

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre INRS-Institut Armand-Frappier

Caractérisation du mécanisme d'action de PapMV et évaluation de son potentiel dans la lutte contre les infections et le cancer

Par

Marie-Ève Lebel

Thèse présentée pour l'obtention du grade
de Philosophiæ Doctor, (Ph.D)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	Pascale Duplay INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Daniel Lamarre Département de médecine CRCHUM - Université de Montréal
Examineur externe	Nathalie Grandvaux Département de biochimie et médecine moléculaire CRCHUM - Université de Montréal
Directeur de recherche	Alain Lamarre INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Le développement de vaccins sécuritaires capables de générer une réponse immunitaire cellulaire, essentielle pour protéger contre la plupart des infections persistantes et des cancers, est encore aujourd'hui un défi. Une des méthodes utilisées pour augmenter l'efficacité de ces vaccins est de les combiner avec un adjuvant. Cependant, encore peu d'adjuvants sont autorisés pour l'utilisation chez l'humain et ceux qui le sont ont un mécanisme d'action parfois mal défini et engendrent principalement une réponse immunitaire de type humoral. Ainsi, l'élaboration de nouveaux adjuvants et de nouvelles méthodes de vaccination ainsi que la compréhension de leur mécanisme d'action est cruciale pour réussir à prévenir ou traiter plusieurs maladies infectieuses ou encore le cancer. Parmi les nouveaux adjuvants et systèmes de vaccination en développement, un intérêt grandissant a récemment été observé pour les pseudoparticules virales (VLP) et les molécules immunomodulatrices comme les ligands de récepteur de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PRR). Notre équipe a démontré précédemment que les pseudoparticules du virus de la mosaïque de la papaye (PapMV), composées des protéines de capsid d'un virus de plante et d'un acide ribonucléique simple brin (ARNsb) non codant, sont hautement immunogéniques chez la souris. De plus, PapMV peut être utilisé comme plateforme vaccinale, en fusionnant à sa surface des épitopes d'un agent pathogène, ou comme adjuvant, en l'ajoutant à un vaccin existant. Dans ces contextes, une augmentation de la réponse immunitaire humorale spécifique aux antigènes vaccinaux a été obtenue. Dans cette étude, nous avons caractérisé le mécanisme d'action de PapMV et évalué son potentiel dans la lutte contre les infections et le cancer.

En utilisant un modèle d'immunisation chez la souris, nous avons démontré que le PapMV activait les cellules du système immunitaire via la liaison du récepteur de type Toll 7 (TLR7) par son ARNsb et la production d'interféron de type I (IFN-I) par les cellules dendritiques plasmacytoïdes. De plus, lorsque PapMV est ajouté comme adjuvant dans un modèle d'immunisation avec des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC) présentant le peptide de l'ovalbumine (OVA), cela permet d'augmenter le nombre de lymphocytes T CD8⁺ effecteurs et mémoires spécifiques, ce qui résulte en une meilleure protection contre une infection par *Listeria monocytogenes* exprimant OVA. Puis, nous avons évalué le potentiel de PapMV à améliorer l'immunothérapie du cancer dans un modèle de mélanome murin. Nous avons observé que l'administration de PapMV dans la tumeur modifie le microenvironnement tumoral, ce qui permet de réduire la croissance des tumeurs et d'augmenter la survie des souris. De plus, lorsque PapMV est combiné à d'autres traitements d'immunothérapie, il augmente leur potentiel thérapeutique. Enfin, bien que le système du complément semble impliqué dans la reconnaissance et la phagocytose du PapMV, l'absence de la protéine C3 du complément, amplifie le pouvoir adjuvant de PapMV en haussant la production d'IFN- α .

En conclusion, PapMV est un nouveau ligand de TLR7 avec de fortes propriétés immunomodulatrices qui pourraient être exploitées dans le développement de stratégies de vaccinations ou d'immunothérapies améliorées contre les maladies infectieuses et le cancer.

Mots clés : vaccination, immunothérapie, adjuvant, pseudoparticules virales, virus de la mosaïque de la papaye, système du complément, interféron alpha, TLR7, réponse immunitaire cellulaire

ABSTRACT

The development of safe vaccines capable of generating potent cellular immune responses, essential to protect against most chronic infections and cancer, is still a challenge. In order to increase their efficacy, adjuvants can be added to vaccines. However, very few adjuvants are currently authorized for human use and these mainly stimulate a humoral response and have a poorly defined mechanism of action. Therefore, the development of new adjuvants and vaccination strategies and understanding of their mechanism of action is of paramount importance to successfully fight against many life-threatening infectious diseases and cancer. Among the novel adjuvants and immunization systems in development, there is a growing interest for virus-like particles and immunomodulatory molecules such as pattern recognition receptors ligands. Our team demonstrated that papaya mosaic virus-like particles (PapMV), composed of the coat protein of a plant virus and a non-coding ssRNA, are highly immunogenic in mice. Moreover, PapMV can be used either as a vaccine delivery platform, through fusion of various epitopes to the coat protein, or as adjuvant, by adding it to existing vaccines. In these contexts, an increased humoral immune response specific to vaccine antigens was observed. In this study we characterized the mechanisms of action of PapMV and evaluate its potential in the fight against infectious diseases and cancer.

Using immunization studies in mice, we demonstrate that PapMV activates immune cells through the binding of Toll-like receptor 7 (TLR7) by its ssRNA and type I interferon (IFN-I) production by plasmacytoid dendritic cells. In addition, when PapMV is used as an adjuvant in a bone marrow derived dendritic cell-vaccination setting, an increased number of specific effector and memory CD8⁺ T cells is obtained, thus resulting in a better protection against an intracellular bacterial infection by *Listeria monocytogenes*. Then, we evaluated the potential of PapMV to improve cancer immunotherapy in a murine melanoma model. Administration of PapMV in the tumor alters the tumor microenvironment, reduces tumor growth and increases mice survival. In addition, when PapMV is combined with other immunotherapy treatments, it increases their therapeutic potential. Finally, although the complement system seems to be involved in the recognition and phagocytosis of PapMV, the absence of complement component C3, increases the adjuvant properties of PapMV through an increased production of IFN- α .

In conclusion, PapMV represents a novel TLR7 agonist with strong immunostimulatory properties that could be useful for the development of improved vaccination strategies against infectious diseases and cancer.

Keywords: vaccination, immunotherapy, adjuvant, virus-like particles, papaya mosaic virus, complement system, alpha interferon, TLR7, cellular immune response

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT.....	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xv
CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES	1
1- LA VACCINATION	3
1.1 Les vaccins vivants atténués.....	6
1.2 Les vaccins inactivés.....	7
1.3 Les vaccins sous-unitaires	7
2- LA RÉPONSE IMMUNITAIRE MÉDIÉE PAR LES LYMPHOCYTES T CD8 ⁺	9
2.1 Signal 1 : La présentation antigénique.....	10
2.2 Signal 2 : La co-stimulation	11
2.3 Signal 3 : Les cytokines.....	12
2.4 La réponse T CD8 ⁺ en contexte de vaccination	13
3- LES ADJUVANTS.....	19
3.1 Les systèmes de livraison	20
3.1.1 Les sels d'aluminium	20
3.1.2 Les émulsions	21
3.1.3 Les liposomes	23
3.1.4 Les pseudoparticules virales	24
3.1.5 Les anticorps	26
3.2 Les immunomodulateurs	27

3.2.1 Les ligands de PRR.....	27
3.3 La combinaison des adjuvants	30
3.4 L'utilisation des virus de plante en vaccination	32
3.4.1 Article 1 : Plant Viruses as Nanoparticle-Based Vaccines and Adjuvants	33
1. Introduction.....	34
2. Virus-Like Nanoparticles.....	35
3. Recombinant Plant Virus Particles (rPVP)	36
3.1. Production Methods.....	39
3.2. Antigen Expression on rPVP.....	40
3.3. rPVP as Vaccines to Induce Humoral Immune Responses.....	42
3.4. rPVP as Vaccines to Induce Cellular Immune Responses	43
3.5. rPVP Used as Immunomodulators and Adjuvants	44
4. Conclusions and Perspectives for rPVP	45
3.5 Les pseudoparticules du virus de la mosaïque de la Papaye	47
4- LE CANCER	51
4.1 Le mélanome	52
4.2 L'implication du système immunitaire dans le contrôle du cancer.....	52
4.2.1 Les cellules immunitaires intratumorales	54
4.2.2 L'effet du microenvironnement tumoral sur le contrôle des tumeurs	55
4.2.2.1 Les chimiokines et les cytokines tumorales.....	55
4.2.2.2 Les molécules co-stimulatrices et inhibitrices.....	57
4.2.2.3 Les mutations des cellules cancéreuses.....	58
4.3 L'immunothérapie du cancer	59
4.3.1 La thérapie cellulaire	60
4.3.1.1 L'immunisation à l'aide de cellules dendritiques.....	61
4.3.1.2 Le transfert de lymphocytes T CD8 ⁺	63

4.3.2 Le blocage de mécanismes inhibiteurs	65
4.3.3 L'administration de molécules immunomodulatrices	66
5- LE SYSTÈME DU COMPLÉMENT	69
5.1 Le mécanisme d'action du système du complément.....	71
5.2 Les outils permettant l'étude du complément.....	73
5.3 L'implication du système du complément dans la réponse immunitaire adaptative.....	74
5.4 Interactions entre les PRR et le système du complément.....	76
6. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS	79
CHAPITRE 2 : RÉSULTATS	81
1. ARTICLE 2 : Nanoparticle Adjuvant Sensing by TLR7 Enhances CD8 ⁺ T Cell-Mediated Protection From <i>Listeria Monocytogenes</i> Infection.....	83
1.1 Abstract.....	84
1.2 Introduction	85
1.3 Materials and Methods	86
1.4 Results.....	88
1.5 Discussion.....	95
1.6 Acknowledgements	98
1.7 Supplementary figures	99
2. ARTICLE 3 : Potentiating cancer immunotherapy using Papaya mosaic virus-derived nanoparticles	101
2.1 Abstract.....	102
2.2 Text.....	103
2.3 Methods	113
2.4 Supplementary figures	117
3. ARTICLE 4 : Complement component 3 controls IFN- α production by plasmacytoid dendritic cells following TLR7 activation by a plant virus-like nanoparticle.....	121
3.1 Abstract.....	122

3.2 Introduction	123
3.3 Materials and Methods	125
3.4 Results	127
3.5 Discussion.....	133
3.6 Supplementary figures	138
CHAPITRE 3 : DISCUSSION.....	141
1. LE MÉCANISME D'ACTION DE PPMV ET SA CAPACITÉ À AMÉLIORER L'EFFICACITÉ D'UN VACCIN À MÉDIATION CELLULAIRE	143
2. LE POTENTIEL DE PPMV DANS UN CONTEXTE D'IMMUNOTHÉRAPIE DU CANCER	149
3. L'IMPLICATION DU SYSTÈME DU COMPLÉMENT DANS LA RECONNAISSANCE ET LE POUVOIR IMMUNOGÉNIQUE DE PPMV	157
CONCLUSION	163
RÉFÉRENCES	167
ANNEXES.....	223

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Liste des vaccins autorisés pour l'utilisation chez l'humain.....	5
Tableau 2. Les adjuvants présentement autorisés pour l'utilisation chez l'humain	19
Tableau 3. Exemples d'immunothérapies du cancer approuvées.....	60
Tableau 4. Liste des protéines du complément et de leur fonction	69

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES

Figure 1. Expérience de Louis Pasteur sur le choléra de poule.....	4
Figure 2. Le développement de la réponse T CD8 ⁺	10
Figure 3. Les différents types de lymphocytes T CD8 ⁺	10
Figure 4. La signalisation TLR.....	28
Figure 5. Les récepteurs antigéniques chimériques (CAR)	65
Figure 6. Les voies d'activation du complément.....	72

ARTICLE 2

Figure 1. TLR7, MYD88, IRF5/7 and IFNAR are essential for the activation of murine splenocytes by PapMV.....	90
Figure 2. TLR7 and MYD88 are important for the humoral response generated following PapMV nanoparticle immunization.	91
Figure 3. PapMV administration increases the number of OVA-specific effector and memory CD8 ⁺ T cells generated by BMDC-OVA immunization.....	93
Figure 4. PapMV increases the quality of the immune response generated by BMDC-OVA vaccination and protection against LM-OVA.....	94
Figure S1. PapMV nanoparticles induce the activation of a broad range of immune cells in mice.	99
Figure S2. Kinetics of IFN- α (A) and IL-6 (B) production in serum and spleen of WT mice following immunization with PapMV by ELISA.	100
Figure S3. PapMV administration s.c. increases the OVA-specific effector CD8 ⁺ T cell immune response generated by BMDC-OVA s.c. immunization.	100

ARTICLE 3

Figure 1. PapMV treatment decreases the growth rate of B16-OVA melanoma tumors and increases survival.	105
---	-----

Figure 2. PapMV administration induces chemokine/cytokine production and tumor immune-cell infiltration.	107
Figure 3. Systemic PapMV administration reduces B16-OVA metastasis implantation in the lungs.	109
Figure 4. PapMV administration potentiates the therapeutic effect of dendritic cell-based vaccination and PD-1 blockade.	110
Figure 5. Combined PapMV and anti-PD-1 antibody treatment increases the functionality of infiltrating CD8 ⁺ T cells.	112
Figure S1. Physicochemical and cytotoxic properties of PapMV.	117
Figure S2. PapMV is predominantly found associated with phagocytic cells following administration.	118
Figure S3. Systemic administration of PapMV induces the production of IL-12p40 and IFN- α but not of other pro-inflammatory cytokines.	119
Figure S4. TLR7- and nanoparticle-dependent therapeutic and immune stimulating properties of PapMV.	120
ARTICLE 4	
Figure 1. Complement proteins bind to PapMV and are implicated in its phagocytosis.	128
Figure 2. Complement depletion increases immune cells activation and IFN- α production following PapMV immunization.	130
Figure 3. Complement inactivation increases the immunomodulatory properties of PapMV. ...	132
Figure 4: Absence of the complement component 3 is responsible for the increased IFN- α production and immune cell activation observed after CVF injection.	133
Figure S1.	138
Figure S2.	139
CHAPITRE 3 : DISCUSSION	
Figure 7. Mécanisme d'action du PapMV.	144
Figure 8. PapMV est un adjuvant efficace pour augmenter la réponse T CD8 ⁺	147
Figure 9. L'administration de PapMV dans la tumeur modifie le microenvironnement tumoral.	151

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AICD	Mort induite par l'activation
APC	Cellules présentatrices d'antigènes
ARNm	Acide ribonucléique messagers
ARNsb	Acide ribonucléique simple brin
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD</i>
BCR	Récepteur des cellules B
BMDC	Cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse
CAR	Récepteur antigénique chimérique
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CpG ODN	Oligodeoxynucleotides contenant des motifs CpG non méthylés
CTL	Lymphocytes T CD8 ⁺ cytotoxiques
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DAF	<i>Decay-accelerating factor</i>
DAMP	Motifs moléculaires associés au danger
DC	Cellules dendritiques
EBV	Virus d'Epstein-Barr
EMA	Agence européenne des médicaments
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
fDC	Cellules dendritiques folliculaires
FVC	Facteur de venin de cobra
GLA	Glucopyranosyl Lipid Adjuvant
GM-CSF	Facteur de croissance des granulocytes et macrophages
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>

IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN-I	Interféron de type I
IL	Interleukine
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
ISCOMs	Complexe immunostimulateur
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
KLRG1	<i>Killer-cell lectin like receptor G1</i>
LCMV	Virus de la chorioméningite lymphocytaire
LM	<i>Listeria monocytogenes</i>
MAC	Complexe d'attaque membranaire
MBL	<i>Mannose binding lectine</i>
MDSC	Cellules myéloïdes suppressives
MHV	Virus de l'hépatite murine
MPEC	Cellules effectrices précurseurs de mémoire
MPL	Monophosphoryl lipid A
NK	Cellules tueuses naturelles
OLS	Organe lymphoïde secondaire
OVA	Ovalbumine
PAMPS	Motifs associés aux pathogènes
PapMV	Pseudoparticules du virus de la mosaïque de la papaye
PBMC	Cellules mononucléaires périphériques du sang
PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
pDC	Cellules dendritiques plasmacytoïdes
PGE2	Prostaglandine E2
PRR	Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
SLEC	Cellules effectrices à courte vie

TAA	Antigènes associés aux tumeurs
T _{CM}	Cellules mémoires centrales
TCR	Récepteur des lymphocytes T
T _{EM}	Cellules mémoires effectrices
TGF- β	Facteur de croissance transformant bêta
Th	Lymphocytes T CD4 ⁺ auxiliaires
TIL	Lymphocytes T infiltrant la tumeur
TLR	Récepteur de type Toll
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale alpha
TRAIL	Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
T _{reg}	Cellules T régulatrices
T _{RM}	Cellules mémoires résidentes
T _{SCM}	Cellules souches mémoires
VLP	Pseudoparticules virales
VPH	Virus du papillome humain
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire
VV	Virus de la vaccine

CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES

1- LA VACCINATION

Bien que des écrits rapportent des pratiques similaires à la vaccination depuis le XVI^e siècle en Chine, ce n'est qu'en 1796 avec Edward Jenner que le concept de vaccination a été introduit. En effet, un enfant, préalablement inoculé avec le virus de la vaccine, a été protégé d'une infection subséquente par le virus de la variole, démontrant pour la première fois l'efficacité de ce procédé (Riedel, 2005). Par la suite, les travaux se sont concentrés, avec Louis Pasteur et Robert Koch principalement, sur la compréhension du principe d'action de la vaccination et de la relation entre les agents pathogènes et les maladies observées. Par exemple, lors d'une étude effectuée par Louis Pasteur sur le choléra de poule, une erreur a mené à une meilleure compréhension de la vaccination (figure 1). C'est donc en utilisant une vieille culture de bactéries oubliée sur le comptoir qu'il a démontré que des poulets ayant préalablement été inoculés avec une culture de bactéries affaiblies étaient protégés contre une infection normalement mortelle (Pasteur, 1880). La suite des recherches effectuées par Louis Pasteur et Robert Koch leur ont permis d'être reconnus, entre autre, pour l'établissement de la théorie des germes et le développement du vaccin contre la rage (Pasteur, 1885) ainsi que l'élaboration des postulats de Koch respectivement. Il existe maintenant plus de 25 vaccins autorisés et utilisés de façon courante afin de prévenir bon nombre d'infections virales et bactériennes (Tableau 1). La vaccination est un procédé qui vise à préparer le système immunitaire à lutter contre les agents pathogènes. Pour ce faire, les vaccins vont contenir des formes affaiblies ou inactivées des microorganismes contre lesquels le système immunitaire va développer une réponse. Ainsi, lorsque le corps sera infecté par l'agent pathogène visé par le vaccin, les anticorps préformés pourront neutraliser le microorganisme et les lymphocytes B et T mémoires seront rapidement réactivés, ce qui va permettre au système immunitaire de contrôler l'infection, souvent avant même le développement des symptômes. Les vaccins traditionnels couramment utilisés chez l'humain peuvent être classifiés en trois grandes classes ; 1- vivant atténué, 2- inactivé et 3- sous-unitaire.

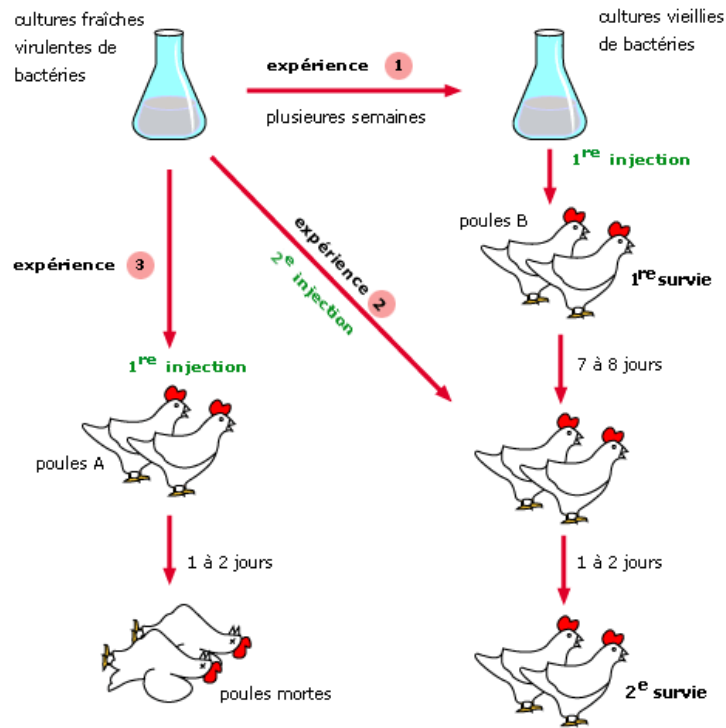


Figure 1. Expérience de Louis Pasteur sur le choléra de poule.

Le choléra de poule est une maladie causée par une bactérie, *Pasteurella multocida*, qui engendre la mort des poules en un à deux jours. Lors de ses études, Louis Pasteur administra une vieille culture de bactéries aux poules (expérience 1). Ces dernières tombèrent légèrement malades, mais survécurent. Par la suite (expérience 2), Louis Pasteur inocula les poules ayant guéri avec une culture fraîche, virulente, et les poules ont été protégées contre l'infection, alors que les poules n'ayant pas préalablement reçu la vieille culture de bactérie sont mortes (expérience 3). Ces travaux démontrent que l'administration de culture de bactéries affaiblies permet de vacciner contre une maladie mortelle.

Tableau 1. Liste des vaccins autorisés pour l'utilisation chez l'humain.

