps, de gestion des tâches menées en parallèle (tel que les enseignements).

De plus, j'essaie de prendre le temps de m'intéresser à d'autres choses comme prendre des cours d'anglais. J'ai aussi eu la chance de participer aux Doctoriales 2006 et aujourd'hui au Nouveau chapitre de thèse. Espérant ainsi mettre le maximum de chances de mon côté pour me construire un avenir professionnel que j'aurai choisi et non subi.

Je me suis également beaucoup impliqué dans les enseignements. En effet, à la fin de mon DEA, en même temps qu'avec mon allocation ministérielle, un poste de moniteur du CIES de la Sorbonne m'a été attribué pour 3 ans. J'enseigne ainsi depuis bientôt 3 ans en première et deuxième années de médecine à la faculté de Reims. Je suis chargée de séances de TP (en première et deuxième année) et de TD depuis cette année (en première année). J'ai aussi grâce à ma directrice de thèse enseigné à la faculté de pharmacie (TP de quatrième année, cours magistraux de deuxième année) et pour les étudiants du DEA Biomolécules et dynamiques cellulaires de Reims (DEA que j'ai moi-même suivi). Cela m'a permis de développer une certaine assurance et d'autres aspects de ma personnalité que je ne soupçonnais pas (je peux être convaincante, impressionnante, sévère, exigeante...). Malgré la charge de travail supplémentaire à fournir, cette expérience a été très positive. J'estime que tous les doctorants devraient pouvoir se prêter à cet exercice.

Enfin, j'ai développé une certaine aisance à la prise de parole par le biais des enseignements mais aussi des communications orales de mon travail de thèse. De plus, le

CIES nous a permis de suivre une formation continue, proposant certaines options telles que la prise de parole en public (formation par le théâtre) et autoscopie de sa personnalité, auxquelles j'ai participé et qui m'ont permises de travailler sur ce point.

J'ai aussi amélioré mes capacités à la communication écrite grâce à la restitution de mes résultats sous forme de posters scientifiques ou encore d'articles scientifiques. De plus, j'ai la satisfaction personnelle d'avoir rédigé un projet de recherche en rapport avec mon sujet de thèse ayant été gratifié par la ligue de la Marne d'une aide financière de 10 000 euros.

En ma qualité de doctorante, j'ai également été amené à manager un stagiaire de DEA dès ma première année de thèse, puis 3 stagiaires de dentaire, 3 stagiaires de maîtrise et bientôt une stagiaire de BTS. Pour chacun d'entre eux, j'ai définis moi-même les sujets et les objectifs des stages, et je les ai encadrés seul jusqu'à leur soutenance.

Je me suis aussi beaucoup amélioré en informatique et en anglais, surtout en anglais scientifique.

En résumé, les différentes expériences vécues durant ma thèse m'ont permis de développer et d'utiliser différentes qualités personnelles :

- une adaptabilité rapide à mon sujet
- une grande autonomie
- une grande curiosité scientifique et technique
- un esprit d'analyse et de synthèse (notamment de mes résultats scientifiques)
- une faculté de créativité et d'innovation (pour les manipulations et aussi la création de posters scientifiques)
- une grande rigueur
- des compétences méthodologiques et organisationnelles
- une grande patience (surtout pour les enseignements face aux étudiants)
- une grande ouverture d'esprit
- un bon relationnel

#### **IV/ Conséquences notamment en termes de pistes professionnelles identifiées**

Après avoir pris conscience de tout cela, je me sens capable de beaucoup de choses. Néanmoins, trois possibilités s'ouvrent préférentiellement à moi : l'industrie, la recherche et/ou l'enseignement.

Mon état d'esprit aujourd'hui me dirige principalement vers la carrière d'enseignant-chercheur. Ce qui me permettrait de transmettre mes connaissances tout en mettant à profit ma curiosité scientifique dans un problème d'intérêt général. Seulement, j'ai conscience que le secteur est actuellement « un peu encombré » et très demandé. Il va me falloir certainement quelques années de patience avant de pouvoir acquérir un poste (si j'ai la chance d'en obtenir un). C'est pourquoi je prévois, en attendant, de continuer mes études. En effet, reprendre des études de pharmacie me permettrait sans doute d'obtenir un poste d'enseignant-chercheur plus facilement et de gravir plus rapidement les échelons (HDR, Professeur).

J'ai appris récemment la future construction d'un centre de l'INRA à Laon. Ma seconde perspective d'avenir est donc de passer le concours de l'INRA de l'année prochaine, de le réussir et d'intégrer ce nouveau centre de l'INRA qui aura certainement besoin de personnel.

Dans les deux cas de figure, je vais participer à la campagne d'ATER de la faculté de pharmacie de Reims. L'obtention d'un poste d'ATER me permettra de commencer mes études de Pharmacie ou de préparer mon concours de l'INRA tout en étant financé.

Après avoir discuté avec Monsieur Vistelle (Président des Universités de Reims) de mon projet de reprendre des études de Pharmacie. Il m'a appris que je devais passer le concours, mais que grâce à mon cursus particulier, la deuxième année me serait attribuée d'office et qu'une validation de la sixième année me serait accordée. Cela me semble raisonnable et me paraît très envisageable. Sachant que, j'aurais la possibilité dès la 3<sup>ème</sup> année de travailler en officine pour me faire un minimum d'argent pour vivre.