Compilation de sources diverses dont Pantaleo et Koup, 2004 et Agence de Santé Publique du Canada

Maladies	Année de développement du premier vaccin	Type de vaccin	Immunité engendrée par le vaccin	Mécanisme immunitaire pour contrôler l'infection
Variole	1798	Vivant atténué	Anticorps, CTL	CTL
Rage	1885	Inactivé	Anticorps	Anticorps, CD4, CTL
Fièvre typhoïde	1896	<u>Vivant atténué</u> Sous-unitaire	<u>Anticorps et CTL</u> Anticorps	Anticorps, CTL
Choléra	1896	Inactivé	Anticorps	Anticorps
Diphthérie	1923	Sous-unitaire	Anticorps	Anticorps
Tétanos	1926	Sous-unitaire	Anticorps	Anticorps
Tuberculose	1927	Vivant atténué	CD4, CTL	CD4, CTL
Fièvre jaune	1935	Vivant atténué	Anticorps	Anticorps
Grippe (Influenza)	1945	<u>Vivant atténué</u> Inactivé	<u>Anticorps, CD4 et CTL</u> Anticorps	Anticorps, CD4, CTL
Polio	1955	Vivant atténué ou Inactivé	Anticorps	Anticorps
Coqueluche	1915	Inactivé Sous-unitaire	Anticorps	Anticorps
Rougeole	1963	Vivant atténué	Anticorps	Anticorps
Oreillons	1967	Vivant atténué	Anticorps	Anticorps
Rubéole	1969	Vivant atténué	Anticorps	Anticorps
Méningite à méningocoques	1974	Sous-unitaire	Anticorps	Anticorps
Infections à pneumocoques	1977	Sous-unitaire	Anticorps	Anticorps
Encéphalite à tique	1981	Inactivé	Anticorps	Anticorps
Hépatite B	1981	Sous-unitaire	Anticorps	Anticorps, CD4, CTL
Infection par <i>Haemophilus influenzae</i>	1985	Sous-unitaire	Anticorps	Anticorps
Encéphalite Japonaise	1992	Inactivé	Anticorps	Anticorps
Varicelle	1995	Vivant atténué	Anticorps, CTL	Anticorps, CTL
Hépatite A	1995	Inactivé	Anticorps	Anticorps, CD4, CTL
Diarrhée à rotavirus	1998	Vivant atténué	Anticorps	Anticorps
Infection par le virus du papillome humain	2006	Sous-unitaire	Anticorps	CD4, CTL
Zona	2006	Vivant atténué	Anticorps	Anticorps

1.1 Les vaccins vivants atténués

Dans les vaccins de type vivant atténué, les pathogènes ciblés ont été altérés et rendus inoffensifs par différentes méthodes afin que notre système immunitaire puisse les contrôler rapidement. Par exemple, il est possible de modifier génétiquement les agents pathogènes afin de diminuer leurs virulences. C'est le cas du vaccin contre la fièvre typhoïde qui est constitué d'une bactérie modifiée génétiquement caractérisée par sa production réduite de LPS (Germanier *et al.*, 1983, Williams *et al.*, 1974). L'atténuation peut aussi s'effectuer par la méthode de passage. Cette méthode consiste à cultiver l'agent pathogène dans des conditions différentes de celles de notre corps. C'est le cas du vaccin contre la fièvre jaune et celui contre l'influenza administré par voie intra-nasale. Dans le premier cas, le virus a été passé *in vitro* plus de 200 fois dans des cellules de différentes espèces animales (singe, souris, poulet) afin de le modifier suffisamment pour le rendre inoffensif (Theiler *et al.*, 1937a, Theiler *et al.*, 1937b). Pour ce qui est du vaccin contre la grippe, le virus a été sélectionné pour se répliquer à une température plus faible que 37°C, ce qui fait en sorte qu'il se réplique uniquement dans les voies respiratoires supérieures et qu'il n'est pas en mesure d'infecter les voies respiratoires inférieures, limitant par le fait même sa capacité à causer la grippe (Belshe *et al.*, 2004). En outre, il est aussi possible d'utiliser des microorganismes affectant normalement les animaux. Ceux-ci sont moins bien adaptés à la répllication dans les cellules humaines, mais expriment des antigènes suffisamment similaires pour mener à une protection croisée contre les pathogènes humains. À titre d'exemple, les vaccins contre la tuberculose et la variole sont développés à partir d'agents pathogènes affectant les bovins soit *Mycobacterium bovis* et le virus de la vaccine (Cowpox). Dans les vaccins de type vivant atténué, les microorganismes utilisés sont hautement immunogéniques, c'est à dire qu'ils engendrent une forte réponse du système immunitaire. Conséquemment, lorsqu'ils sont comparés à leurs équivalents inactivés ou sous-unitaires, les vaccins de type vivant atténué sont généralement les seuls à être en mesure d'engendrer une réponse immunitaire cellulaire en plus de la réponse humorale et d'octroyer une protection croisée contre des agents pathogènes similaires (X. Cheng *et al.*, 2013, He *et al.*, 2006, Salerno-Goncalves *et al.*, 2002, Wahid *et al.*, 2015). Cependant, ces vaccins ont l'inconvénient de présenter un certain risque de réversion vers un pathogène virulent, en plus de permettre, dans certains cas, le développement de maladies. En effet, lorsque les microorganismes utilisés présentent peu de mutations ou sont constitués d'une population hétérogène, la pression de sélection, combinée aux mutations survenant lors du processus de répllication peuvent mener à

l'émergence de microorganismes mieux adaptés ayant retrouvé leur virulence. En outre, puisqu'ils conservent la capacité de se répliquer, le système immunitaire doit intervenir rapidement afin de contenir les microorganismes et de limiter le développement de symptômes. C'est pourquoi ils ne peuvent généralement pas être utilisés chez les personnes immunosupprimées (Agence de la santé publique du Canada, 2013, Mossad, 2003). Les vaccins constitués de microorganismes vivants atténués comprennent entre autres le vaccin contre la polio de type Sabin, qui est donné par voie orale, le vaccin contre la grippe administré par la voie nasale ou encore les vaccins contre la rougeole, la rubéole et la varicelle.

1.2 Les vaccins inactivés

Pour ce qui est des vaccins de type inactivé, les pathogènes subissent différents traitements qui visent à les rendre incapables de se répliquer. Ces vaccins sont donc plus sécuritaires que ceux constitués de microorganismes vivants atténués. Les traitements utilisés comprennent : la chaleur, la fragmentation, les modifications génétiques ou encore l'utilisation de produits chimiques. Par exemple, les virus inclus dans le vaccin FLUVIRAL[®] contre la grippe sont dans un premier temps inactivés par la lumière UV, subissent ensuite un traitement au formaldéhyde et sont fragmentés à l'aide de sodium deoxycholate (GlaxoSmithKline, 2015). Dans le cas du vaccin contre la rage IMOVAX[®] Rabies, le virus est inactivé par un traitement au bêta-Propiolactone (sanofi pasteur, 2006). Ces procédés ont cependant le désavantage de pouvoir dénaturer les protéines vaccinales et de diminuer l'immunogénicité des vaccins, rendant l'administration de rappels ou l'utilisation d'adjuvant parfois nécessaire pour octroyer une protection adéquate. Le vaccin contre l'influenza administré par la voie intra-musculaire, celui contre la polio de type Salk, contre la rage ou encore contre l'hépatite A en sont quelques exemples.

1.3 Les vaccins sous-unitaires

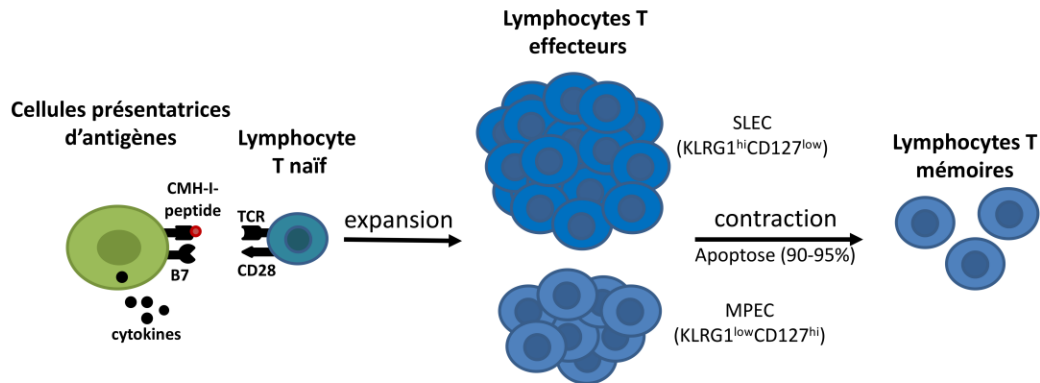
Enfin, dans le cas des vaccins de type sous-unitaire, seulement des antigènes ou encore des petits fragments du pathogène sont inclus dans le vaccin. Il n'y a donc aucune chance qu'une maladie se développe suite à l'administration de ce type de vaccin. Cependant, des recherches approfondies doivent être effectuées afin de sélectionner judicieusement les antigènes qui seront inclus dans le vaccin pour conférer une protection contre la maladie. De plus, ces vaccins

sont généralement très faiblement immunogéniques et nécessitent plusieurs rappels ainsi que l'ajout d'adjuvant pour assurer leur efficacité. Les vaccins dans cette catégorie sont assez divers ; ils contiennent des toxines détoxifiées (anatoxines), des molécules de surface de microorganismes ou sont constitués de pseudoparticules virales ou d'ADN. Il s'agit par exemple, des vaccins contre le tétanos, l'hépatite B et le virus du papillome humain. Ainsi, le vaccin ADACEL[®], permettant de protéger contre la diphtérie, le tétanos et la coqueluche, est composé des anatoxines tétanique, diphtérique et pertussique et de composants acellulaire de *Bordetella pertussis* comme des fimbriaes. De plus, ce vaccin est combiné à l'adjuvant aluminum phosphate et doit être administré tous les 10 ans afin de maintenir une protection (sanofi pasteur, 2012b). Quant à lui, le vaccin Act-HIB[®] contre la méningite bactérienne à *Haemophilus influenzae*, qui contient des polysaccharides purifiés conjugués à l'anatoxine diphtérique, doit être administré à quatre reprises pour atteindre des titres d'anticorps suffisamment élevés pour procurer une protection durable (sanofi pasteur, 2012a).

En somme, la majorité des vaccins présentement utilisés chez l'humain engendrent une réponse de type humorale. La production d'anticorps neutralisant les agents pathogènes est d'ailleurs suffisante pour protéger contre plusieurs infections et a fait le succès de nombreux vaccins (Tableau 1). Cependant, dans le cas de certaines maladies comme l'hépatite C, la malaria ou le cancer, la réponse immunitaire cellulaire et plus particulièrement les lymphocytes T CD8⁺ sont nécessaires au contrôle de la maladie (Moorthy *et al.*, 2002, Seder *et al.*, 2000, Young *et al.*, 2002). Il y a donc une nécessité de créer de nouvelles méthodes de vaccination qui permettent d'engendrer le développement d'une réponse cellulaire en plus de la réponse humorale.

2- LA RÉPONSE IMMUNITAIRE MÉDIÉE PAR LES LYMPHOCYTES T CD8⁺

Lorsque l'organisme fait face à un agent pathogène intracellulaire, des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques sont générés. Ce processus (figure 2) débute par la présentation des antigènes du microorganisme par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) aux lymphocytes T naïfs. Cette interaction mène à une phase d'expansion durant laquelle les lymphocytes T naïfs vont proliférer et se différencier en lymphocytes T effecteurs qui contribueront alors à l'élimination du pathogène. La population de cellules T CD8⁺ effectrices se divise en deux principaux sous-groupes : les cellules effectrices précurseurs de mémoire (MPEC) et les cellules effectrices à courte vie (SLEC). Comme leur nom le dit, les premières auront tendance à survivre pour former la population de cellules mémoires, alors que les secondes vont préférentiellement mourir par apoptose après avoir effectué leurs fonctions effectrices. Ces populations sont différenciées par l'expression du récepteur de l'interleukine 7 (IL-7), le CD127 et le KLRG1 (killer-cell lectin like receptor G1) (Joshi *et al.*, 2007, Kaech *et al.*, 2003); les SLEC étant caractérisés par une forte expression de KLRG1 et une faible expression de CD127 tandis que les MPEC sont KLRG1^{low}CD127^{hi}. Suivant l'élimination du pathogène, il y a une phase de contraction où la majorité des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs vont mourir par apoptose et seulement 5 à 10% vont survivre pour former la population de lymphocytes T CD8⁺ mémoires fonctionnels. Ainsi, lors d'une réinfection, les cellules T CD8⁺ mémoires spécifiques à l'antigène pourront rapidement contrôler l'infection. Cela leur est possible car la quantité de cellules spécifiques à l'antigène est plus grande (Murali-Krishna *et al.*, 1998), que ces dernières ont une capacité de réponse plus rapide (Bachmann *et al.*, 1999, Veiga-Fernandes *et al.*, 2000) et qu'elles sont situées à des endroits clés permettant une réponse efficace (Sallusto *et al.*, 1999, Weninger *et al.*, 2001). Les lymphocytes T CD8⁺ mémoires sont elles aussi divisées en sous-populations de cellules (figure 3) soit les cellules mémoires effectrices (T_{EM}) qui migrent dans les tissus inflammés pour effectuer rapidement leurs fonctions effectrices (Masopust *et al.*, 2001, Sallusto *et al.*, 1999), les cellules mémoires centrales (T_{CM}) qui restent dans les organes lymphoïdes secondaires et qui ont peu de capacités effectrices, mais un grand pouvoir de division afin d'assurer une expansion cellulaire suffisante en cas de réinfection (Sallusto *et al.*, 1999), les cellules mémoires résidentes (T_{RM}) dans les tissus qui ne recirculent pas et peuvent agir rapidement au site d'infection (Schenkel *et al.*, 2014) et les cellules souches mémoires (T_{SCM}), des cellules pluripotentes capables d'auto-renouvellement (Gattinoni *et al.*, 2011).



Signaux requis

- 1- Reconnaissance de l'antigène (CMH-I-peptide : TCR)
- 2- Co-stimulation (B7 : CD28)
- 3- Cytokines (IL-12, IFN- α ...)

Figure 2. Le développement de la réponse T CD8⁺

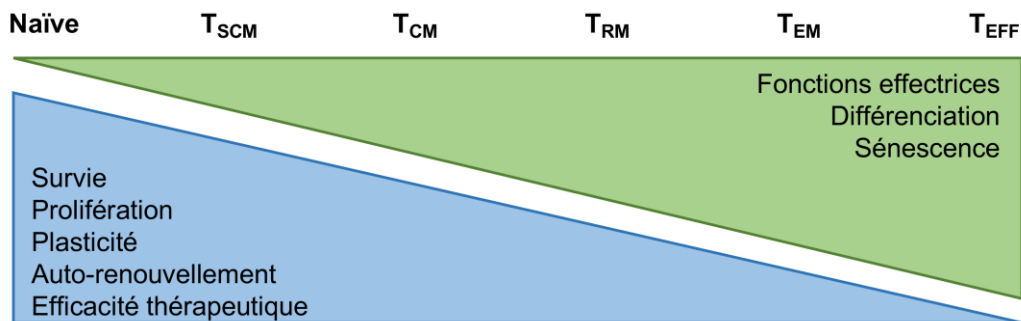


Figure 3. Les différents types de lymphocytes T CD8⁺
Adaptée de Purushe *et al.*, 2016 et Gattinoni *et al.*, 2013

2.1 Signal 1 : La présentation antigénique

Afin que le processus de génération de la réponse T CD8⁺ se déroule adéquatement, plusieurs éléments sont nécessaires. Tout d'abord, les antigènes doivent être présentés au niveau du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) afin de pouvoir interagir avec le récepteur des lymphocytes T CD8⁺ (TCR). Cela peut se faire de trois façons. D'une part, les cellules présentent constamment les antigènes endogènes au niveau du CMH-I. Ainsi, lorsqu'un agent pathogène infecte une cellule et s'y réplique, les antigènes du microorganisme qui y sont générés peuvent entrer dans la voie de présentation des antigènes endogènes sur le CMH-I.

Cependant, lorsque les cellules présentatrices d'antigènes, comme les cellules dendritiques (DC) et les macrophages, ne sont pas infectées par l'agent pathogène, la présentation des antigènes doit se faire par la voie de la présentation croisée (Sigal *et al.*, 1999, Yewdell *et al.*, 1999). Il existe deux principales voies de présentation croisée soit la voie cytosolique et la voie vacuolaire (Joffre *et al.*, 2012). Dans la première, la cellule présentatrice d'antigène va phagocytter le microorganisme, puis les antigènes seront exportés dans le cytosol pour être dégradés par le protéasome et présentés sur le CMH-I grâce au transporteur TAP. Dans la seconde voie, les antigènes sont plutôt dégradés dans le phagosome et présentés, sans l'aide de TAP, sur un CMH-I situé dans la même vacuole suite au recyclage à partir de la surface ou provenant du réticulum endoplasmique. Cependant, lorsque les APC phagocytent des antigènes, ceux-ci sont normalement présentés sur le CMH-II. Enfin, un troisième processus, le *cross-dressing*, a été identifié récemment et contribue à la présentation des antigènes sur le CMH-I des cellules présentatrices d'antigènes. Le *cross-dressing* consiste au transfert, via le processus de trogocytose, de CMH-I chargée avec un peptide d'une cellule à une autre. Ainsi, une cellule infectée par un agent pathogène peut transférer des complexes CMH-I-peptide microbien à une cellule présentatrice d'antigène afin de mener au développement d'une réponse immunitaire cellulaire (Dolan *et al.*, 2006, L. Li *et al.*, 2012, Wakim *et al.*, 2011).

2.2 Signal 2 : La co-stimulation

Un second élément essentiel à la génération d'une réponse cellulaire fonctionnelle est le signal de co-stimulation. En effet, en absence de signal de co-stimulation, la présentation antigénique aux lymphocytes T CD8⁺ mènera au développement d'anergie et de tolérance (Hawiger *et al.*, 2001). Il y a plusieurs récepteurs qui peuvent induire un signal de co-stimulation, mais le plus important et le plus étudié est le CD28 exprimé sur les lymphocytes T. Ce dernier interagit avec les molécules de la famille B7 telles que CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) dont l'expression à la surface des APC est augmentée suite à une activation. La signalisation par le CD28 a plusieurs effets au niveau des lymphocytes T CD8⁺. En fait, la liaison du CD28 par son ligand augmente la production d'IL-2 (Fraser *et al.*, 1991, Shapiro *et al.*, 1997), une cytokine importante pour la prolifération des lymphocytes T lors de la phase d'expansion (D'Souza *et al.*, 2003, Or *et al.*, 1992) ainsi que l'induction des fonctions cytolytiques (Pipkin *et al.*, 2010). De plus, la signalisation par le CD28 est importante pour la formation de la synapse immunologique en entraînant des modifications au niveau du cytosquelette de la cellule (Tavano *et al.*, 2006). Enfin, l'interaction du CD28 avec son ligand résulte en une prolifération et une survie accrue des

cellules suite à l'induction du facteur anti-apoptotique Bcl-xL (Boise *et al.*, 1995). Ainsi, en absence de signalisation par le CD28, les lymphocytes T CD8⁺ meurent rapidement par apoptose ou deviennent anergique (Boise *et al.*, 1995, F. A. Harding *et al.*, 1992, Linsley *et al.*, 1993).

2.3 Signal 3 : Les cytokines

Enfin, la production des messagers appropriés, qui assure la communication entre les cellules, peut aussi avoir un impact considérable sur le développement de la réponse cellulaire. En fait, les cytokines sont considérées comme étant le 3^e signal nécessaire au développement de la réponse T CD8⁺ (Curtsinger *et al.*, 1999). Ainsi, il a été démontré *in vitro*, en substituant les APC par des billes présentant les antigènes, que la stimulation antigénique devait être accompagnée d'IL-2 et d'IL-12 pour engendrer une prolifération des lymphocytes T CD8⁺ (Curtsinger *et al.*, 1999). Par la suite, des études ont établi que l'IL-12 et l'interféron de type I avaient un impact similaire sur les lymphocytes T CD8⁺ *in vivo* (Curtsinger *et al.*, 2005, Pham *et al.*, 2011). En effet, en contexte d'infection avec le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), l'absence de signalisation du récepteur de l'IFN-I sur les lymphocytes T CD8⁺, réduit l'expansion clonale de ces cellules de 99% dû à un problème de survie et réduit le pouvoir cytolytique des cellules (Curtsinger *et al.*, 2005, Kolumam *et al.*, 2005). Cependant, la dépendance à l'IFN-I n'est pas la même selon le microorganisme utilisé (L. J. Thompson *et al.*, 2006). En fait, dans le cas d'une infection par LCMV, l'IFN-I est la cytokine nécessaire pour le développement de la réponse T CD8⁺ alors que c'est plutôt l'IL-12 dans un contexte d'infection par *Listeria monocytogenes* (LM) ou vaccinia virus (VV) (Kolumam *et al.*, 2005, L. J. Thompson *et al.*, 2006, Xiao *et al.*, 2009). En outre, le rôle des cytokines pro-inflammatoires passe aussi par l'augmentation de l'expression du récepteur de l'IL-2, le CD25, ce qui permet de maintenir la division des cellules lors de la phase d'expansion (Starbeck-Miller *et al.*, 2014). En plus d'être nécessaire au développement de la réponse T CD8⁺, la quantité de cytokines pro-inflammatoires auxquels sont exposés les lymphocytes T peut avoir un impact majeur sur le phénotype des cellules effectrices et mémoires générées. Par exemple, il a été démontré que la présence de cytokines inflammatoires au moment de la stimulation antigénique augmente l'expression du facteur de transcription T-bet et mène à une plus grande génération de SLEC (Joshi *et al.*, 2007, Wiesel *et al.*, 2012). Après la phase d'expansion et de génération des cellules effectrices vient la phase de contraction. Cette dernière est aussi influencée par la présence de cytokines. Par exemple, l'IL-15 et l'IL-7 sont importantes pour limiter la mort des cellules en augmentant l'expression de

Bcl-2, un facteur anti-apoptotique. (Schluns *et al.*, 2000, Yajima *et al.*, 2006). Enfin, la population de lymphocytes T CD8⁺ mémoires est maintenue en absence de stimulation antigénique grâce à la production d'IL-7 et d'IL-15 qui vont promouvoir leur survie et leur auto-renouvellement (Tan *et al.*, 2002). En effet, l'IL-7 régule la survie en augmentant l'expression de Bcl-2, alors que l'IL-15 est importante pour le maintien de la population de cellules mémoires (Becker *et al.*, 2002, Carrio *et al.*, 2007, Osborne *et al.*, 2007). Ainsi, les cytokines peuvent influencer les étapes d'expansion, de contraction et de formation de la mémoire des cellules T CD8⁺.

2.4 La réponse T CD8⁺ en contexte de vaccination

La création de vaccin engendrant une réponse T CD8⁺ adéquate est encore aujourd'hui un défi. Cependant, plusieurs études ont identifié des éléments importants afin de favoriser ce type de réponse. En premier lieu, la génération d'une réponse immunitaire cellulaire lors d'une vaccination requiert la présentation des antigènes vaccinaux par le CMH-I. Dans la majorité des cas, les antigènes vaccinaux sont exogènes et doivent passer par le processus de présentation croisée pour être en mesure d'activer les lymphocytes T CD8⁺. Afin de favoriser ce type de présentation antigénique dans un contexte de vaccination, plusieurs éléments sont à considérer. D'une part, il a été démontré que lorsque les vaccins contiennent des antigènes sous forme particulière ou agrégée, la phagocytose de ces antigènes ainsi que leur présentation au niveau du CMH-I sont facilitées, ce qui résulte en une meilleure réponse immunitaire cellulaire (C. V. Harding *et al.*, 1994, Kastenmuller *et al.*, 2011, Mant *et al.*, 2012). De plus, la production d'IFN-I favorise la présentation croisée par les DC ainsi que la génération d'une réponse T CD8⁺ efficace (Durand *et al.*, 2006, Le Bon *et al.*, 2006, Le Bon *et al.*, 2003, Le Bon *et al.*, 2008, Spadaro *et al.*, 2012). D'ailleurs, les DC sont les cellules immunitaires les plus compétentes pour effectuer ces processus *in vivo* (Jung *et al.*, 2002) bien que d'autres cellules comme les macrophages et les lymphocytes B aient démontré une certaine capacité dans des expériences *in vitro* (Huang *et al.*, 1994, Ke *et al.*, 1996, Norbury *et al.*, 1995). En outre, il semble que la capacité des différents types de cellules dendritiques à activer de façon croisée les lymphocytes T CD8⁺ ne soit pas équivalente, les DC CD8⁺ et CD103⁺ étant les plus efficaces (Bedoui *et al.*, 2009, den Haan *et al.*, 2000, L. Li *et al.*, 2012). Il serait donc intéressant de cibler la phagocytose des antigènes vaccinaux par ces cellules. Tel que décrit dans la section précédente, l'activation des cellules présentatrices d'antigènes est aussi nécessaire au bon développement de la réponse immunitaire cellulaire puisque les lymphocytes T CD8⁺ requièrent un signal de co-stimulation pour être pleinement fonctionnels (F. A. Harding *et al.*, 1992) et que

l'activation des APC peut mener à l'augmentation de la présentation antigénique en plus de l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation (Siddiqui *et al.*, 2011). En fait, l'activation des récepteurs de type Toll peut aussi mener à l'accumulation de CMH-I au niveau des endosomes, favorisant ainsi la présentation croisée des antigènes phagocytés (Nair-Gupta *et al.*, 2014). Enfin, le niveau de cytokines pro-inflammatoires engendré par le vaccin peut aussi avoir des répercussions importantes sur l'efficacité du vaccin. Par exemple, dans un contexte de vaccination en présence de peu d'inflammation, comme lors d'une immunisation avec des DC chargées avec un peptide, la proportion de cellules T CD8⁺ affichant un phénotype précurseur de mémoire est plus élevée et la formation de cellules mémoires est accélérée (Badovinac *et al.*, 2005), ce qui est intéressant dans un contexte où la rapidité à laquelle la protection se développe importe. En revanche, lorsqu'on ajoute au vaccin une molécule qui induit la production d'IFN-I et/ou d'IL-12, cela permet d'augmenter la génération de lymphocytes T CD8⁺ effecteurs spécifiques à l'antigène, mais cela augmente aussi la proportion de SLEC et donc n'augmente pas nécessairement la mémoire et la protection à long terme (Badovinac *et al.*, 2005, Cui *et al.*, 2009, Joshi *et al.*, 2007). L'équipe de John Harty a aussi découvert que la présence de cytokines pro-inflammatoires pouvait accroître la sensibilité individuelle des lymphocytes T CD8⁺ en augmentant la signalisation TCR, ce qui réduit la densité d'antigène nécessaire pour engendrer une réponse T CD8⁺ efficace et donc peut avoir un impact majeur sur la conception des vaccins à médiation cellulaire (Richer *et al.*, 2013).

À la lumière de ces recherches, il semble donc que l'ajout d'un adjuvant qui induit l'activation des APC, dont les DC, et la production d'IFN-I à un vaccin dont les antigènes sont sous forme particulaire est prometteur pour générer une réponse immunitaire cellulaire efficace. D'ailleurs, l'équipe de Robert Seder a démontré qu'il était possible de générer une réponse cellulaire protectrice en utilisant un ligand de TLR7/8 comme adjuvant avec des antigènes vaccinaux sous forme agrégée (Kastenmuller *et al.*, 2011) ou encore la combinaison d'un ligand de TLR3 avec des antigènes formulés en complexe immunostimulateur (ISCOMs) (Quinn *et al.*, 2013). Dans ces deux situations, le choix de la formulation et l'utilisation de molécules immunostimulatrices permet d'augmenter la phagocytose des antigènes, de favoriser leur présentation sur le CMH-I et d'engendrer la production d'IFN-I et d'IL-12 ce qui favorise le développement de la réponse immunitaire cellulaire et résulte en une meilleure protection contre l'infection par LM ou VV au stade mémoire.

Comme le principe de la vaccination repose sur la formation d'une réponse mémoire fonctionnelle, une attention particulière devrait être portée sur les facteurs qui peuvent influencer

la formation et la fonction des cellules T CD8⁺ mémoires. Par exemple, bien que la présence d'inflammation peut avoir un rôle adjuvant dans un contexte de vaccination, il a été démontré que la présence constante d'inflammation peut aussi nuire au processus de formation de la mémoire. L'inflammation est un processus mis en place suite à la détection d'un agent pathogène ou de dommages cellulaires afin d'initier une réponse. Ce processus engendre la production de médiateurs (cytokines, chimiokines, anaphylatoxines, histamine, prostaglandine, réactifs oxygénés...) qui mènent à la vasodilatation, la perméabilité vasculaire ainsi qu'à l'adhésion, l'infiltration et l'activation des cellules immunitaires, dans le but ultime d'éliminer le microorganisme étranger et de favoriser le développement de la réponse immunitaire adaptative. Cependant, lorsque l'inflammation n'est pas résolue, des mécanismes régulateurs sont déclenchés et limite le développement de la réponse effectrice. Par exemple, une production continue de cytokines pro-inflammatoires va maintenir l'expression de KLRG1 et limiter celle du récepteur de l'IL-7 sur les lymphocytes T effecteurs, ce qui va nuire au développement de la réponse mémoire (Stelekati *et al.*, 2014). De plus, la présence constante d'IFN-I mène à la production d'IL-10 par les DC et l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD8⁺, ce qui va favoriser l'épuisement de ces cellules et la persistance du virus dans un modèle d'infection par LCMV clone 13 (Oldstone, 2015). Par ailleurs, l'inflammation chronique peut mener à des dommages tissulaires excessifs et ultimement au développement de maladies auto-immunes, suite à la relâche d'antigènes du soi conjointement à l'infiltration et l'activation de lymphocytes autoréactifs (Takagi *et al.*, 2016). Cela devrait donc être pris en considération dans le choix des adjuvants à utiliser afin de s'assurer que l'inflammation engendrée soit transitoire. Ce choix peut aussi avoir de grandes implications lors de la vaccination de personnes infectées de façon chronique ou subissant des traitements à long terme avec l'IFN-I.

D'un autre côté, l'équipe de John Harty a démontré que l'IL-15, en plus de contribuer à l'homéostasie des T CD8⁺ mémoires, influence la migration de ces cellules dans les tissus inflammés en induisant l'expression de O-glycan, un phénomène qui pourrait être exploité dans des contextes de vaccination ou d'immunothérapie afin de localiser les cellules au bon endroit et ainsi d'augmenter l'efficacité de ces méthodes (Nolz *et al.*, 2014). De plus, il a été démontré dans des modèles de vaccination à ADN que l'ajout d'un plasmide codant pour l'IL-15 pouvait grandement améliorer la formation et la fonctionnalité de la réponse cellulaire effectrice et mémoire (Kutzler *et al.*, 2005, Oh *et al.*, 2003).

L'administration répétée d'un vaccin, une pratique qui est couramment utilisée avec les vaccins à médiation humorale afin d'amplifier la réponse immunitaire, peut avoir un impact considérable

sur le phénotype des cellules T CD8⁺ mémoires et donc sur la protection octroyée par ces cellules. D'une part, il a été observé que les stimulations antigéniques répétées mènent à une augmentation de la population de T_{EM} au dépend des T_{CM} (Jabbari *et al.*, 2006, Masopust *et al.*, 2006, Wirth *et al.*, 2010). En effet, les cellules mémoires ont un phénotype effecteur et des capacités cytotoxiques augmentés, marqué par une production plus grande de granzyme B, une hausse de l'expression de KLRG1 et une diminution de l'expression de CD62L, CCR7 et CD27, mais une aptitude réduite à se diviser (Masopust *et al.*, 2006, Wirth *et al.*, 2010). Dans le cas d'infections par LM, LCMV Armstrong ou VV ces altérations fonctionnelles des mémoires résultent en un contrôle amélioré des agents pathogènes (Jabbari *et al.*, 2006, Nolz *et al.*, 2011). Cependant, dans le cas d'une infection par des pathogènes qui se répliquent rapidement ou qui ont tendance à persister comme LCMV clone 13 ou le virus de l'hépatite murine (MHV), la capacité de division rapide des cellules ainsi que leur localisation dans les organes lymphoïdes secondaires sont cruciales, ce qui fait en sorte que la mémoire secondaire est moins efficace que la mémoire primaire pour contrôler l'infection (Nolz *et al.*, 2011). Ainsi, selon le pathogène contre lequel le vaccin est dirigé, il peut être bénéfique ou néfaste d'administrer le vaccin à plusieurs reprises. Cela a une implication particulièrement importante pour le développement de vaccins ciblant des pathogènes causant des infections persistantes ou les cancers.

Lors du processus de génération d'une réponse immunitaire adaptative, les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires (Th) produisent des cytokines et interagissent avec les autres cellules du système immunitaire afin de diriger la réponse. Cette aide prodiguée par les lymphocytes T CD4⁺ a un rôle crucial dans la génération de la réponse T CD8⁺ mémoire. En fait, il a été démontré que l'aide CD4⁺ est nécessaire à la fonctionnalité de la réponse T CD8⁺ mémoire en influençant la capacité d'expansion secondaire des lymphocytes T CD8⁺ ainsi que leur aptitude à éviter la mort induite par l'activation (AICD) (Janssen *et al.*, 2003, Shedlock *et al.*, 2003, J. C. Sun *et al.*, 2003b). Plus précisément, les lymphocytes T CD4⁺ vont interagir avec les APC via le lien CD40-CD40L, ce qui va mener à une augmentation d'expression de CD70 par les APC (Bullock *et al.*, 2005, Taraban *et al.*, 2004, Van Deusen *et al.*, 2010). Par la suite, le CD70 sur les APC va se lier à CD27 sur les lymphocytes T CD8⁺ ce qui va limiter l'expression de TRAIL et par le fait même l'apoptose lors de la stimulation secondaire (Feau *et al.*, 2012, Janssen *et al.*, 2005). Conséquemment, en absence de l'aide CD4⁺ la mémoire CD8⁺ est formée, mais lors d'une restimulation les cellules meurent par apoptose plutôt que de proliférer et d'effectuer leurs fonctions cytotoxiques. Les lymphocytes T CD4⁺ peuvent aussi induire la production des chimiokines MIP-1 α and MIP-1 β par les DC, ce qui va faciliter l'interaction entre les DC et les lymphocytes T CD8⁺ et ainsi maximiser le développement de la réponse T CD8⁺ mémoire

(Castellino *et al.*, 2006). La génération d'une aide CD4⁺ passe par la présentation des antigènes sur le CMH-II des APC aux lymphocytes T CD4⁺ en présence de signaux de co-stimulation et d'IL-12 (Trinchieri, 1994). Ainsi, l'efficacité des vaccins basés uniquement sur l'utilisation d'épitopes reconnus par les lymphocytes T CD8⁺ comme les vaccins peptidiques, les vaccins à ADN ou les APC chargées avec des peptides CD8⁺, est affectée par l'absence de présentation antigénique sur le CMH-II. C'est pourquoi, en modèle murin d'immunisation avec des cellules dendritiques chargées avec un peptide CD8⁺, l'injection de cellules dendritiques provenant de souris mâles dans des souris femelles est nécessaire pour fournir l'aide CD4⁺ essentielle à la génération d'une mémoire CD8⁺ fonctionnelle (Livingstone *et al.*, 1999). En outre, d'autres signaux, comme les ligands de TLR, peuvent induire l'expression de CD70 sur les APC et ainsi fournir l'aide nécessaire aux lymphocytes T CD8⁺ (Bullock *et al.*, 2005). De plus, les ligands des TLR3 et TLR9 mènent à l'expression de CD40L sur les APC et suffisent au développement d'une réponse T CD8⁺ fonctionnelle (Hervas-Stubbs *et al.*, 2007, S. Johnson *et al.*, 2009). D'ailleurs, il a été démontré que l'administration d'IFN- α ou d'un plasmide codant pour l'IL-15 ainsi que l'utilisation anticorps anti-CD40 ou de CD40-L compensent pour l'absence d'aide CD4⁺ (Bullock *et al.*, 2005, Kutzler *et al.*, 2005, Oh *et al.*, 2008, Ontiveros *et al.*, 2011, Taraban *et al.*, 2004) et que l'administration de ligands de TLR potentialise le signal CD40 ce qui permet le développement d'une réponse T CD8⁺ optimale (Sanchez *et al.*, 2007). Ces éléments pourraient donc être ciblés dans l'élaboration de nouveaux vaccins.

3- LES ADJUVANTS

Le terme adjuvant provient du mot latin *adjuvare*, signifiant aider. En effet, les adjuvants sont des composés utilisés pour augmenter ou moduler l'immunogénicité de différents antigènes afin d'améliorer l'efficacité des vaccins. Ils peuvent aussi servir à diminuer la quantité d'antigène à utiliser tout en maintenant la même efficacité, ce qui est très utile lorsque les doses de vaccins sont limitées (Bershteyn *et al.*, 2012, Leroux-Roels *et al.*, 2007), à augmenter la rapidité à laquelle la réponse immunitaire se développe (Bhagawati-Prasad *et al.*, 2010, Leroux-Roels *et al.*, 2010, Quattrocchi *et al.*, 2014) ainsi que sa durabilité (Leroux-Roels *et al.*, 2010, W. Xu *et al.*, 2015). Encore peu d'adjuvants sont autorisés pour l'utilisation chez l'humain (Tableau 2), mais plusieurs sont en développement ou en essai clinique afin de répondre aux besoins du domaine de la vaccination. Bien que les premiers adjuvants étaient ajoutés aux vaccins sans connaître leurs mécanismes d'action, les études immunologiques des dernières années ont permis de classer les adjuvants en 2 principales classes selon leur mode de fonctionnement, soit les systèmes de livraison et les molécules immunomodulatrices. Certains adjuvants peuvent aussi avoir des propriétés appartenant à chacune de ces catégories.

Tableau 2. Les adjuvants présentement autorisés pour l'utilisation chez l'humain

	Type d'adjuvant	Type de réponse immunitaire généré	Vaccins
Alum	Système de livraison	Humorale	Virus du papillome humain (CERVARIX [®] , GARDASIL [®]), hépatite B (Fendrix [®] , ENGERIX [®] , RECOMBIVAX [®]), coqueluche, diphtérie, tétanos et polio (BOOSTRIX [®] , QUADRACEL [®]), hépatite A (AVAXIM [®] , HAVRIX [®]), méningite (BEXSERO [®] , Meningitec [®] , Menjugate [®]), encéphalite japonaise (IXIARO [®]), pneumocoque (Prevnar [®] , SYNFLORIX [®])
Squalène	Système de livraison	Humorale	MF59 - Vaccin antigrippal (FLUAD [®]) AS03 - Vaccin pandémique antigrippal (PANDEMRIX [®])
Monophosphoryl lipid a (MPL)	Immunomodulateur	Humorale	Virus du papillome humain (CERVARIX [®]) Hépatite B (FENDRIX [®])
Liposome	Système de livraison	Humorale et cellulaire	Vaccin antigrippal (Inflexal V [®])
VLP	Système de livraison	Humorale et cellulaire	Virus du papillome humain (CERVARIX [®] , GARDASIL [®]) Hépatite B (FENDRIX [®] , ENGERIX [®] , RECOMBIVAX [®])

3.1 Les systèmes de livraison

Les systèmes de livraison des vaccins vont faciliter la reconnaissance des antigènes vaccinaux ainsi que leur phagocytose par les cellules présentatrices d'antigènes. Il peut s'agir de molécules qui sont ajoutées aux vaccins telles que les sels d'aluminium et les émulsions. L'antigène peut aussi être directement associé à des anticorps ou des pseudoparticules virales. Le choix du système de livraison peut affecter la stabilité, la reconnaissance par les cellules immunitaires ainsi que l'innocuité des vaccins et donc influencer sa réussite ou son échec.

3.1.1 Les sels d'aluminium

Les sels d'aluminium (hydroxyde d'aluminium et phosphate d'aluminium) sont les premières molécules qui ont été identifiées comme pouvant augmenter l'efficacité des vaccins (Buttle G Glenny A, Stevens M, 1931, Pope C Glenny A, Waddington H, Wallace U, 1926). Ils sont utilisés depuis plus de 80 ans et ont été administrés à des millions de personnes, ce qui en fait un des adjuvants les plus utilisés et les plus sécuritaires jusqu'à présent. La capacité des sels d'aluminium à augmenter la production d'anticorps lorsqu'ajouté à un vaccin est bien connue. Cependant, cela ne fait qu'une vingtaine d'années que des équipes de recherche se sont intéressées à l'élucidation de son mécanisme d'action et celui-ci reste encore controversé. En général, les deux principaux effets observés lors de l'ajout de molécules dérivés de l'aluminium aux vaccins sont l'augmentation de la phagocytose des antigènes vaccinaux et l'induction d'inflammation (Hem *et al.*, 2007, Mannhalter *et al.*, 1985). Pour ce faire, les antigènes doivent être en association avec les molécules d'aluminium, mais leur adsorption ne semble pas toujours nécessaire (Clausi *et al.*, 2008, B. Hansen *et al.*, 2009, B. Hansen *et al.*, 2007, Hem *et al.*, 2007, Iyer *et al.*, 2003, Levesque *et al.*, 2006, Romero Mendez *et al.*, 2007). Dans cette situation, les antigènes ne sont plus solubles, mais plutôt agglomérés en particules de taille adéquate pour faciliter leur phagocytose par les cellules présentatrices d'antigènes, en plus de favoriser leur persistance (Hem *et al.*, 2007, Morefield *et al.*, 2005, Romero Mendez *et al.*, 2007). D'un autre côté, les sels d'aluminium semblent aussi avoir un effet immunomodulateur. Ils peuvent recruter des cellules immunitaires au site d'injection (Goto *et al.*, 1982, Goto *et al.*, 1997, Kool *et al.*, 2008, Mosca *et al.*, 2008) et induire la production d'acide urique, probablement en causant la nécrose ou des dommages à des cellules au site d'injection (Goto *et al.*, 1982, Goto *et al.*, 1997), ce qui mène à l'activation de l'inflammasome et la production des cytokines pro-

inflammatoires IL-1 β et IL-18 (Eisenbarth *et al.*, 2008, Kool *et al.*, 2008, Kuroda *et al.*, 2011, H. Li *et al.*, 2007, H. Li *et al.*, 2008). L'activation de cette voie peut aussi être induite directement par les cristaux d'aluminium (Hornung *et al.*, 2008). Récemment, l'équipe de Robert J. Benschop a aussi démontré que l'alum engendre de la nécrose cellulaire, ce qui mène à la production d'IL-33 qui peut participer à l'amélioration de la réponse immunitaire humorale en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires (Rose *et al.*, 2015). Cependant, dans cette étude l'action de l'IL-33 n'est pas nécessaire au pouvoir adjuvant d'alum. Ainsi, bien que des études *in vitro* ont démontré que les adjuvants à base d'aluminium ne sont pas en mesure d'activer directement les cellules présentatrices d'antigènes (Kool *et al.*, 2008, H. Sun *et al.*, 2003a), des études effectuées *in vivo* ont démontrées qu'il y avait production de motifs moléculaires associés au danger (DAMP) menant à l'activation du système immunitaire inné (Lindblad, 2006). Enfin, les sels d'aluminium sont reconnus comme des adjuvants sécuritaires et efficaces pour augmenter la production d'anticorps entre autre en activant la réponse Th2 (Brewer *et al.*, 1999, Grun *et al.*, 1989, Serre *et al.*, 2008), mais ils ne sont pas en mesure, à eux seuls, d'augmenter la réponse immunitaire cellulaire, mettant en lumière le besoin de développer de nouveaux adjuvants (Grun *et al.*, 1989, Lindblad *et al.*, 1997).

3.1.2 Les émulsions

Les émulsions sont un autre type d'adjuvant qui est présentement inclus dans les vaccins en utilisation ou en développement. Elles peuvent être constituées d'une émulsion d'eau dans l'huile ou d'huile dans l'eau avec de l'huile de source minérale, végétale, animale ou synthétique. Actuellement, seules les émulsions à base de squalène, une huile d'origine animale, sont autorisées. Il s'agit du MF59 dans le vaccin antigrippale FLUAD[®] autorisé dans une trentaine de pays, ainsi que l'AS03 qui a été utilisé dans plusieurs vaccins contre le virus influenza pandémique H1N1 de 2009. L'ajout du MF59 au vaccin saisonnier contre la grippe avait pour but d'augmenter l'efficacité de la vaccination saisonnière chez les personnes âgées ainsi que les jeunes enfants, alors que l'utilisation de l'AS03 a permis de diminuer la quantité d'antigènes nécessaires pour mener à une protection efficace dans une situation où les doses de vaccins étaient limitées. Tout comme les sels d'aluminiums, ces adjuvants ont eux aussi été administrés à des millions de personnes et sont considérés très sécuritaires en plus d'avoir démontré leur capacité à augmenter l'efficacité des vaccins contre la grippe (Della Cioppa *et al.*, 2011, Pellegrini *et al.*, 2009, Schultze *et al.*, 2008) et même à potentiellement élargir la protection conférée par le vaccin à des souches de virus hétérologues (Khurana *et al.*, 2010, Vesikari *et al.*,

2012). Encore une fois, le mécanisme d'action de ce type d'adjuvant n'est pas complètement élucidé. Des études ont démontré que le MF59 forme des gouttelettes qui sont phagocytées par les cellules présentatrices d'antigènes dont les cellules dendritiques (Dupuis *et al.*, 1998). Celles-ci augmentent la phagocytose des antigènes vaccinaux et la production d'anticorps spécifiques (Dupuis *et al.*, 1998, G. Ott *et al.*, 1995b). Cependant, contrairement aux sels d'aluminium, l'association des antigènes avec les gouttelettes lipidiques ne semble pas nécessaire à l'effet adjuvant du MF59 (G. Ott *et al.*, 1995a). Le MF59 induit aussi le recrutement de cellules immunitaires au site d'injection, ce qui peut faciliter la phagocytose et le transport des antigènes aux ganglions drainants (Calabro *et al.*, 2011), et module un nombre important de gènes liés à l'inflammation dont des chimiokines et des récepteurs de chimiokines et ce, de façon plus importante que l'alum ou les oligodeoxynucleotides contenant des motifs CpG non méthylés (CpG ODN) (Mosca *et al.*, 2008). En fait, le MF59 est généralement considéré comme un adjuvant plus efficace que l'alum pour augmenter la production d'anticorps et la réponse T CD4⁺ (Wack *et al.*, 2008). Il semble donc que l'injection du MF59 engendre l'établissement d'un environnement favorable au développement de la réponse immunitaire humorale. Cependant, le mécanisme d'action exact du MF59 n'a pas encore été identifié. Par contre, des études ont démontré que contrairement aux sels d'aluminium le pouvoir adjuvant du MF59 ne dépend pas directement de l'inflammasome, mais est diminué par l'absence de la signalisation TLR ou de la protéine adaptatrice de l'inflammasome ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD*) (Ellebedy *et al.*, 2011, Seubert *et al.*, 2011). D'autres types d'émulsions ont aussi été développés et étudiés, mais ne sont pas présentement utilisées chez l'humain, comme les émulsions d'eau dans l'huile de type montanide ou encore celles utilisées dans les adjuvants complet et incomplet de Freund. Bien que l'adjuvant complet de Freund, contenant des fragments de *Mycobacterium tuberculosis* tuées dans une émulsion d'eau dans l'huile, soit l'un des adjuvants les plus efficace pour augmenter autant la réponse immunitaire humorale que cellulaire, la forte toxicité qu'il engendre (inflammation persistante, nécrose tissulaire, ulcération) empêche son utilisation chez l'humain (Broderson, 1989). En revanche, l'absence des bactéries tuées dans l'adjuvant incomplet de Freund, réduit la toxicité de cet adjuvant, mais aussi son efficacité (Jensen *et al.*, 1998). Enfin, le montanide est en mesure d'augmenter les réponses immunitaires humorales et cellulaires (Dar *et al.*, 2013, Diefenbach *et al.*, 2008, Jang *et al.*, 2011, Quattrocchi *et al.*, 2014), mais il est toujours en évaluation quant aux effets secondaires qu'il engendre (van Doorn *et al.*, 2015).

3.1.3 Les liposomes

Les liposomes sont composés d'une couche bilipidique en forme de sphères immunologiquement inertes, biodégradables et non toxiques qui ont été utilisés pour la première fois en 1974. Comme pour les autres adjuvants de type système de livraison, l'utilisation de liposomes a pour effet d'augmenter la phagocytose des antigènes vaccinaux qui y sont incorporés. Dans ce cas précis, la reconnaissance et la phagocytose des liposomes par les cellules présentatrices d'antigènes, plus particulièrement les macrophages, se fait soit via le récepteur Fc ou encore grâce au système du complément (Wassef *et al.*, 1987). Suite à leur phagocytose, les antigènes vaccinaux sont dégradés et peuvent emprunter la voie de présentation sur le CMH-II, mais peuvent aussi être présentés de façon croisée au niveau du CMH-I (Serre *et al.*, 2006, Zaks *et al.*, 2006). La formulation des antigènes vaccinaux dans les liposomes a aussi l'avantage d'augmenter l'immunogénicité de petits peptides (Friede *et al.*, 1993), de diminuer la quantité d'antigène requise pour engendrer la prolifération des lymphocytes T (Serre *et al.*, 2006) et de limiter la toxicité de certaines molécules (Kwong *et al.*, 2011). En outre, les liposomes sont un outil très versatile dont l'efficacité est dépendante de leurs tailles ainsi que leurs compositions. En effet, la taille des liposomes formés peut grandement affecter la phagocytose de ces vésicules et ainsi avoir un impact au niveau de la réponse immunitaire (Oussoren *et al.*, 1997), alors que l'ajout de phosphatidylsérine dans la bicouche lipidique augmente la phagocytose des liposomes (Oussoren *et al.*, 1997). Cependant, les liposomes ne sont généralement pas suffisamment immunogéniques pour être utilisés seuls, ce qui fait en sorte qu'ils sont régulièrement combinés avec des molécules immunomodulatrices comme le MPL ou des cytokines afin d'augmenter leur efficacité (Boks *et al.*, 2015, Christensen *et al.*, 2011, Hanson *et al.*, 2015, Meraz *et al.*, 2014). En outre, l'utilisation des liposomes a aussi évolué vers le développement de virosomes, c'est à dire de liposome contenant des glycoprotéines d'enveloppes virales. Cette méthode s'est avérée très efficace pour améliorer la protection contre le virus de l'influenza, et ce particulièrement chez les personnes âgées et les enfants, tel que démontré par la réduction du nombre d'hospitalisations et de pneumonies observées dans différentes études cliniques effectuées en Europe (Gasparini *et al.*, 2013, Herzog *et al.*, 2009). Ces résultats prometteurs ont d'ailleurs mené à la commercialisation du vaccin antigrippal Inflexal V[®] en Europe et en Asie. De plus, la formulation en liposomes d'un vaccin ciblant l'antigène tumoral mucin 1, surexprimé dans plusieurs cas de carcinome

pulmonaire, augmente la durée de vie des patients et est maintenant en essai clinique de phase III (Butts *et al.*, 2011, Y. L. Wu *et al.*, 2011). Enfin, la formulation du peptide MPER, dérivé de l'antigène gp41 du virus de l'immunodéficience humaine, à l'aide de liposomes s'est révélée être la seule méthode permettant le développement d'anticorps spécifiques, en comparaison avec l'utilisation d'alum, ou d'émulsion à base de squalène ou de montanide et ce même lors de combinaison avec des molécules immunomodulatrices (Hanson *et al.*, 2015). Cette même équipe a aussi mis en évidence la versatilité des liposomes en démontrant la possibilité d'ajouter du MPL ou encore un peptide *helper*, permettant de stimuler les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires, aux vésicules afin d'obtenir une réponse immunitaire optimale (Hanson *et al.*, 2015). Les liposomes sont donc un outil à considérer dans le développement de nouveaux vaccins.

3.1.4 Les pseudoparticules virales

Les VLP sont des particules virales qui ne contiennent pas de matériel génétique infectieux. En effet, selon le mode de production et le type de virus utilisé, ces particules peuvent soit être totalement dépourvu d'acide nucléique (Lizotte *et al.*, 2015, Sainsbury *et al.*, 2014), contenir des acides nucléiques contaminants (Ren *et al.*, 2015, Tumban *et al.*, 2013), ou posséder un acide nucléique viral ou synthétique qui ne mène pas à la production de particules virales infectieuses pour l'humain (C. Mathieu *et al.*, 2013, Phelps *et al.*, 2007). Ainsi, il n'y a pas de réplication virale, ce qui en fait un outil sécuritaire. La majorité des VLP présentement utilisés en vaccination sont une version non répliquative du virus contre lequel on veut monter une réponse immunitaire. C'est entre autre le cas des trois vaccins constitués de VLP qui sont utilisés chez l'humain : le vaccin contre l'hépatite B, le virus du papillome humain et celui contre l'hépatite E autorisé en Chine. Ils sont tous les trois composés des protéines de capsid des virus ciblés et ne contiennent pas d'acide nucléique (Herrin *et al.*, 2014, Maugh, 1981, Riedmann, 2012). La production de vaccins sous forme de VLP est aussi fréquemment utilisée dans le développement de vaccins contre le virus de l'influenza. Cela a l'avantage de mener au développement d'une réponse immunitaire plus forte et plus large en comparaison avec l'utilisation de virus inactivés ou de protéines recombinantes de l'hémagglutinine (Bright *et al.*, 2007, Matassov *et al.*, 2007, Ren *et al.*, 2015). En effet, des titres d'anticorps plus élevés et reconnaissant une plus grande gamme de virus distincts sont générés avec cette méthode. L'utilisation de VLP permet aussi d'éviter l'utilisation de traitements chimiques pour inactiver les particules et conserve la conformation native des antigènes. En outre, une réponse immunitaire de type Th1 et une protection contre l'infection par les souches homologues et hétéro sous-typiques du virus ont été observées avec l'utilisation

de VLP (Bright *et al.*, 2007, Prabakaran *et al.*, 2013, Quan *et al.*, 2007, Ren *et al.*, 2015). Enfin, la production du vaccin contre la grippe en VLP permet d'éviter la méthode basée sur l'utilisation d'œufs, qui est longue, coûteuse et dépend de l'approvisionnement en œufs (Bright *et al.*, 2007, D'Aoust *et al.*, 2010, Shoji *et al.*, 2015).

De plus en plus d'équipes de recherche utilisent aussi les protéines de capsid de différents virus, comme celles du virus de l'hépatite B, pour les modifier génétiquement ou chimiquement afin d'exprimer des antigènes étrangers et ainsi de s'en servir comme plateforme vaccinale (S. Chen *et al.*, 2015, Lico *et al.*, 2009, Storni *et al.*, 2002). Cela permet entre autres de monter une réponse immunitaire contre des épitopes hautement conservés entre les souches de virus influenza, comme M2e, qui sont normalement faiblement immunogéniques (Denis *et al.*, 2008, M. C. Kim *et al.*, 2013, Petukhova *et al.*, 2013). Les VLP sont aussi étudiées pour la création de vaccin contre l'hépatite C, le mélanome, Ebola ou encore la malaria, afin de répondre aux besoins non comblés (Jones *et al.*, 2013, Kazaks *et al.*, 2008, Sominskaya *et al.*, 2010, Warfield *et al.*, 2003). Les VLP servent donc de transporteur pour diriger de façon adéquate les antigènes vaccinaux aux cellules immunitaires. En fait, puisqu'elles sont physiquement similaires aux virus, tant au niveau de la taille que de la forme, la reconnaissance des antigènes vaccinaux par les APC en est facilitée (Bershteyn *et al.*, 2012, Fifiš *et al.*, 2004, X. Li *et al.*, 2014, X. Li *et al.*, 2011). En outre, ces propriétés leur permettent aussi de diffuser librement jusqu'aux ganglions drainants le site d'injection pour être phagocytés par les cellules s'y trouvant comme les cellules dendritiques CD8⁺, impliquées dans le développement de la réponse immunitaire cellulaire (Manolova *et al.*, 2008). De plus, la présentation croisée des antigènes est aussi possible et mène au développement de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques (Lacasse *et al.*, 2008, Leclerc *et al.*, 2007, Ruedl *et al.*, 2002, Win *et al.*, 2011). L'utilisation de VLP permet aussi d'augmenter la réponse immunitaire humorale générée contre les antigènes exprimés à la surface des particules en comparaison aux antigènes utilisés seuls sous forme de protéines ou de peptides (Shoji *et al.*, 2015). Bien que la présentation des antigènes vaccinaux sous forme de VLP a un effet adjuvant, plusieurs vaccins à base de VLP requièrent la co-administration d'un adjuvant de type immunomodulateur pour être pleinement efficaces (S. Chen *et al.*, 2015, Shoji *et al.*, 2015, Storni *et al.*, 2002). C'est d'ailleurs le cas des trois vaccins VLP autorisés qui contiennent des sels d'aluminium et/ou du MPL (Herrin *et al.*, 2014, Maugh, 1981, Riedmann, 2012). Cependant, certaines VLP ont des propriétés immunomodulatrices intrinsèques et sont en mesure d'activer les cellules immunitaires innées, rendant l'ajout de molécules activatrices non nécessaire (Bosio *et al.*, 2004, Lenz *et al.*, 2001, Ye *et al.*, 2006). Les VLP possèdent donc

plusieurs propriétés intéressantes pour le développement de nouveaux vaccins plus efficaces et sécuritaires.

3.1.5 Les anticorps

Dans la catégorie des adjuvants de type système de livraison, l'utilisation des anticorps a fait récemment son apparition. Ces anticorps ont pour but d'amener les antigènes vaccinaux spécifiquement à des cellules cibles, comme les cellules présentatrices d'antigènes, en ciblant des molécules exprimées à la surface de ces cellules, plus particulièrement des récepteurs endocytiques. Il s'agit, entre autre, des anticorps ciblant DEC-205, DC-SIGN, Clec9A, Dectin-1 ou DCIR dont l'expression est majoritairement restreinte aux cellules dendritiques (Engering *et al.*, 2002, Geijtenbeek *et al.*, 2000, Huysamen *et al.*, 2008, Kato *et al.*, 2006, Meyer-Wentrup *et al.*, 2008). Ainsi, la fusion d'un antigène (protéine ou peptide) à un anticorps reconnaissant ce type de récepteur permet dans un premier temps la phagocytose de l'antigène, puis sa présentation au niveau des CMH de classe II, mais aussi au niveau du CMH-I par le phénomène de présentation croisée (Birkholz *et al.*, 2010, Mahnke *et al.*, 2000, Saluja *et al.*, 2014). Par la suite, il y a une présentation efficace des antigènes aux lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ce qui mène au développement d'une réponse immunitaire cellulaire cytotoxique (L. Bonifaz *et al.*, 2002, Cruz *et al.*, 2014) en plus de fournir l'aide nécessaire à la réponse immunitaire humorale dans le cas de vaccins protéiques (Boscardin *et al.*, 2006). Il est important de noter que dans le contexte de vaccination, les antigènes couplés à des anticorps ciblant des récepteurs endocytiques exprimés par les cellules dendritiques ne peuvent être utilisés seuls, car une réponse immunitaire de tolérance sera induite (L. Bonifaz *et al.*, 2002, Hawiger *et al.*, 2001). Ainsi, il faut coupler l'utilisation de ces anticorps avec des molécules activant les cellules dendritiques comme un anticorps anti-CD40, du poly(I:C), des CpG ODN ou le resiquimod (L. Bonifaz *et al.*, 2002, Boscardin *et al.*, 2006, Dhodapkar *et al.*, 2014, Mahnke *et al.*, 2005). Cette technique a donné des résultats prometteurs dans des contextes de prévention d'infections virales, mais aussi de traitement du cancer qui nécessite le développement d'une réponse immunitaire cellulaire et est présentement en essai clinique (Badillo-Godinez *et al.*, 2015, L. C. Bonifaz *et al.*, 2004, Dhodapkar *et al.*, 2014, Mahnke *et al.*, 2005). Finalement, de récentes études ont démontré qu'il était aussi possible d'extrapoler cette technique aux bactériophages ou aux nanoparticules afin de favoriser la présentation croisée des antigènes présentés dans ces systèmes et ainsi induire le développement de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques (D'Apice *et al.*, 2015, Saluja *et al.*, 2014, Sartorius *et al.*, 2015).

3.2 Les immunomodulateurs

Lors d'une infection, le système immunitaire inné est activé suite à la détection de motifs associés aux pathogènes (PAMPS) par des PRR. Cette reconnaissance mène à une réponse de type inflammatoire qui contribue au développement de la réponse immunitaire adaptative. Dans un contexte de vaccination, l'administration du vaccin a pour but de mimer la présence d'un agent pathogène, sans pouvoir causer une réelle infection. Ainsi, l'ajout de PAMPS ou de molécules inflammatoires pouvant simuler la présence d'un agent pathogène est tout indiqué afin de développer une réponse immunitaire qui sera efficace pour contrôler une infection subséquente.

3.2.1 Les ligands de PRR

Les ligands de PRR ont la propriété commune d'activer les cellules du système immunitaire inné. Ce processus est caractérisé par l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation par les APC et la production de cytokines pro-inflammatoires. Cependant, selon le type de ligand de PRR utilisé, des différences majeures dans les populations de cellules immunitaires activées ainsi que le type de cytokines produites sont observées, ce qui se répercute ultimement sur le développement de la réponse immunitaire adaptative et donc leur pouvoir adjuvant (Agrawal *et al.*, 2003, Kwissa *et al.*, 2012, Steinhagen *et al.*, 2011). Parmi les ligands de PRR, ceux qui activent les TLR sont les plus étudiés. Un total de dix TLR (TLR1-10) ont été identifiés chez l'humain, alors qu'il y en a douze chez la souris (TLR1-9, TLR11, TLR12 et TLR13). Les TLR sont exprimés au niveau des cellules immunitaires, dont les macrophages, les DC et les lymphocytes B, mais aussi chez d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes et les cellules épithéliales. La majorité des TLR sont situés à la surface des cellules ; seuls les TLR3, 7, 8, 9 et 13 sont localisés dans les endosomes (figure 4). De plus, à l'exception du TLR3 et parfois du TLR4 qui peuvent faire intervenir les molécules adaptatrices TRIF et TRAM, tous les TLR signalent à l'aide de la molécule adaptatrice MYD88. Suite à l'activation des TLR de surface, MYD88 est recrutée au niveau de la portion cytoplasmique du récepteur, ce qui résulte en une cascade de signalisation menant à la translocation au noyau des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 puis à la production de cytokines pro-inflammatoires (figure 4) (Akira

et al., 2006). Dans le cas des TLR endosomaux, leur activation peut induire la production de cytokines pro-inflammatoires, mais aussi plus particulièrement d'IFN-I. En effet, l'activation du TLR7 dans les cellules dendritiques plasmacytoides (pDC) induit la formation d'un complexe avec IRAK-1, TRAF6, TRAF3, IKK- α et IRF7, ce qui mène à la phosphorylation et la dimérisation d'IRF7 qui transloque alors au noyau pour activer l'expression des gènes codant pour l'IFN-I (Takeuchi *et al.*, 2010). Pour sa part, l'activation du TLR3, recrute la molécule adaptatrice TRIF au domaine cytoplasmique du récepteur et induit la formation d'un complexe composé de TRAF3, TANK et NAPI, permettant ensuite à TBK1 et IKK ϵ de phosphoryler IRF3 qui va se dimériser et migrer au noyau pour mener à la production d'IFN-I (Takeuchi *et al.*, 2010).

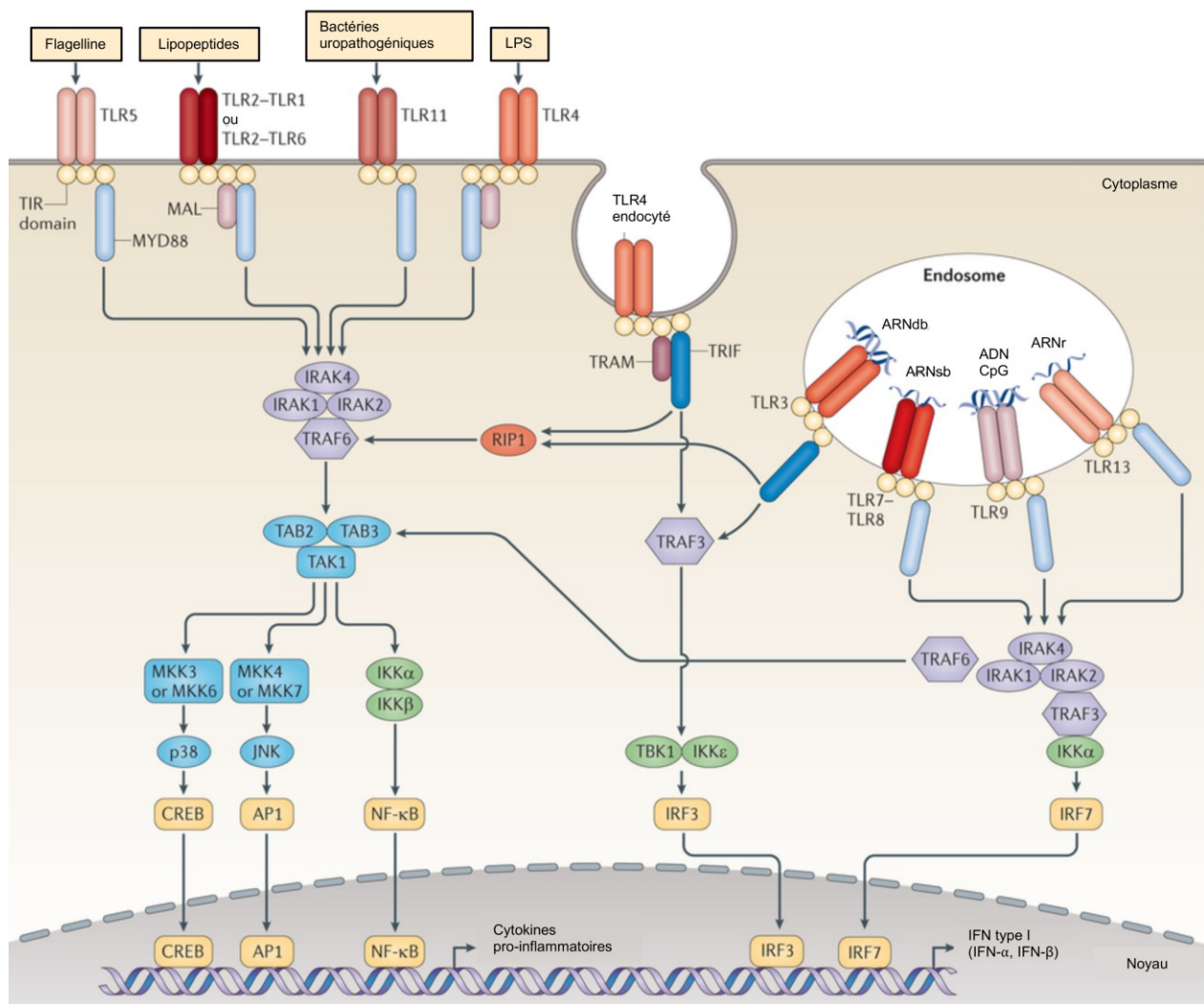


Figure 4. La signalisation TLR
(Adaptée de O'Neill *et al.*, 2013)

Parmi les ligands de TLR, le MPL, un dérivé non toxique des lipopolysaccharides (LPS), a été commercialisé par GSK et est utilisé en combinaison avec Alum dans leurs vaccins dirigés contre le virus du papillome humain et l'hépatite B (Kundi, 2007, McKeage *et al.*, 2011). Il s'agit d'un agoniste du TLR4, qui a des propriétés adjuvantes similaires au LPS, mais qui est dépourvu de sa toxicité (Evans *et al.*, 2003, B. S. Thompson *et al.*, 2005). Le MPL est reconnu pour recruter et activer les APC et mener à la production de cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et l'IL-6 (Didierlaurent *et al.*, 2009, Vitoriano-Souza *et al.*, 2012). De plus, des études ont démontré sa capacité à augmenter la production d'anticorps spécifiques, mais aussi à engendrer la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD4⁺ et donc de diriger la réponse vers un profil Th1 (Hu *et al.*, 2013, Vernacchio *et al.*, 2002). Le MPL connaît un bon succès lorsqu'il est combiné à l'Alum dans les vaccins commerciaux de GSK, mais sa capacité à soutenir le développement de la réponse T CD8⁺ n'a pas été clairement démontrée (Giannini *et al.*, 2006, Kundi, 2007, McKeage *et al.*, 2011, Nevens *et al.*, 2006).

Le TLR2, un autre récepteur situé à la surface des cellules, reconnaît les molécules situées dans la membrane des bactéries comme le peptidoglycane, l'acide lipotéichoïque ou les lipoprotéines (Hertz *et al.*, 2001). L'utilisation des lipopeptides tels le Pam₃Cys comme adjuvant a démontré de bonnes propriétés immunomodulatrices (Hertz *et al.*, 2001), en plus de stimuler l'immunité mucoale (Rharbaoui *et al.*, 2002). Plusieurs essais cliniques ont été réalisés ou sont actuellement en cours avec le Pam₃Cys pour le développement de vaccins contre la malaria, le VIH ou l'hépatite B. De plus, les lipopeptides ont démontré une bonne capacité à améliorer autant la réponse immunitaire humorale que cellulaire (BenMohamed *et al.*, 1997, D. C. Jackson *et al.*, 2004). Cependant, comme les récepteurs situés à la surface des cellules répondent à des pathogènes extracellulaires, ils ont normalement tendance à mener majoritairement à la production d'anticorps spécifiques et de lymphocytes T CD4⁺ de type Th2, mais peu à la génération de lymphocytes T CD8⁺ (Agrawal *et al.*, 2003, Dillon *et al.*, 2004, Honko *et al.*, 2006, Redecke *et al.*, 2004). Ainsi, un grand intérêt est porté aux récepteurs endosomaux comme le TLR3, le TLR7/8 et le TLR9 impliqués dans la reconnaissance des pathogènes intracellulaires.

Les ligands naturels des TLR3, 7/8 et 9 sont l'ARN double brin, l'ARN simple brin et l'ADN non méthylé respectivement (Alexopoulou *et al.*, 2001, Bauer *et al.*, 2001, Diebold *et al.*, 2004). Ces différentes formes d'acides nucléiques correspondent au génome ou à des intermédiaires de réplication des agents pathogènes infectant les cellules. L'activation de ces récepteurs endosomaux mène à la production de cytokines pro-inflammatoires, mais aussi d'IFN-I, crucial

pour la présentation croisée des antigènes vaccinaux et le développement de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques (Durand *et al.*, 2006, Le Bon *et al.*, 2003). En plus des ligands naturels, différents ligands synthétiques ont été développés pour activer les TLR3, 7/8 et 9, soit le poly(I:C), les imidazoquinolines et les CpG ODN respectivement. Ces ligands ont démontré un grand potentiel en tant qu'adjuvant pour améliorer la réponse immunitaire humorale, mais aussi une capacité à engendrer une réponse immunitaire cellulaire contre les antigènes vaccinaux, ce qui leur a permis de générer des résultats prometteurs dans le développement de vaccins nécessitant des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) comme le cancer, la tuberculose ou la malaria (Kastenmuller *et al.*, 2011, F. Ma *et al.*, 2010, Scheiermann *et al.*, 2014, Tewari *et al.*, 2010). Cependant, les premières versions de ces adjuvants comportaient certains inconvénients. Par exemple, ils sont très sensibles à la dégradation par les nucléases, présentes en grande quantité dans les liquides biologiques, en plus de causer beaucoup de toxicité (fièvre, libération d'enzyme hépatique, inflammation systémique, hypotension), ce qui limite les bénéfices reliés à leur utilisation (Duraisingham *et al.*, 2013, Engel *et al.*, 2011, Fortier *et al.*, 2004, Nordlund *et al.*, 1970, Robinson *et al.*, 1976). Toutefois, des recherches intensives ont été réalisées afin d'améliorer ces adjuvants et différentes solutions ont été identifiées. D'une part, la création de molécules dérivées, plus stables, permet d'avoir des adjuvants plus résistants à la dégradation, mais aussi moins toxique (Lan *et al.*, 2007, Sester *et al.*, 2000). D'autre part, la combinaison de ces adjuvants avec des systèmes de livraison tels que les liposomes, des microsphères ou des nanoparticules permet de les protéger de la dégradation tout en ciblant leur phagocytose par les cellules du système immunitaire inné, ce qui augmente leurs propriétés adjuvantes tout en limitant leur toxicité (de Titta *et al.*, 2013, Hafner *et al.*, 2011, Malyala *et al.*, 2008, Varypataki *et al.*, 2015, Wilson *et al.*, 2007). Enfin, les molécules immunomodulatrices non reliées aux TLR comme les ligands des récepteurs NOD, CLR, RIG-I ou STING sont aussi évaluées comme adjuvants pour les vaccins, mais sont à un stade de recherche moins avancé (Beljanski *et al.*, 2015, Pavot *et al.*, 2014).

3.3 La combinaison des adjuvants

Le vaccin vivant atténué contre la fièvre jaune (YF-17) est le vaccin le plus efficace créé jusqu'à ce jour. En effet, il a une efficacité de plus de 98%, engendre le développement d'anticorps neutralisants protecteurs à très long terme et mène au développement d'une réponse T cytotoxique spécifique (Co *et al.*, 2002, Poland *et al.*, 1981). Ainsi, les chercheurs se sont intéressés à comprendre le mécanisme d'action de ce vaccin afin de pouvoir créer de nouveaux

vaccins plus efficaces. Ces études ont permis de mettre en évidence l'importance de la stimulation du système immunitaire innée ainsi que l'activation simultanée de plusieurs TLR pour avoir un effet optimal (T. Querec *et al.*, 2006, T. D. Querec *et al.*, 2009). En général, les vaccins qui simulent le plus fidèlement l'infection sont les plus efficaces et donc l'utilisation de vaccins vivants atténués semble être le meilleur choix pour le développement d'une réponse immunitaire protectrice à long terme. Cependant, ce type de vaccin est de plus en plus délaissé au profit des vaccins de type sous-unitaire, plus sécuritaires, mais moins immunogéniques, auxquels l'ajout d'un adjuvant est crucial. Avec l'augmentation de la compréhension des mécanismes d'action des différents adjuvants ainsi que l'évaluation de leur efficacité respective, les différents avantages et inconvénients de chacun ont été identifiés et le bénéfice de combiner plus d'un type d'adjuvant pour un même vaccin afin d'obtenir une efficacité optimale a été mis en évidence. Ainsi, de façon analogue au vaccin YF-17, l'équipe de Bali Pulendran a démontré que la combinaison de plusieurs ligands de TLR avait un effet synergique sur le développement de la réponse immunitaire humorale en contexte de vaccination (Kasturi *et al.*, 2011). Ce phénomène a aussi été observé par l'équipe du Dr Robert Seder dans un contexte de vaccin à médiation cellulaire (Kastenmuller *et al.*, 2011). En effet, l'utilisation d'un ligand de TLR7/8 permet d'activer plusieurs types de DC et de maximiser la réponse immunitaire. En ce sens, la compagnie InvivoGen a développé des molécules qui contiennent plusieurs ligands de PRR.

De façon similaire, une combinaison non seulement de différents ligands de TLR, mais aussi de différents types d'adjuvants a été observée ces dernières années et a menée à des résultats prometteurs. En effet, comme les systèmes de livraison et les immunomodulateurs ont des mécanismes d'actions différents, mais complémentaires, leur association peut avoir de grands avantages. C'est entre autres le cas de l'adjuvant autorisé ASO4, une combinaison entre un système de livraison et une molécule immunomodulatrice, qui permet d'augmenter significativement l'efficacité des vaccins en comparaison avec l'utilisation d'un seul adjuvant (Didierlaurent *et al.*, 2009, Giannini *et al.*, 2006, Harper *et al.*, 2004, Paavonen *et al.*, 2007). De façon analogue, lors d'un essai de développement d'un nouveau vaccin plus efficace contre la tuberculose, l'administration concomitante de CpG ODN et d'alum a menée à un effet synergique en améliorant la production d'anticorps et s'est révélé être le seul traitement en mesure d'engendrer une augmentation significative du nombre de lymphocytes T produisant de l'IFN- γ (L. Chen *et al.*, 2010). L'incorporation de CpG ODN dans des nanoparticules s'est révélée aussi très efficace pour potentialiser l'effet de cet agonist du TLR9. En fait, cela permet d'obtenir une meilleure capacité à augmenter la réponse cellulaire et de diminuer la quantité de CpG ODN utilisé, ce qui pourrait potentiellement diminuer les effets secondaires causés par cet

adjuvant (Diwan *et al.*, 2004). Cependant, il ne suffit pas de combiner un système de livraison avec un immunomodulateur pour avoir de bons résultats. En effet, plusieurs exemples illustrent l'importance du choix du système de livraison selon le type de réponse immunitaire recherchée. Par exemple, lorsque le MPL est en formulation avec des liposomes il augmente la réponse cellulaire, alors que ce n'est pas le cas lorsqu'il est dans une émulsion d'huile dans l'eau (Mettens *et al.*, 2008, Pichyangkul *et al.*, 2004). D'un autre côté, la formulation du GLA (Glucopyranosyl Lipid Adjuvant), un ligand de TLR4, sous forme aqueuse, en liposome ou en émulsion d'huile dans l'eau, peut avoir un gros impact sur la génération de la réponse cellulaire, alors que la réponse humorale n'est pas affectée par ce changement (Fox *et al.*, 2013). Ainsi, l'élucidation des mécanismes d'action des différents adjuvants et des interactions qu'ils peuvent avoir entre eux met en lumière l'importance du choix du ou des adjuvants qui seront incorporés aux vaccins afin de maximiser les chances de réussite.

3.4 L'utilisation des virus de plante en vaccination

Les virus de plante sont considérés comme non pathogènes pour les mammifères, incluant les humains. Cependant, la forte exposition aux virus de plante par la nourriture (Colson *et al.*, 2010), les remèdes à base de plante, ou le tabagisme (Balique *et al.*, 2012), ainsi que leur ressemblance aux virus affectant les vertébrés ont soulevé des interrogations quant aux interactions possibles entre les virus de plantes et les cellules de vertébrés. D'ailleurs, plusieurs études ont démontré que des virus de plantes, parfois encore infectieux, pouvaient être retrouvés dans les excréments d'humains (Nakamura *et al.*, 2009, Tomlinson *et al.*, 1982, T. Zhang *et al.*, 2006) et d'animaux, (L. Li *et al.*, 2010, Phan *et al.*, 2011) ainsi que dans la salive de fumeurs (Balique *et al.*, 2012). En effet, plusieurs virus de plantes semblent résister aux barrières physiques comme le pH acide et les protéases présentes dans les voies d'entrée (Nuzzaci *et al.*, 2010, Rae *et al.*, 2005, F. Xu *et al.*, 1996). D'autre part, des anticorps spécifiques à des virus de plantes ont été détectés chez la souris et l'humain, suggérant une reconnaissance de ces virus par le système immunitaire (Florindo *et al.*, 2002, R. Liu *et al.*, 2013). Cependant, aucune étude ne démontre que les virus de plante pourraient être impliqués dans une pathologie chez les vertébrés. Ainsi, l'utilisation des virus de plante en vaccination s'avère être une option intéressante qui est développé dans l'article *Plant Viruses as Nanoparticle-Based Vaccines and Adjuvants*.

3.4.1 Article 1 : Plant Viruses as Nanoparticle-Based Vaccines and Adjuvants

Titre en français : Les virus de plante utilisés comme vaccins et adjuvants

Auteurs : Marie-Ève Lebel¹, Karine Chartrand¹, Denis Leclerc² et Alain Lamarre¹

Affiliations :

¹Immunovirology Laboratory, Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC H1V 1B7, Canada;

²Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Infectious Disease Research Centre, Laval University, Quebec City, Quebec G1V 4G2, Canada;

Contributions des différents auteurs :

MÈL : Rédaction de l'article

KC : Rédaction de l'article

DL : Correction de l'article

AL : Rédaction et correction de l'article

Titre du journal : Vaccines, publié le 5 août 2015

Résumé en français :

La vaccination est un des plus grands accomplissements réalisés dans la lutte contre les maladies infectieuses. Cependant, plusieurs maladies telles que l'hépatite C, le VIH/sida, le paludisme, la tuberculose ou le cancer pose certains problèmes, puisque les méthodes de vaccination traditionnelles se sont avérées inefficaces. Cela a donc conduit au développement de nouvelles approches de vaccination. À cet égard, beaucoup d'efforts ont été déployés afin de créer de nouveaux adjuvants et des plateformes vaccinales sécuritaires. Parmi celles-ci, l'utilisation de pseudoparticules de virus de plante ou de virus de plante recombinants a pris de l'importance à ce qui a trait au développement de nouveaux vaccins contre les maladies infectieuses et le cancer. La présente revue résume les récents progrès effectués dans l'utilisation de virus de plantes en tant que vaccin ou adjuvant, ainsi que dans l'élucidation de leurs mécanismes d'action. Une meilleure compréhension des propriétés immunogéniques des

virus de plante permettra la conception de nouveaux vaccins thérapeutiques et prophylactiques efficaces et sécuritaires.

Abstract: Vaccines are considered one of the greatest medical achievements in the battle against infectious diseases. However, the intractability of various diseases such as hepatitis C, HIV/AIDS, malaria, tuberculosis, and cancer poses persistent hurdles given that traditional vaccine-development methods have proven to be ineffective; as such, these challenges have driven the emergence of novel vaccine design approaches. In this regard, much effort has been put into the development of new safe adjuvants and vaccine platforms. Of particular interest, the utilization of plant virus-like nanoparticles and recombinant plant viruses has gained increasing significance as an effective tool in the development of novel vaccines against infectious diseases and cancer. The present review summarizes recent advances in the use of plant viruses as nanoparticle-based vaccines and adjuvants and their mechanism of action. Harnessing plant-virus immunogenic properties will enable the design of novel, safe, and efficacious prophylactic and therapeutic vaccines against disease.

Keywords: recombinant plant virus; vaccine; adjuvant; immune response; production methods

1. Introduction

Although vaccines have allowed great achievements such as a significant reduction in incidence, mortality, and morbidity related to infectious diseases, the field of vaccinology has faced several challenges in recent years. Indeed, development of new vaccines has proven difficult especially against chronic infections or cancer. To overcome these obstacles, large research efforts are being devoted to better understand the key elements required to generate protective immunity. For example, while the majority of available vaccines mainly induce the generation of antibodies that neutralize targeted pathogens, it is now recognized that the cellular immune response is often necessary to protect against many infections. A balanced and complete immune response involving both humoral immunity, with high-affinity neutralizing antibodies limiting pathogen transmission and cellular immunity, with cytotoxic CD8⁺ T cells killing infected cells, is in fact required to control malaria, hepatitis C, and HIV/AIDS, just to list a few (Barth *et al.*, 2011, de Souza, 2014, Holz *et al.*, 2015, Imai *et al.*, 2015, Pereyra *et al.*, 2014), highlighting the need for the development of new vaccine design approaches. Moreover, antigens and epitopes from several pathogens targeted by protective immune responses have recently been identified (Chakraborty *et al.*, 2014, Frosig *et al.*, 2015, Hafalla *et al.*, 2013,

Linnemann *et al.*, 2015). This has led to the design of safer and more specific recombinant vaccines, although they are often less immunogenic than more traditional vaccines based on live/attenuated pathogens. Therefore, the choice of vaccine formulations and the addition of suitable adjuvants will likely be required to achieve protective immunity with these novel vaccines. It is generally accepted that the best way to generate vaccines capable of generating a broad immune response with high levels of antibodies and cytotoxic T lymphocytes is to mimic a pathogenic infection while remaining as safe as possible. In this regard, virus-like nanoparticles (VLPs) have been increasingly studied in recent years with the aim of developing new effective vaccines.

2. Virus-Like Nanoparticles

VLPs mimic viruses by bearing similar protein composition while being non-infectious. In fact, most VLPs do not contain any viral genetic material while others contain nucleic acids that do not allow virus replication in mammals. For now, there are three vaccines composed of VLPs used in humans: the hepatitis B vaccine, the human papilloma vaccine, and the recently approved vaccine against hepatitis E in China (Riedmann, 2012). These generate robust humoral immune responses but still require the addition of an adjuvant to be fully effective. Other VLPs are currently in clinical trials (Medicago, 2000- [cited 2015 jul 21] , Novavax, 2000- [cited 2015 jul 21] , Takeda, 2000- [cited 2015 jul 21]) and many more are in development (M. C. Kim *et al.*, 2013, S. H. Kim *et al.*, 2015, S. Sun *et al.*, 2015). The increase in VLP use in the development of novel vaccines is related to their numerous qualities that meet new medical needs. For example, their highly ordered and repetitive structures facilitate recognition by the immune system and induce B-cell activation through B-cell receptor (BCR) cross-linking (Batista *et al.*, 2009). The size of VLPs is generally between 20 and 300 nm, which is ideal to be effectively recognized by dendritic cells (DCs) or other antigen-presenting cells (APC) (Bershteyn *et al.*, 2012, Fifi *et al.*, 2004, X. Li *et al.*, 2014, X. Li *et al.*, 2011). In addition, VLPs frequently display various Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) that are recognized by Pattern Recognition Receptors (PRRs), leading to the activation of the innate immune system and cytokine production such as type I interferon (IFN-I); notably, these cytokines were reported to increase the cross-presentation capacity of DCs and are beneficial towards cell-mediated, T-lymphocyte immune responses (Kolumam *et al.*, 2005, Le Bon *et al.*, 2006, Le Bon *et al.*, 2003). IFN- $\alpha\beta$ can also increase the humoral response, induce isotype switching, and enhance the generation of T follicular helper cells (Cucak *et al.*, 2009, Le Bon *et al.*, 2001). Furthermore, many studies have shown the capacity of VLPs to induce a cellular immune response, therefore

permitting the development of prophylactic and therapeutic vaccines targeting CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses (Cubas *et al.*, 2009, Kammer *et al.*, 2007, Pinto *et al.*, 2006, Quan *et al.*, 2007). This strongly correlates with APC cross-presentation of antigens fused to VLPs to CD8⁺ T cells through a Tap- and proteasome-independent pathway (Leclerc *et al.*, 2007, Ruedl *et al.*, 2002, Win *et al.*, 2011). This mechanism has also been shown to generate tumor-specific CD8⁺ T-cell responses that efficiently slow down tumor growth and increase mice survival in various models (Cubas *et al.*, 2011, Peacey *et al.*, 2008, Speiser *et al.*, 2010). Importantly, non-infectious VLPs are safer than attenuated or inactivated viruses and could therefore potentially be administered to immunocompromised individuals. Finally, the use of VLPs could be advantageous for developing vaccines against viruses that are impossible or difficult to grow in culture such as the human norovirus, for example (Y. Ma *et al.*, 2011). Altogether, these properties contribute to the effectiveness and usefulness of VLP vaccines.

3. Recombinant Plant Virus Particles (rPVP)

Recombinant plant virus particles are increasingly studied as candidate vaccines. They can be classified as a subtype of VLP since they are viral particles that are non-infectious in mammals. However, most rPVPs retain their replication potential in plants, posing additional safety and environmental challenges. Nonetheless, rPVPs possess all of the advantages of VLPs and thus would allow the development of effective vaccines. Many plant viruses such as the tobacco mosaic virus (TMV), cowpea mosaic virus (CPMV), potato virus X (PVX), alfalfa mosaic virus (AIMV), and papaya mosaic virus (PapMV) (see Table 1 for more information) are currently used for the development of new vaccines. Typically, plant viruses are simple, rod shaped, or bearing icosahedral symmetry; they are composed of one or two repeated coat protein (CP) subunits and bear an RNA genome. These viruses are relatively easy to engineer, produced at low cost, and very stable, enabling storage at room temperature, which is desirable for vaccination in developing countries. CP modification of plant viruses allows dense expression of fused antigens, thereby contributing to the development of an effective immune response. Finally, while other virus platforms, such as adenovirus, suffer from platform-specific antibody development (Fausther-Bovendo *et al.*, 2014, Zaiss *et al.*, 2009), rPVP seem to maintain their immunogenic properties in the presence of specific antibodies (Kemnade *et al.*, 2014, Mallajosyula *et al.*, 2014). In the following paragraphs, we will discuss the different methods of production of rPVP for vaccination, the diverse approaches for antigen expression on their surface, and achievements made with rPVP.

Table 1. Recombinant plant virus particles used in vaccine development.

Virus	Shape	Parameters Tested	Element of Response	References
CPMV	Icosahedral	Humoral response	Binding or neutralizing antibodies	(Brennan <i>et al.</i> , 1999a, Brennan <i>et al.</i> , 1999b, Brennan <i>et al.</i> , 1999d, Dalsgaard <i>et al.</i> , 1997, Durrani <i>et al.</i> , 1998, Kaltgrad <i>et al.</i> , 2007, Langeveld <i>et al.</i> , 2001, McInerney <i>et al.</i> , 1999, Miermont <i>et al.</i> , 2008, Nicholas <i>et al.</i> , 2003, Nicholas <i>et al.</i> , 2002, Rennermalm <i>et al.</i> , 2001, Taylor <i>et al.</i> , 2000)
			Protection against challenge	(Brennan <i>et al.</i> , 1999b, Dalsgaard <i>et al.</i> , 1997, Langeveld <i>et al.</i> , 2001, Rennermalm <i>et al.</i> , 2001)
		Cellular response	IFN- γ production	(Nicholas <i>et al.</i> , 2003, Nicholas <i>et al.</i> , 2002)
		Immunomodulation	APC activation	(Gonzalez <i>et al.</i> , 2009)
PVX	Rod	Humoral response	Binding or neutralizing antibodies	(Jobsri <i>et al.</i> , 2015, Lico <i>et al.</i> , 2009, Marconi <i>et al.</i> , 2006, Marusic <i>et al.</i> , 2001, Uhde-Holzem <i>et al.</i> , 2010)
			Protection against challenge	(Jobsri <i>et al.</i> , 2015)
		Cellular response	CD8+ T cells activation	(Lico <i>et al.</i> , 2009, S. Massa <i>et al.</i> , 2008)
			IFN- γ production	(Lico <i>et al.</i> , 2009, S. Massa <i>et al.</i> , 2008)
		Immunomodulation	APC activation	(Jobsri <i>et al.</i> , 2015, Marusic <i>et al.</i> , 2001)
Cytokine production	(Jobsri <i>et al.</i> , 2015)			
TMV	Rod	Humoral response	Binding or neutralizing antibodies	(L. Jiang <i>et al.</i> , 2006, Koo <i>et al.</i> , 1999, Mallajosyula <i>et al.</i> , 2014, Palmer <i>et al.</i> , 2006, M. L. Smith <i>et al.</i> , 2000, Staczek <i>et al.</i> , 2000, Yin <i>et al.</i> , 2012)
			Protection against challenge	(L. Jiang <i>et al.</i> , 2006, Koo <i>et al.</i> , 1999, Mallajosyula <i>et al.</i> , 2014, Palmer <i>et al.</i> , 2006, Staczek <i>et al.</i> ,

				2000)
		Cellular response	CD8 ⁺ T cells activation	(Kemnade <i>et al.</i> , 2014, McCormick <i>et al.</i> , 2006a, McCormick <i>et al.</i> , 2006b)
			IFN- γ production	(McCormick <i>et al.</i> , 2006a)
			Protection against challenge	(McCormick <i>et al.</i> , 2006a)
		Immunomodulation	APC activation	(Kemnade <i>et al.</i> , 2014, McCormick <i>et al.</i> , 2006a)
CMV	Icosahedral	Humoral response	Binding or neutralizing antibodies	(Piazzolla <i>et al.</i> , 2005)
		Cellular response	CD8 ⁺ T cells activation	(Piazzolla <i>et al.</i> , 2005)
			IFN- γ production	(Nuzzaci <i>et al.</i> , 2007, Piazzolla <i>et al.</i> , 2005)
AIMV	Icosahedral	Humoral response	Binding or neutralizing antibodies	(Jones <i>et al.</i> , 2013, Yusibov <i>et al.</i> , 2005)
		Cellular response	IFN- γ production	(Yusibov <i>et al.</i> , 2005)
		Humoral response	Binding or neutralizing antibodies	(Babin <i>et al.</i> , 2013, Denis <i>et al.</i> , 2008, Denis <i>et al.</i> , 2007)
		Cellular response	CD8 ⁺ T cells activation	(Hanafi <i>et al.</i> , 2010, Lacasse <i>et al.</i> , 2008, Leclerc <i>et al.</i> , 2007)
			IFN- γ production	(Babin <i>et al.</i> , 2013, Hanafi <i>et al.</i> , 2010, Lacasse <i>et al.</i> , 2008, Leclerc <i>et al.</i> , 2007)
			Protection against challenge	(Lacasse <i>et al.</i> , 2008)
		Immunomodulation	APC activation	(C. Mathieu <i>et al.</i> , 2013)
			Cytokine production	(C. Mathieu <i>et al.</i> , 2013)
			Protection against challenge	(C. Mathieu <i>et al.</i> , 2013)
PapMV	Rod		APC activation	(Acosta-Ramirez <i>et al.</i> , 2008, Lebel <i>et al.</i> , 2014)
			Cytokine production	(Acosta-Ramirez <i>et al.</i> , 2008, Lebel <i>et al.</i> , 2014)
		Adjuvant	Vaccine jointly administered	PapMV-M2e (Denis <i>et al.</i> , 2008), BMDC-OVA (Lebel <i>et al.</i> , 2014), Outer Membrane Protein C (Acosta-Ramirez <i>et al.</i> , 2008), TIV (Savard <i>et al.</i> , 2011), (Acosta-Ramirez <i>et al.</i> , 2008, Lebel <i>et al.</i> , 2014, Savard <i>et al.</i> , 2011)
			Protection against challenge	(Acosta-Ramirez <i>et al.</i> , 2008, Lebel <i>et al.</i> , 2014, Savard <i>et al.</i> , 2011)
BaMV	Rod	Humoral response	Binding or neutralizing antibodies	(T. H. Chen <i>et al.</i> , 2012, Yang <i>et al.</i> , 2007)
			Protection against challenge	(T. H. Chen <i>et al.</i> , 2012, Yang <i>et al.</i> , 2007)
		Cellular response	IFN- γ production	(Yang <i>et al.</i> , 2007)
			Protection against challenge	(Yang <i>et al.</i> , 2007)

TBSV	Icosahedral	Humoral response	Binding or neutralizing antibodies	(Joelson <i>et al.</i> , 1997)
Plum pox potyvirus	Rod	Humoral response	Binding or neutralizing antibodies	(Fernandez-Fernandez <i>et al.</i> , 1998, Fernandez-Fernandez <i>et al.</i> , 2002)

CMV: cucumber mosaic virus; BaMV: bamboo mosaic virus; TBSV: tomato bushy stunt virus.

3.1. Production Methods

rPVP production can be achieved by several methods. Production of rPVP using plants, such as *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, or cowpea plants, is the most widely used and can be divided into two different strategies, both starting with the production of the desired cDNA. The cDNA can then be transcribed *in vitro* and used to inoculate plants depositing the RNA transcript on abraded leaves to induce a systemic infection (Palmer *et al.*, 2006). Another option is to transform *Agrobacterium tumefaciens* with a plasmid containing the cDNA coding for the modified viral genome and then agroinfiltrate plants to induce transient expression and generate recombinant viruses (Petukhova *et al.*, 2014). A week or two later, recombinant viruses are then purified by different techniques (Jones *et al.*, 2013, Koo *et al.*, 1999, M. L. Smith *et al.*, 2006). Remarkably, due to the possibility of CMV production in edible vegetables, e.g., celery, lettuce, cucumber, tomato, carrot, pepper, and banana (Natilla *et al.*, 2004), plant production also advances the use of oral delivery of vaccine via ingestible plants (Arakawa *et al.*, 1998, Thanavala *et al.*, 2005). This strategy would therefore reduce costs related to virus purification and eliminate the need for sterile needles and trained medical staff for vaccine administration. rPVP manufacturing *in planta* also allows for large-scale production devoid of contamination risks from human pathogens. However, a weakness of oral administration of rPVPs is related to the difficulty of controlling the amount of antigen taken by the patient and the potential development of tolerance to the antigen. In addition, genetic modifications that induce foreign antigen expression on plant virus proteins can sometimes affect viral replication, thus reducing production efficiency (Natilla *et al.*, 2004). A new method based on transgenic plant cell suspension cultures was recently developed. This process, based on the culture of calli derived from transgenic plant lines expressing viral cDNA, allows for continuous production of large amounts of rPVP with high reproducibility (Muthamilselvan *et al.*, 2015). More conventional techniques are also used to produce rPVP such as bacteria (C. Mathieu *et al.*, 2013, Plchova *et al.*, 2011), yeast (Brumfield *et al.*, 2004, Kadri *et al.*, 2013), and insect cell cultures (Kumar *et al.*, 2009, Saunders *et al.*, 2009). Plants, bacteria, and yeast are all simple and low cost manufacturing methods. However, bacteria and yeast sometimes produce insoluble proteins, thus

restricting particle self-assembly (Brumfield *et al.*, 2004, A. Mueller *et al.*, 2010). The less practical and more costly baculovirus expression system seems to avoid these problems (Brumfield *et al.*, 2004, Kumar *et al.*, 2009, Saunders *et al.*, 2009). When capsid protein production does not induce particle formation, it is also possible to perform the assembly process *in vitro*, with or without the addition of nucleic acids (Arkhipenko *et al.*, 2011, C. Mathieu *et al.*, 2013, A. Mueller *et al.*, 2010, Tyulkina *et al.*, 2011). Although this process is more laborious, it allows for better control of the RNA present inside the particle since diverse and uncontrolled sources of RNA can be incorporated in self-assembled viral particles *in vivo* (Brumfield *et al.*, 2004, Kadri *et al.*, 2013, Kumar *et al.*, 2009). In addition, *in vitro* assembly allows for the packing of specific RNA transcripts in recombinant plant virus capsid proteins that will further induce *in vivo* gene expression (M. L. Smith *et al.*, 2007). Atabekov and colleagues generated spherical nanoparticles using thermal denaturation of the TMV CP protein (Atabekov *et al.*, 2011). These particles are devoid of RNA and can bind different proteins or peptides, making it a universal and immunogenic particle platform (Karpova *et al.*, 2012). Therefore, these different manufacturing processes generate rPVP that either contain no RNA, host RNA, viral RNA, or inactive or replicative synthetic RNA. Plant virus particles are most probably safe enough for administration in humans, but many are still infectious in plants. Therefore, inactivation methods based on chemical treatment or UV irradiation, for example, were developed to ensure that rPVPs are innocuous (Langeveld *et al.*, 2001, Phelps *et al.*, 2007, Rae *et al.*, 2005). Finally, methods using eukaryotic cells have the advantage of allowing post-transcriptional modifications ensuring that the rPVP is more similar to the parental virus and more stable (Brumfield *et al.*, 2004, Kadri *et al.*, 2013, Natilla *et al.*, 2004, Vitti *et al.*, 2010). In summary several manufacturing processes have been developed to efficiently produce the desired rPVP, each with their advantages and drawbacks.

3.2. Antigen Expression on rPVP

Several processes lead to the expression of foreign antigens on rPVP. The most commonly used are molecular cloning techniques to fuse sequences coding for the antigen directly within the CP gene construct. In the case of icosahedral viruses such as CMV, CPMV, and AIMV, localization within sequences exposed on the viral surface as well as sites accepting peptide fusions have been well studied (Natilla *et al.*, 2004, Vitti *et al.*, 2010). In general, insertions of 10–50 amino acids are well tolerated and are structured in closed loops exposed on the surface of the virus. For example, most successful fusions with CPMV were achieved by inserting epitopes within loops between amino acids 22 and 23 of the S protein (Brennan *et al.*, 1999d,

Langeveld *et al.*, 2001, Nicholas *et al.*, 2002). Nevertheless, others have managed to obtain stable particles using N-terminal or C-terminal fusions with AIMV and TBSV, respectively, even if the N-terminal region is known to be important for particle formation for some icosahedral viruses (Jones *et al.*, 2013, Kumar *et al.*, 2009). However, in some cases, only 20%–30% of rPVP CPs express the fused antigen (Jones *et al.*, 2013). In the case of rod-shaped viruses, N-terminal and C-terminal fusions are the most commonly used (Babin *et al.*, 2013, Lacasse *et al.*, 2008, Lico *et al.*, 2009, Marusic *et al.*, 2001, Palmer *et al.*, 2006). This allows surface expression without causing destabilization of the structure. In addition, specific and well-defined sites in the CP sequence, other than the C- and N-termini, were also shown to accept fusion without destabilization while allowing surface expression of fused antigens and recognition by the immune system (Petukhova *et al.*, 2013, Rioux *et al.*, 2012b, L. Wu *et al.*, 2003). However, the tolerated size of peptides fused to rod-shaped viruses is usually more restricted (Bendahmane *et al.*, 1999, Uhde-Holzem *et al.*, 2010). Therefore, in order to fuse bigger peptides or complete proteins, fusion processes other than molecular cloning have been developed. One such technique consists in biotinylating the CP to attach streptavidin-linked proteins or peptides (Jobsri *et al.*, 2015, M. L. Smith *et al.*, 2006). Others also incorporate a reactive lysine in the sequence of the CP to chemically conjugate peptides using a heterobifunctional linker (McCormick *et al.*, 2006a, McCormick *et al.*, 2006b, M. L. Smith *et al.*, 2007) or perform copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition to covalently link antigens to the viral capsid (Kaltgrad *et al.*, 2007, Yin *et al.*, 2012). Spontaneous conjugation due to electrostatic and/or hydrophobic interactions between foreign antigens and viral CP can also happen and are further stabilized by formaldehyde treatment (Atabekov *et al.*, 2011, Karpova *et al.*, 2012). However, antigen insertion may potentially induce viral particle destabilization (Bendahmane *et al.*, 1999, Nuzzaci *et al.*, 2007, Porta *et al.*, 2003, Rioux *et al.*, 2012a). Apart from the size and the localization of the peptide, its charge and isoelectric point can also impact the particles' capacity to assemble (Bendahmane *et al.*, 1999, Porta *et al.*, 2003, Uhde-Holzem *et al.*, 2007). In some cases, the generation of mixed particles allows for the formation of stable rPVPs (Jobsri *et al.*, 2015). For example, in order to avoid interference with particle assembly, the insertion of the foot-and-mouth disease virus 2A peptide in the cDNA construct of PVX benefits from a ribosomal skipping process to produce mixed particles made of recombinant and wild-type CPs (Marconi *et al.*, 2006, Uhde-Holzem *et al.*, 2010). Finally, the localization of conjugated antigens may also affect the ability to elicit an immune response against fused antigens by influencing the accessibility and conformation of the antigen and thus the immunogenicity of the rPVP (Rioux *et al.*, 2012a, Taylor *et al.*, 2000, Yin *et al.*, 2012). In summary, with new techniques developed and a better

comprehension of factors influencing the stability and immunogenicity of rPVPs, we are better equipped to generate effective vaccines and it is now possible to conjugate very large peptides (Marconi *et al.*, 2006, Werner *et al.*, 2006) or even complete protein antigens to such particles (M. L. Smith *et al.*, 2006).

3.3. rPVP as Vaccines to Induce Humoral Immune Responses

Most of the currently used vaccines induce a humoral response upon administration, which will then protect individuals against infection or the appearance of disease (reviewed in (Plotkin, 2008)). As it is the case for current vaccines, plant viruses used as vaccine platforms are also able to trigger the production of antibodies. Not only are these platforms able to induce IgGs, mainly found in serum after sub-cutaneous, intra-peritoneal, and to some extent intra-nasal injections, IgAs are also found in mucosa after intra-nasal and oral administration (Brennan *et al.*, 1999a, Durrani *et al.*, 1998, Marusic *et al.*, 2001, Nicholas *et al.*, 2003, Nicholas *et al.*, 2002). Plant viruses used as carriers for foreign epitopes can therefore efficiently induce the production of both systemic and mucosal antibodies following administration by various routes, which broadens their potential targets since not all pathogens will require the same antibody response to be cleared from the host. The structure of epitopes presented on the surface of rPVPs will depend on their localization and size. When in an optimal localization, epitopes will adopt a structure similar to their native conformation, allowing antibodies to recognize the virus or bacteria against which they were mounted (Marconi *et al.*, 2006, Taylor *et al.*, 2000). As such, antibodies from HCV-infected patients were able to recognize a CMV engineered virus expressing the R9 peptide from HCV (Nuzzaci *et al.*, 2007), even though these patients were never exposed to the rPVP. rPVP-based experimental vaccines were also shown to be as effective or even more effective at inducing an antibody response compared to commercially available vaccines (T. H. Chen *et al.*, 2012), peptides alone (Babin *et al.*, 2013, Denis *et al.*, 2008, Denis *et al.*, 2007, S. Massa *et al.*, 2008, M. L. Smith *et al.*, 2006), or peptides conjugated to keyhole limpet haemocyanin (KLH) (Langeveld *et al.*, 2001, Nicholas *et al.*, 2002). Moreover, these vaccines are often administered in conjunction with less toxic adjuvants, compared to Freund's Complete Adjuvant (which is not approved for human use), like QS-21 and QuilA (saponin-based) or RIBI (McInerney *et al.*, 1999, Palmer *et al.*, 2006, Rennermalm *et al.*, 2001), or even without the use of any adjuvant (Brennan *et al.*, 1999a, Lico *et al.*, 2009, Marusic *et al.*, 2001). Plant viruses also often require less peptide to induce efficient antibody responses compared to commercially available vaccines or peptides conjugated to KLH (Brennan *et al.*, 1999d, Mallajosyula *et al.*, 2014).

Immunization in different experimental animal models not only generated specific antibodies but also protected against challenge with various viruses, bacteria, or tumor cell lines when epitopes were presented on CPMV (Brennan *et al.*, 1999b, Dalsgaard *et al.*, 1997, Khor *et al.*, 2002, Langeveld *et al.*, 2001, Rennermalm *et al.*, 2001), PVX (Jobsri *et al.*, 2015, S. Massa *et al.*, 2008), Bamboo Mosaic Virus (BaMV) (T. H. Chen *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2007), or TMV (L. Jiang *et al.*, 2006, Koo *et al.*, 1999, Mallajosyula *et al.*, 2014, Palmer *et al.*, 2006, Staczek *et al.*, 2000). Protection against challenge (sometimes lethal) is thought to be partially achieved by neutralizing antibodies, generated following immunization with engineered CPMV (Fernandez-Fernandez *et al.*, 1998, Langeveld *et al.*, 2001, Marusic *et al.*, 2001, McInerney *et al.*, 1999, Nicholas *et al.*, 2002), PVX (Marusic *et al.*, 2001), and Plum Pox Potyvirus (Fernandez-Fernandez *et al.*, 1998). This protection can be broadened to various strains and species of the same pathogen using conserved epitopes, which are usually weakly immunogenic. When such epitopes are presented on the surface of rPVPs, their immunogenicity is increased, allowing for the production of a more effective antibody response and therefore a broader protection of the host (Mallajosyula *et al.*, 2014, Miermont *et al.*, 2008, Yin *et al.*, 2012). This has been demonstrated for peptides 10 and 18 of the outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* presented at the surface of CPMV (Brennan *et al.*, 1999b, Brennan *et al.*, 1999c), as well as for the R9 peptide of HCV presented on PVX (Uhde-Holzem *et al.*, 2010). This broad recognition was also observed when mannose was engineered to be displayed on CPMV inducing antibodies interacting with various of its analogues and derivatives (Kaltgrad *et al.*, 2007).

Part of the mechanism by which plant virus carriers induce the production of antibodies is hypothesized to proceed through cross-linking of the BCR (Miermont *et al.*, 2008). The presentation of many epitopes in close proximity might favor such cross-linking, leading to the proliferation of B lymphocytes, presentation of epitopes to T cells, and differentiation of B lymphocytes into antibody-producing plasma cells (Takeda, 2000- [cited 2015 jul 21]). In agreement with this, Nicholas *et al.* demonstrated that higher antigen expression on the surface of CPMV particles provided a better immune response (Nicholas *et al.*, 2002). It also explains why viral platforms seem more efficient at inducing antibodies than peptide-KLH conjugates, for example (Langeveld *et al.*, 2001, Nicholas *et al.*, 2002).

3.4. rPVP as Vaccines to Induce Cellular Immune Responses

Even though antibodies generated following vaccination are often sufficient to protect against some diseases, elicitation of both cellular and humoral adaptive immune responses is

sometimes necessary for protection (reviewed in (Plotkin, 2008)). The use of plant viruses as epitope carriers has proven effective in inducing cellular immune responses directed towards antigens presented on the particle. We have demonstrated that epitopes fused to the PapMV platform were able to induce the activation of CD8⁺ T cells by a, cross-presentation pathway (Hanafi *et al.*, 2010, Lacasse *et al.*, 2008, Leclerc *et al.*, 2007). Other rPVPs, such as TMV (Kemnade *et al.*, 2014, McCormick *et al.*, 2006a, McCormick *et al.*, 2006b), CMV (Piazzolla *et al.*, 2005), CPMV (McInerney *et al.*, 1999) and PVX (Lico *et al.*, 2009, S. Massa *et al.*, 2008) were also shown to generate and enhance CD8⁺ T cell-mediated immune responses against fused epitopes. The main correlative for induction of effective T-cell responses seems to be production of IFN- γ . IFN- γ production was observed when peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy patients or patients infected with HCV were incubated with AIMV expressing a respiratory syncytial virus epitope (Yusibov *et al.*, 2005) or CMV expressing the R9 epitope from HCV (Nuzzaci *et al.*, 2007, Piazzolla *et al.*, 2005), both demonstrating that human PBMCs can be activated by rPVPs, while the latter also demonstrates that the epitope is efficiently processed and presented, leading to the potent activation of CD8⁺ T cells (*i.e.*, IFN- γ production). Cellular immune responses also correlated with protection against challenge with tumor cell lines B16-OVA and Eg.7-OVA (McCormick *et al.*, 2006a), Lymphocytic Choriomeningitis Virus (Lacasse *et al.*, 2008), and Foot and Mouth Disease Virus (Yang *et al.*, 2007).

3.5. rPVP Used as Immunomodulators and Adjuvants

In order to generate an effective immune response, APCs must be activated and present antigens to cells of the adaptive immune system (Storni *et al.*, 2002). As previously mentioned, rPVPs possess many suitable characteristics for them to be taken up by APCs, processed, and presented to T cells. Indeed, DCs were shown to be activated following TMV (Kemnade *et al.*, 2014, McCormick *et al.*, 2006a), PVX (Jobsri *et al.*, 2015, Marusic *et al.*, 2001), CPMV (Gonzalez *et al.*, 2009), and PapMV (Acosta-Ramirez *et al.*, 2008, Lacasse *et al.*, 2008, Lebel *et al.*, 2014) immunization. Activated DCs upregulate various co-stimulatory molecules such as CD40, CD86, CD80, MHCII, MHCI, and CCR7 (Jobsri *et al.*, 2015, Lebel *et al.*, 2014) and also produce pro-inflammatory cytokines such as IL-12, TNF- α , IL-6, and IFN- α (Acosta-Ramirez *et al.*, 2008, Jobsri *et al.*, 2015, Lebel *et al.*, 2014, C. Mathieu *et al.*, 2013, Savard *et al.*, 2011). DCs are not the only cell population that was shown to be activated following immunization with rPVPs since B lymphocytes, macrophages, and NK cells can also upregulate activation markers following rPVP encounter (Acosta-Ramirez *et al.*, 2008, Gonzalez *et al.*, 2009).

Since rPVPs can be efficiently taken up by APCs and induce their activation, they can potentially be used as adjuvants to enhance the effectiveness of concomitantly administered vaccines. We have indeed demonstrated that PapMV can be used as an adjuvant in combination with various types of vaccines. When PapMV was administered jointly with bone marrow-derived DCs presenting OVA, cellular immune responses towards OVA were enhanced, leading to better protection against a *Listeria monocytogenes*-OVA challenge in mice (Lebel *et al.*, 2014). Similar protection was observed when PapMV was administered in mice in concert with the seasonal trivalent influenza vaccine (TIV) (Savard *et al.*, 2011). When used as an adjuvant, PapMV was also shown to enhance the production of antibodies directed against TIV (Acosta-Ramirez *et al.*, 2008, Denis *et al.*, 2008, Savard *et al.*, 2011). PapMV has also been shown to be able to prime the immune system and protect mice from an influenza infection on its own, without being fused to an epitope or being administered with a separate vaccine (C. Mathieu *et al.*, 2013). Finally, it was shown to induce a broader immune response against TIV antigens, providing protection against strains of influenza not contained within the vaccine (Savard *et al.*, 2011). To our knowledge, PapMV is the first rPVP used as an adjuvant or an immunomodulator specifically to prime the immune system.

The mechanisms by which rPVPs activate APCs are slowly being uncovered. We have identified one such mechanism in the PapMV system as being the recognition of nucleic acid found within rPVPs that induces APC activation. Single-stranded RNA (ssRNA) within PapMV particles is in fact recognized by TLR7 in endosomes of APCs, mainly plasmacytoid DCs, leading to the production of IFN- α (Jobsri *et al.*, 2015). The lack of activation of murine splenocytes upon administration of PapMV monomers further illustrates the importance of ssRNA for its adjuvancy properties (Lebel *et al.*, 2014). Of note, despite RNA serving as the major immunomodulatory molecule following PapMV administration, the use of RNA alone cannot replace rPVPs since it would be rapidly degraded following administration due to the abundance of host RNAses found within the blood or other bodily fluids. The viral capsid therefore provides protection from degradation to the RNA molecule, allowing it to be efficiently delivered to endosomes. Plant virus particles thus carry their adjuvant properties inside a protective capsid (Acosta-Ramirez *et al.*, 2008), explaining their versatility both as vaccines and adjuvants.

4. Conclusions and Perspectives for rPVP

Although there is still much research to be done before rPVPs are used as vaccines in humans, great achievements have been made in recent years in this field. Several production and antigen

expression methods have been developed and improved, thus leading to the generation of many promising candidate vaccines. Beyond demonstrating that rPVP are effective platforms to generate both humoral and cellular immune responses against fused antigens, we now know that rPVP are efficiently recognized by the immune system of mammals, which efficiently activates the innate immune system. Therefore, rPVPs possess attractive intrinsic adjuvant properties that can be used for immunomodulatory purposes. This has important implications for future vaccine design and opens the door for new applications. A strong testimony to the recent achievements made in using rPVPs as novel vaccines is the recent entry of two rPVPs in clinical trials, PapMV as an adjuvant for the influenza vaccine (Folia Biotech Inc., 2015) and AIMV as a vaccine against malaria (Fraunhofer Center for Molecular Biotechnology, 2000- [cited 2015 jul 21]). In light of this, it seems very likely that in the near future plant viruses will be used in humans to address unmet medical needs as prophylactic and therapeutic vaccines and immunomodulators against infection or cancer.

Acknowledgments

This work was financially supported by Canadian Institutes of Health Research Grant MOP-89833 and the Jeanne and J.-Louis Lévesque Chair in Immunovirology from the J.-Louis Lévesque Foundation. Marie-Ève Lebel and Karine Chartrand acknowledge studentship support from the Fonds de Recherche Santé Québec.

Author Contributions

Marie-Ève Lebel, Karine Chartrand, Denis Leclerc, and Alain Lamarre wrote the manuscript.

Conflict of Interest

Denis Leclerc is the founder and a shareholder of Folia Biotech, a startup company with the mandate to commercialize the PapMV nanoparticle technology.

3.5 Les pseudoparticules du virus de la mosaïque de la Papaye

Le virus de la mosaïque de la papaye est un virus de plante de la famille des *Alphaflexiviridae* du genre potexvirus. Il est composé d'environ 1400 sous-unités de protéine de capsid qui s'assemble autour de l'ARNsb⁺ génomique de 6656 nucléotides pour former un virus de forme hélicoïdale de 530 nm de long et 14 nm de diamètre (Erickson *et al.*, 1976). Comme son nom l'indique, ce virus engendre une coloration irrégulière, en mosaïque, au niveau du feuillage des plantes infectées, principalement le papayer. L'infection par le virus de la mosaïque de la papaye peut nuire à la production commerciale de la papaye, mais est habituellement une menace négligeable en comparaison avec les autres virus affectant le papayer (Noa-Carrazana *et al.*, 2006, Tuo *et al.*, 2014).

Ces dernières années, notre équipe de recherche s'est intéressée à l'utilisation de ce virus de plante dans le domaine de la vaccination. Dans un premier temps, nous avons démontré qu'il était possible de produire la protéine de la capsid du virus de la mosaïque de la papaye chez *Escherichia coli* afin de générer des pseudoparticules virales (Tremblay *et al.*, 2006). Avec cette méthode de production, la multimérisation se fait à l'intérieur de la bactérie et l'ARN incorporé dans les particules n'est pas contrôlé ; il s'agit soit de l'ARNm codant pour la protéine de la capsid du PapMV ou encore d'ARN d'origine bactérienne. Lors de cette étude, nous avons aussi mis en évidence l'importance de certains sites de liaison à l'ARN pour l'assemblage des protéines de la capsid en pseudoparticules virales, ainsi que la possibilité d'ajouter un tag histidine sans déstabiliser les protéines, afin d'en faciliter la purification. Par la suite, plusieurs constructions ont été produites afin d'exprimer divers antigènes à la surface de PapMV (Babin *et al.*, 2013, Carignan *et al.*, 2015, Denis *et al.*, 2008, Denis *et al.*, 2007, Hanafi *et al.*, 2010, Lacasse *et al.*, 2008, Leclerc *et al.*, 2007, Leclerc *et al.*, 2013, Rioux *et al.*, 2012a, Rioux *et al.*, 2012b). Ces fusions ont majoritairement été effectuées au C-terminal de la protéine de la capsid, mais d'autres sites permettant une exposition à la surface de la protéine de la capsid (Rioux *et al.*, 2012a, Rioux *et al.*, 2012b) ou la formation de nanoparticules stables et immunogéniques ont aussi été identifiés (Babin *et al.*, 2013), augmentant par le fait même la versatilité de la plateforme. Une autre méthode de production menant à la purification de monomères de protéine de la capsid et à l'assemblage *in vitro* suite à l'ajout d'un ARNsb synthétique non codant a aussi été développée, ce qui permet de contrôler l'ARN incorporé dans les pseudoparticules virales (C. Mathieu *et al.*, 2013). Dans tous les cas, les nanoparticules générées sont similaires au virus de plante, quoi que légèrement plus courtes

(50-200 nm de long selon les protéines et les ARN utilisés (Babin *et al.*, 2013, Denis *et al.*, 2007, C. Mathieu *et al.*, 2013, Rioux *et al.*, 2012a, Savard *et al.*, 2011, Tremblay *et al.*, 2006).

Subséquentement, la reconnaissance de PapMV par les cellules du système immunitaire, ainsi que son immunogénicité ont été caractérisés. Tout d'abord, des travaux *in vitro* et *in vivo* ont démontré que PapMV était reconnu et phagocyté par des cellules présentatrices d'antigènes humaines et murines (Denis *et al.*, 2007, Hanafi *et al.*, 2010, Lacasse *et al.*, 2008, Leclerc *et al.*, 2007). Par la suite, la dégradation du PapMV par ces APC mène à la présentation des antigènes fusionnés sur le CMH-II, mais aussi de façon croisée au niveau du CMH-I (Hanafi *et al.*, 2010, Leclerc *et al.*, 2007). La phagocytose du PapMV engendre également une augmentation de l'expression des molécules de costimulation et la production de cytokines pro-inflammatoires et antivirales par les APC (Acosta-Ramirez *et al.*, 2008, Lacasse *et al.*, 2008, C. Mathieu *et al.*, 2013, Savard *et al.*, 2011). Ultiment, les APC activées et présentant les antigènes exprimés par le PapMV engendrent l'activation des lymphocytes T spécifiques (Babin *et al.*, 2013, Hanafi *et al.*, 2010, Lacasse *et al.*, 2008, Leclerc *et al.*, 2007). Dans le même ordre d'idée, nous avons démontré que l'utilisation de PapMV comme plateforme vaccinale permet non seulement de générer des anticorps contre les antigènes exprimés, mais aussi de stimuler la réponse immunitaire cellulaire, ce qui résulte en une protection contre plusieurs maladies infectieuses (Babin *et al.*, 2013, Carignan *et al.*, 2015, Denis *et al.*, 2008, Denis *et al.*, 2007, Hanafi *et al.*, 2010, Lacasse *et al.*, 2008, Leclerc *et al.*, 2013, Rioux *et al.*, 2012a, Savard *et al.*, 2012). L'efficacité du PapMV dans cette situation est dépendante de la multimérisation des protéines de la capsidie en pseudoparticule virale. (Denis *et al.*, 2008, Denis *et al.*, 2007). Enfin, nous avons démontré que PapMV pouvait être utilisé comme adjuvant, en le combinant au vaccin contre la grippe saisonnière. L'ajout du PapMV augmente alors les titres d'anticorps spécifiques au virus de l'Influenza, ce qui corrèle avec une meilleure protection contre une infection par ce virus chez la souris (Rioux *et al.*, 2014, Savard *et al.*, 2011). Tout au long de ces études, plusieurs avantages du PapMV ont été mis en évidence. Par exemple, la production du PapMV est simple et effectuée à faible coût. Il est aussi possible d'exprimer facilement des antigènes à sa surface ce qui en fait une plateforme vaccinale versatile. En outre, les pseudoparticules obtenues sont stables et ne contiennent pas d'agent de conservation ou de contaminant potentiellement toxique comme le thimerosal. Enfin, le PapMV est une nanoparticule qui est bien tolérée chez les rongeurs, ainsi que chez l'humain tel que démontré par toutes les expériences qui ont été réalisées chez la souris sans engendrer d'effet secondaire visible, par les essais précliniques de toxicité chez le rat et le lapin, ainsi que par un essai clinique phase I réalisé avec le PapMV comme adjuvant au vaccin contre la grippe saisonnière

(Folia Biotech Inc., 2015). Ainsi, toutes ces caractéristiques suggèrent que PapMV est un outil prometteur pour le développement de nouveaux vaccins sécuritaires et efficaces.

4- LE CANCER

Le cancer est la principale cause de décès au Canada. Selon les statistiques actuelles, 2 canadiens sur 5 seront affectés par un cancer durant leur vie et 1 canadien sur 4 mourra d'un cancer (Statistique Canada). Le mot cancer est un terme général pour désigner plusieurs maladies qui ont la caractéristique commune d'être causées par de multiples mutations séquentielles qui résultent en une prolifération incontrôlée des cellules. Ces mutations peuvent entre autres être induites par des facteurs environnementaux, comme l'exposition à des agents carcinogènes, causant des dommages à l'acide désoxyribonucléique (ADN), tels que les rayons ultraviolets, la pollution, la fumée de cigarette et l'alcool (Rastogi *et al.*, 2010, Somers *et al.*, 2002, Yauk *et al.*, 2007). En outre, plusieurs virus à ADN ou ARN peuvent mener au développement de cancers. Il s'agit par exemple du virus du papillome humain (VPH), du virus d'Epstein-Barr (EBV) ou des rétrovirus, qui vont soit s'intégrer dans le génome cellulaire et modifier l'expression de certains gènes, produire des protéines virales qui ont des fonctions d'oncogènes ou induire des dommages tissulaires et de l'inflammation chronique qui vont mener à des dommages à l'ADN (Carrillo-Infante *et al.*, 2007, Liao, 2006). De plus, il existe des facteurs génétiques qui vont prédisposer au développement de cancers (Ghiorzo, 2014, Lynch *et al.*, 2015, Valle, 2014). Les mutations qui engendrent la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses affectent des gènes impliqués dans trois principaux processus cellulaires soit la prolifération, la mort et la réparation de l'ADN. Ces derniers sont par la suite classés en deux catégories : les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs, qui favorisent ou limitent la prolifération et la survie des cellules respectivement. Ainsi, l'hyperactivation de proto-oncogènes comme ras ou myc ainsi que la perte d'activité de gènes suppresseurs de tumeurs comme p53, RB ou BRCA1 mènent au développement de cellules dont la prolifération et la survie ne sont plus contrôlées (Donehower *et al.*, 1992, Nigro *et al.*, 1989, Prior *et al.*, 2012, M. E. Thompson *et al.*, 1995). À l'heure actuelle, les principaux traitements utilisés contre le cancer sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Malgré les progrès substantiels effectués ces dernières années, plusieurs améliorations sont encore nécessaires afin d'augmenter l'efficacité et la spécificité des traitements et de réduire les effets secondaires et les rechutes.

4.1 Le mélanome

Le mélanome est un type de cancer de la peau qui est très agressif et dont l'incidence ne cesse d'augmenter (Garbe *et al.*, 2012). Les traitements normalement utilisés contre le mélanome, la chimiothérapie et la radiothérapie, échouent souvent à octroyer une rémission complète, surtout lorsque des métastases se sont développées. En fait, lorsque des métastases sont détectées, le temps de survie moyen est de moins d'un an (Balch *et al.*, 2009). En général, le traitement donné aux patients est le Dacarbazine, un agent alkylant qui interfère avec la réplication des cellules et induit leur apoptose. Cependant, chez les patients atteints de mélanome avancé (stade 4), ce traitement a un taux de réponse de 10-20% et ne semble pas augmenter significativement la survie en monothérapie (Falkson *et al.*, 1998, Middleton *et al.*, 2000). De plus, de nouveaux traitements visant à inhiber des kinases impliquées dans la prolifération des cellules qui sont fréquemment mutées dans les cas de mélanomes, se sont avérés efficaces, mais des résistances et des effets secondaires non désirables ont aussi été observées (Chapman *et al.*, 2011, Garbe *et al.*, 2012).

Ainsi, que ce soit pour le mélanome ou d'autres types de cancer, le besoin de nouveaux traitements plus efficaces est criant. C'est pourquoi plusieurs équipes de recherche tentent de mieux comprendre les mécanismes permettant de contrôler et d'éliminer les cellules tumorales.

4.2 L'implication du système immunitaire dans le contrôle du cancer

Plusieurs évidences suggèrent que le système immunitaire participe à limiter le développement des cellules cancéreuses. En effet, bien qu'il n'y ait toujours pas de preuve directe que le système immunitaire élimine les cellules précancéreuses, plusieurs études suggèrent qu'il a une grande importance dans le contrôle des cancers. D'une part, des recherches effectuées chez l'humain et la souris ont établi un lien entre des déficiences du système immunitaire et le risque accru de développer des cancers. C'est entre autres le cas chez des individus qui souffrent de déficiences primaires dues à des mutations génétiques (Kaplan *et al.*, 1998, Kinlen *et al.*, 1985, Salavoura *et al.*, 2008, Shankaran *et al.*, 2001, Smyth *et al.*, 2000, van der Meer *et al.*, 1993), mais aussi lors de déficiences secondaires causées par la prise d'immunosuppresseurs, lors de greffe d'organes (Engels *et al.*, 2011, Hoover *et al.*, 1973, B. U. Mueller *et al.*, 1995), ou d'infections par le virus de l'immunodéficience humaine (Clifford *et al.*, 2005, Shiels *et al.*, 2009). Dans le même ordre d'idée, une corrélation a été observée entre l'infiltration des cellules

immunitaires dans les tumeurs et un bon pronostic (Galon *et al.*, 2006). Cela est particulièrement vrai lorsque des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ sont retrouvés en grande quantité au sein des tumeurs, et ce pour plusieurs types de cancer tels que les mélanomes, carcinomes, cancers du sein et colorectal (Cho *et al.*, 2003, Hiraoka *et al.*, 2006, Mahmoud *et al.*, 2011, Naito *et al.*, 1998, Piras *et al.*, 2005). De plus, des chercheurs en oncologie ont récemment découvert que les cellules immunitaires ont aussi un rôle à jouer dans l'efficacité de traitements initialement conçus pour mener à la destruction des cellules cancéreuses seulement. En effet, des traitements de radiothérapie et de chimiothérapie se sont révélés moins efficaces lors de déficience immunitaire (Apetoh *et al.*, 2007, Ghiringhelli *et al.*, 2009, Stone *et al.*, 1979). Il semble que ces traitements puissent engendrer une mort immunogénique des cellules cancéreuses ainsi que la production de chimiokines favorisant l'infiltration de lymphocytes T, permettant le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale (Gupta *et al.*, 2012, Hodge *et al.*, 2013, Hong *et al.*, 2011, Obeid *et al.*, 2007, Reits *et al.*, 2006, A. Sharma *et al.*, 2013, Surace *et al.*, 2015, Wong *et al.*, 2015). D'ailleurs, alors que les radiations agissent généralement en causant la mort des cellules irradiées localement, il a été remarqué que la radiothérapie pouvait parfois mener à un effet bénéfique plus large : l'effet abscopal. Ce phénomène résulte du développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale systémique suite à la destruction des cellules cancéreuses et à la présentation d'antigènes tumoraux dans un contexte immunogénique (Demaria *et al.*, 2004, Lorimore *et al.*, 2001, Postow *et al.*, 2012, Stamell *et al.*, 2013). Plusieurs régressions spontanées de cancer ont aussi été observées suite à une infection (Bierman *et al.*, 1953, Gross, 1971, Taqi *et al.*, 1981) ou à l'administration d'un vaccin (Greentree, 1983, R. M. Hansen *et al.*, 1978), suggérant que l'activation du système immunitaire pourrait donner un signal d'alerte nécessaire pour mettre en branle la réponse contre les cellules cancéreuses. Enfin, lors du processus de transformation, les cellules vont acquérir des modifications qui peuvent mener à l'expression d'antigènes permettant au système immunitaire de différencier les cellules cancéreuses des cellules saines. Cette distinction peut être faite car les antigènes associés aux tumeurs (TAA) sont soit mutés, modifiés au niveau post-transcriptionnel, surexprimés, normalement présents dans les tissus fœtaux ou d'origine virale. En conclusion, il est maintenant accepté que le système immunitaire a un rôle crucial dans le contrôle des cancers.

4.2.1 Les cellules immunitaires intratumorales

Plusieurs populations de cellules immunitaires sont impliquées dans l'identification et la destruction des cellules cancéreuses. Bien que les cancers soient composés d'une multitude de maladies pour lesquels la réponse immunitaire protectrice peut différer, certains intervenants sont universellement reconnus comme étant impliqués dans le contrôle des cancers. Il s'agit des cellules présentatrice d'antigènes, des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que des cellules tueuses naturelles (NK). Tel que mentionné dans une section précédente, la première étape pour générer une réponse T est la présentation des antigènes. Ainsi, il a été démontré que les APC présentes dans les tumeurs sont impliquées dans la présentation des antigènes tumoraux sur le CMH-II, mais aussi sur le CMH-I suite à la présentation croisée et l'activation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (C. Liu *et al.*, 2008, Matheoud *et al.*, 2011, Ochsenbein *et al.*, 2001). Par la suite, les lymphocytes T CD8⁺ vont reconnaître les antigènes tumoraux présentés sur le CMH-I des cellules tumorales et vont les tuer en produisant des granules cytotoxiques, en exprimant Fas-L et en produisant des cytokines effectrices comme l'IFN- γ et le TNF- α . Les lymphocytes T CD4⁺ quant à eux, sont nécessaires au développement de la réponse T CD8⁺ anti-tumorale en produisant des cytokines Th1 et en activant les DC suite à l'interaction CD40-CD40L (Bos *et al.*, 2010, Church *et al.*, 2013, Schietinger *et al.*, 2010, Schoenberger *et al.*, 1998). Bien qu'il soit fréquent que les cellules cancéreuses aient une expression réduite des molécules du CMH, rendant l'intervention des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ difficile, il a été observé que la production d'IFN- γ et de TNF- α par ces cellules puissent directement induire la mort des cellules tumorales (Briesemeister *et al.*, 2011, Mumberg *et al.*, 1999). De plus, l'équipe du Dr Schreiber a démontré qu'en absence d'expression du CMH-I sur les cellules tumorales, le développement d'une réponse cellulaire contre les cellules stromales, non malignes, mais essentielles à la survie et la croissance des tumeurs, était suffisante pour éliminer les cellules cancéreuses dans un modèle de fibrosarcome chez la souris (Schietinger *et al.*, 2010). En outre, l'absence de CMH-I sur les cellules cancéreuses mène à l'activation des cellules NK qui pourront tuer les cellules cancéreuses via l'expression de FasL, perforine ou TRAIL (*tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) (Kodama *et al.*, 1999, Screpanti *et al.*, 2001, Smyth *et al.*, 2001, Smyth *et al.*, 1999, K. Takeda *et al.*, 2001). Les cellules tumorales peuvent aussi exprimer les molécules de stress, comme les ligands de NKG2D, qui vont activer les fonctions cytolytiques des cellules NK (Chan *et al.*, 2014, Gasser *et al.*, 2005, Guerra *et al.*, 2008). Enfin, les cellules NK activées peuvent aussi interagir avec les DC afin d'augmenter la réponse cellulaire anti-tumorale (Adam *et al.*, 2005, Mocikat *et al.*, 2003).

La présence de certains types de cellules immunitaires peut aussi être néfaste au contrôle de la tumeur. Par exemple, une augmentation dans la quantité de cellules T régulatrices (T_{reg}) est fréquemment observée et a été associée avec un mauvais pronostic (Bates *et al.*, 2006, Perrone *et al.*, 2008, Petersen *et al.*, 2006, Viguiet *et al.*, 2004, Wolf *et al.*, 2003, Zou, 2006). En effet, les T_{reg} vont : 1- compétitionner avec les autres lymphocytes T pour l'IL-2, 2- exprimer de fort niveau de CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) et 3- produire des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β), ce qui mènent à une diminution globale de la fonctionnalité des principaux acteurs nécessaires à l'élimination des cellules cancéreuses (Shevach, 2009, Yamaguchi *et al.*, 2011). Enfin, les cellules myéloïdes suppressives (MDSC), une population hétérogène de cellules $CD11b^+Gr-1^+$, sont aussi augmentées dans plusieurs cas de cancer et ont un effet immunosuppresseur sur les CTL et les NK suite à la production d'oxyde nitrique synthase (iNOS), de TGF- β et d'Indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Idorn *et al.*, 2014, Khaled *et al.*, 2014, Yu *et al.*, 2013).

4.2.2 L'effet du microenvironnement tumoral sur le contrôle des tumeurs

Il est maintenant bien connu que le microenvironnement tumoral a un impact majeur sur l'efficacité des différents traitements visant à éliminer les tumeurs. En effet, l'absence ou la présence de plusieurs éléments au sein de la tumeur limitent l'action des cellules immunitaires. Il s'agit entre autres des chimiokines et des cytokines, des molécules co-stimulatrices et inhibitrices, des cellules immunitaires, ainsi que des mutations subites par les cellules cancéreuses.

4.2.2.1 Les chimiokines et les cytokines tumorales

Les tumeurs sont composées de plusieurs types cellulaires qui interagissent et communiquent ensemble entre autres en produisant des chimiokines et des cytokines. Celles-ci peuvent avoir un impact majeur sur la réponse immunitaire anti-tumorale. D'une part, une absence de production de chimiokines dans la tumeur ou encore une production de chimiokines qui ont un effet répulsif sur les lymphocytes T a été observée dans plusieurs types de cancer, dont le mélanome (Harlin *et al.*, 2009, Monteagudo *et al.*, 2007, Vianello *et al.*, 2006). Ce phénomène limite l'infiltration des lymphocytes T et donc leur action sur les cellules tumorales. En outre, certaines chimiokines, comme CXCL12, CCL4 et CCL5, produites en grande quantité dans plusieurs cas de cancers, vont engendrer l'infiltration de cellules indésirables dans la tumeur

comme les MDSC, les macrophages ou les T_{reg} et sont associées à un mauvais pronostic (Gobert *et al.*, 2009, Jaafar *et al.*, 2009, Popple *et al.*, 2012, Schlecker *et al.*, 2012) alors que les molécules CXCL16 ou CXCL10 favorisent plutôt l'infiltration de cellules désirables comme les lymphocytes T $CD8^+$ et corrélient avec une augmentation du temps de survie (Harlin *et al.*, 2009, Hojo *et al.*, 2007). Néanmoins, bien que dans certains cas une forte infiltration de cellules T ait été observée, celle-ci n'est souvent pas suffisante pour permettre de contenir et éliminer la tumeur (Harlin *et al.*, 2006, Rosenberg *et al.*, 2005). Cela est en partie dû aux cytokines produites par les cellules tumorales et les cellules infiltrant la tumeur comme le TGF- β et l'IL-10. En effet, la production de TGF- β par les cellules tumorales, les Treg et les MDSC va inhiber la prolifération et les propriétés cytotoxiques des cellules NK et des lymphocytes T (Crane *et al.*, 2010, H. Li *et al.*, 2009a, Rook *et al.*, 1986, Somasundaram *et al.*, 2002), en plus d'induire la différenciation des cellules T $CD4^+$ en cellules T_{reg} (W. Chen *et al.*, 2003) et d'engendrer l'apoptose des cellules dendritiques (Ito *et al.*, 2006). L'IL-10, quant à elle, va inhiber la présentation antigénique, l'expression du CMH-II et des molécules de co-stimulation, en plus de prévenir la production des cytokines Th1 (de Waal Malefyt *et al.*, 1991, Ding *et al.*, 1993, Fiorentino *et al.*, 1991). En effet, bien que les APC telles que les DC et les macrophages soient importantes pour le développement d'une réponse immunitaire cellulaire, l'environnement immunosuppresseur des tumeurs fait en sorte que leur présence n'est habituellement pas favorable au contrôle de la tumeur. En fait, dans ces conditions, la présence d'IL-10, de TGF- β et de prostaglandin E2 (PGE2) va mener à la polarisation des macrophages en macrophage M2 qui vont, d'une part, perdre leur capacité à produire de l'IL-12 et à présenter sur leur CMH-II les antigènes tumoraux, mais aussi sécréter de l'IL-10, du TGF- β , des métalloprotéinases et du VEGF. La sécrétion de ces facteurs a pour conséquence d'inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale et de promouvoir le remodelage tissulaire ainsi que l'angiogenèse ce qui favorise la progression de la tumeur (Mitsushashi *et al.*, 2004, Sica *et al.*, 2006, B. Zhang *et al.*, 2012). D'ailleurs, la présence de macrophage M2 dans la tumeur est généralement associée à un mauvais pronostic (Petrillo *et al.*, 2015, B. Zhang *et al.*, 2011, M. Zhang *et al.*, 2014). De leur côté, les pDC présentes dans les tumeurs ne sont pas en mesure de produire l'IFN- α (Bekeredjian-Ding *et al.*, 2009, Sisirak *et al.*, 2012, Sisirak *et al.*, 2013) qui serait bénéfique à la réponse immunitaire, mais vont plutôt activer les T_{reg} via l'expression de ICOS-L (Conrad *et al.*, 2012) et la production d'IDO (Munn *et al.*, 2004, Munn *et al.*, 2002, M. D. Sharma *et al.*, 2007). La production d'IDO va aussi mener à la dégradation du tryptophane, ce qui engendre la production de métabolites pro-apoptotiques qui provoquent donc la dysfonction et l'apoptose des lymphocytes T (Fallarino *et al.*, 2002, Munn *et al.*, 2005). De plus, la présence d'IL-10 va

mener à la production de DC qui induisent une réponse immunitaire de tolérance (Steinbrink *et al.*, 1997, Wakkach *et al.*, 2003). Ainsi, la déplétion des DC améliore le contrôle des tumeurs dans certains modèles de cancer (Huarte *et al.*, 2008, Sawant *et al.*, 2012). Enfin, dans plusieurs cas de cancer, de faibles productions de cytokines importantes pour la réponse des lymphocytes T et des NK, comme l'IL-2, l'IL-12 et l'IFN- γ , ont été observées et ont été associées à un mauvais pronostic (Algarra *et al.*, 2004, Rayman *et al.*, 2000, Zea *et al.*, 2004).

4.2.2.2 Les molécules co-stimulatrices et inhibitrices

En plus de la dérégulation dans la production des messagers, une modification de l'expression de molécules co-stimulatrices et inhibitrices peut aussi limiter l'action des cellules immunitaires présentes au sein de la tumeur. Par exemple, les cellules tumorales ainsi que les cellules présentatrices d'antigènes de la tumeur n'expriment généralement pas les molécules B7-1 et B7-2 (Byrne *et al.*, 2003, Toutirais *et al.*, 2003). La présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T se fait donc en absence de signal de co-stimulation ce qui favorise le développement de lymphocytes T anergiques (Crespo *et al.*, 2013, F. A. Harding *et al.*, 1992). Par ailleurs, les cellules tumorales et les fibroblastes sont reconnues pour exprimer des régulateurs négatifs à leur surface ce qui a pour conséquence d'inhiber la fonction ou d'engendrer l'apoptose des lymphocytes T (Blank *et al.*, 2005, Byrne *et al.*, 2003, Hahne *et al.*, 1996, Iwai *et al.*, 2002, Nazareth *et al.*, 2007, O'Connell *et al.*, 1996). En effet, lorsque les lymphocytes T sont activés, ils vont exprimer PD-1 (*programmed cell death 1*) à leur surface. Suite à l'interaction de PD-1 avec ses ligands PD-L1 ou PD-L2, exprimés par les APC ou les cellules tumorales, la signalisation TCR sera inhibée, ce qui mettra un frein à la réponse T (Freeman *et al.*, 2000, Latchman *et al.*, 2001, Sheppard *et al.*, 2004). De plus, l'expression élevée de PD-L1 à la surface de cellules de carcinomes ou de mélanomes humains a été associée avec une apoptose plus importante des lymphocytes T spécifiques à la tumeur (Dong *et al.*, 2002). L'expression des ligands de PD-1 à la surface des cellules tumorales peut être constitutive (Azuma *et al.*, 2014, Parsa *et al.*, 2007) ou encore induite par la production d'IFN- γ par les lymphocytes T infiltrant la tumeur (Spranger *et al.*, 2013, Taube *et al.*, 2012). Ainsi la présence de PD-L1 sur les cellules tumorales peut être associée autant à un mauvais (Azuma *et al.*, 2014, Gao *et al.*, 2009), qu'à un bon (Lipson *et al.*, 2013, Spranger *et al.*, 2013) pronostic selon le type de cancer. Quant à elle, l'expression de Fas-L sur les cellules cancéreuses va mener à l'induction de la mort par apoptose des lymphocytes T exprimant Fas et a été associé à des formes de cancers plus agressifs (Byrne *et al.*, 2003, Hahne *et al.*, 1996, O'Connell *et al.*, 1996). Les molécules inhibitrices et leurs récepteurs peuvent aussi être exprimées à la surface

des cellules immunitaires. C'est entre autres le cas des cellules Treg, dont les fonctions suppressives dépendent en partie de leur forte expression constitutive de CTLA-4 (Read *et al.*, 2000, Takahashi *et al.*, 2000, Q. Tang *et al.*, 2004). Chez les lymphocytes T non régulateurs, l'engagement du CTLA-4 avec ses ligands CD80 et CD86 va envoyer des signaux inhibiteurs aux lymphocytes T (Krummel *et al.*, 1995). De plus, puisque CTLA-4 a une plus forte affinité que CD28 pour les molécules de co-stimulation, il y aura une compétition pour leur liaison, ce qui limite le signal de co-stimulation via CD28 (Krummel *et al.*, 1995). Les APC de la tumeur sont aussi reconnues pour augmenter leur expression de PD-L1 et PD-L2 (Lesterhuis *et al.*, 2011, M. D. Sharma *et al.*, 2007) alors qu'un niveau élevé de PD-1 est observé chez les lymphocytes T CD8⁺ non fonctionnels infiltrant les mélanomes ou les lymphomes folliculaires humains (Ahmadzadeh *et al.*, 2009, Myklebust *et al.*, 2013). Enfin, d'autres récepteurs inhibiteurs, comme Tim-3 et LAG-3, sont aussi surexprimés au niveau des lymphocytes T CD8⁺ isolés du sang ou de la tumeur de patients atteints de mélanomes et de cancer des ovaires et contribuent à la dysfonction de ces cellules (Fourcade *et al.*, 2010, Matsuzaki *et al.*, 2010). Ainsi, bien que les molécules co-stimulatrices et inhibitrices soient nécessaires pour éviter le développement de réponses immunitaires auto-immunes ou exacerbées, la modification de leur expression dans le microenvironnement tumoral va réprimer la réponse immunitaire cellulaire anti-tumorale.

4.2.2.3 Les mutations des cellules cancéreuses

Que ce soit lors du processus de transformation ou suite à la pression de sélection du système immunitaire, les cellules cancéreuses vont acquérir des mutations qui les rendent plus difficilement identifiables par les cellules du système immunitaire. Tout d'abord, une diminution de l'expression des molécules de CMH-I sur les cellules cancéreuses est fréquemment observée (Benitez *et al.*, 1998, Maleno *et al.*, 2004, Paco *et al.*, 2007, Z. Wang *et al.*, 1993). Celle-ci peut être causée par des mutations au niveau de la β 2 microglobuline ou dans la machinerie de dégradation et de présentation des antigènes, comme des déficiences dans les molécule TAP et tapasine, et limite la reconnaissance des cellules cancéreuses par les lymphocytes T CD8⁺ (Aladin *et al.*, 2007, Benitez *et al.*, 1998, X. L. Li *et al.*, 2009b, Maleno *et al.*, 2004, Paschen *et al.*, 2003). La diminution d'expression du CMH-I sur les cellules cancéreuses pourrait en théorie augmenter leur reconnaissance par les NK. Cependant, bon nombre de cellules cancéreuses vont exprimer des molécules de CMH non classiques, comme HLA-E ou HLA-G, ce qui va leur permettre de contourner ce mécanisme (Algarra *et al.*, 2004, Derre *et al.*, 2006). Les cellules tumorales peuvent aussi perdre l'expression de récepteur de mort, comme TRAIL et Fas, (French *et al.*, 2002), ou encore sécréter des facteurs solubles tels sFas et sFasL,

ce qui limite la destruction des cellules tumorales par les lymphocytes T CD8⁺ et les cellules NK (Enjoji *et al.*, 2004, Hallermalm *et al.*, 2004, Kondera-Anasz *et al.*, 2005, Sheen-Chen *et al.*, 2003, E. Song *et al.*, 2001). Enfin, la réponse immunitaire montée spécifiquement contre les TAA est souvent associée à la sélection de variants qui n'expriment plus les antigènes tumoraux. Ce phénomène a souvent été observé entre autre dans des cas de mélanome où l'expression d'antigènes immunodominants connus comme gp100, TPR-2 ou MART-1 est perdue (Jager *et al.*, 1997, Lozupone *et al.*, 2003, Maeurer *et al.*, 1996, Sanchez-Perez *et al.*, 2005).

Ainsi, bien que des lymphocytes T spécifiques aux TAA soient générés de façon naturelle, l'environnement immunosuppresseur de la tumeur va limiter leur action. De plus, dans la majorité des cas, plusieurs aspects de la réponse immunitaire seront affectés simultanément, rendant le contrôle de cette maladie par le système immunitaire très complexe (Harlin *et al.*, 2006). Enfin, la pression de sélection créée par la réponse immunitaire anti-tumorale peut aussi jouer un rôle dans l'évasion des cellules cancéreuses par le phénomène d'immuno-édition (R. Kim *et al.*, 2007). En effet, ce phénomène se caractérise par trois phases distinctes soit l'élimination, l'équilibre et l'évasion. Durant la première phase le système immunitaire va éliminer les cellules cancéreuses, cependant, certaines cellules non immunogéniques ou résistantes vont persister lors de la phase d'équilibre. Enfin, lors de la phase d'évasion, des facteurs immunosuppresseurs dérivés de la tumeur vont promouvoir la progression de ces cellules, échappant alors à la surveillance du système immunitaire, soulignant l'importance d'attaquer les cellules cancéreuses sur plusieurs fronts afin d'éviter ce type de problème. Avec la meilleure compréhension des facteurs présents dans le microenvironnement tumoral qui affectent la capacité du système immunitaire à maîtriser les tumeurs, il est maintenant possible de cibler ces éléments dans le but d'accroître l'efficacité des traitements.

4.3 L'immunothérapie du cancer

L'immunothérapie du cancer est un procédé qui est basée sur l'utilisation du système immunitaire pour détruire spécifiquement les cellules cancéreuses. Cette technique a plusieurs avantages en comparaison avec les méthodes traditionnelles comme la chimiothérapie ou la radiothérapie. Par exemple, certaines méthodes d'immunothérapie permettent de générer une mémoire immunologique qui pourrait potentiellement réduire les risques de rechute. Ce type de traitement est aussi beaucoup plus ciblé au niveau des cellules tumorales, ce qui fait en sorte que les effets secondaires sont généralement beaucoup moins importants que les thérapies

usuelles. Ainsi, un intérêt grandissant est accordé à l'immunothérapie comme nouvelle méthode de lutte contre plusieurs types de cancer dont le mélanome. En effet, comme le mélanome est l'un des cancers qui comporte le plus de mutations, cela augmente la quantité de TAA qu'il est possible de cibler par l'immunothérapie (Stratton, 2011). De plus, alors que la réaction d'auto-immunité, l'effet secondaire le plus néfaste observé avec l'utilisation de l'immunothérapie, freine l'utilisation de cette méthode pour certains types de cancer, ce n'est pas un problème dans le cas du traitement du mélanome. En effet, puisque les mélanocytes ne sont pas nécessaires à notre survie, leur destruction par phénomène d'auto-immunité induite par l'immunothérapie est un effet secondaire tolérable. Enfin, des régressions spontanées, des réactions de dépigmentation de la peau (vitiligo) et des effets abscopals ont été observés dans plusieurs cas de mélanome, ce qui appuie l'implication du système immunitaire dans le contrôle de ce type de cancer (Bramhall *et al.*, 2014, Printz, 2001, Sumner, 1953, Tran *et al.*, 2013).

À ce jour, seulement quelques méthodes d'immunothérapie sont approuvées pour le traitement de certains cancers (Tableau 3). Cependant, des centaines de traitements prometteurs sont actuellement en développement ou en étude clinique et de nombreuses recherches sont effectuées afin d'en améliorer l'efficacité. Il existe présentement trois principales classes d'immunothérapie : la thérapie cellulaire, le blocage de mécanismes inhibiteurs et l'administration de molécules immunomodulatrices.

Tableau 3. Exemples d'immunothérapies du cancer approuvées
(Compilation d'après U.S. Food and Drug Administration)

Méthode d'immunothérapie	Classe d'immunothérapie	Type de cancer visé
Sipuleucel T (vaccin DC)	Thérapie cellulaire	Cancer de la prostate métastatique
Nivolumab, Pembrolizumab (Anti-PD1)	Blocage de mécanismes inhibiteurs	Mélanome, cancer du poumon non à petites cellules, carcinome rénal
Ipilimumab (anti-CTLA-4)	Blocage de mécanismes inhibiteurs	Mélanome
Aldara (imiquimod 5%)	Molécules immunomodulatrices	Verrues génitales et périanales externes causées par le virus du papillome humain (VPH), kératose actinique, carcinomes basocellulaires superficiels primaires
Proleukin (IL-2)	Molécules immunomodulatrices	Mélanome, carcinome rénal
Interferon alfa-2a,	Molécules immunomodulatrices	Certains types de leucémie, mélanome

4.3.1 La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire est basée sur le transfert de cellules immunitaires, majoritairement des DC et des lymphocytes T, afin d'obtenir une réponse immunitaire cellulaire anti-tumorale. En effet, les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques aux TAA sont très importants pour le contrôle des cellules

cancéreuses. Cependant, comme les TAA sont souvent des antigènes dérivés des protéines du soi, les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques sont souvent délétés, anergiques ou épuisés (Crespo *et al.*, 2013). Ainsi, différentes méthodes d'immunothérapie visent à les rendre fonctionnelles.

4.3.1.1 L'immunisation à l'aide de cellules dendritiques

La thérapie cellulaire basée sur l'immunisation avec des DC consiste à injecter aux patients des DC matures présentant des TAA afin d'induire le développement de lymphocytes T spécifiques qui pourront détruire les cellules tumorales et la formation d'une population de cellules mémoires permettant d'éviter les rechutes. Les essais cliniques réalisés avec ce type de vaccination thérapeutique ont démontré que l'injection de DC autologues présentant des TAA est non seulement sécuritaire, mais permet aussi de générer lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques (Palucka *et al.*, 2012). Cependant, les bénéfices obtenus restent encore modestes. Malgré tout, le Sipuleucel T, un vaccin contre le cancer de la prostate basé sur l'immunisation avec des DC autologues activées avec un antigène prostatique fusionné au facteur de croissance des granulocytes et macrophages (GM-CSF) a été autorisé par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) en 2010 puis par l'agence européenne des médicaments (EMA) en 2013 et permet d'augmenter significativement la survie des patients (Kantoff *et al.*, 2010). Dans le but d'améliorer l'efficacité et la faisabilité de la vaccination à base de DC, les recherches et les études cliniques effectuées au cours des dernières années ont testé différents paramètres liés à cette méthode tels que : 1- la source de DC, 2- les conditions de culture et 3- le type et la source de TAA utilisées. Cela a permis l'établissement de différents protocoles et l'identification de leurs avantages et inconvénients. Par exemple, la vaccination avec les DC présentant des antigènes tumoraux utilisait initialement des DC isolées directement du sang du patient. Cependant comme leur nombre est très faible, cela limitait la faisabilité de ce traitement. Ainsi, avec le développement de méthodes de culture permettant de générer des DC à partir des monocytes sanguins ou encore des cellules CD34⁺ progénitrices, ce procédé s'est révélé plus envisageable. Selon la méthode d'isolement ou les conditions de culture utilisées, différents types de DC sont obtenus, ce qui a des répercussions considérables sur l'efficacité de la thérapie cellulaire (Palucka *et al.*, 2012). Par exemple, il a été démontré dans des essais de stimulation *ex vivo* de lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL) que les pDC isolées du sang sont plus efficaces que les DC myéloïdes pour induire le développement de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques permettant la lyse des cellules cibles (Aspord *et al.*, 2010). De plus, un essai clinique a prouvé que bien que ce sous-type de DC est présent en faible quantité dans le sang, la vaccination à l'aide de pDC est faisable et efficace pour monter une réponse CTL contre la

tumeur (Tel *et al.*, 2013). En outre, les conditions de culture affectent aussi l'état de maturation et d'activation des DC, ce qui va influencer l'efficacité du traitement (de Vries *et al.*, 2003, Jonuleit *et al.*, 2001). Différentes stratégies ont donc été testées afin de s'assurer que les DC transférées soient dans un état favorable au développement de la réponse T CD8⁺ anti-tumorale. Celles-ci comprennent, entre autres, l'ajout de cytokines proinflammatoires ou de ligands de TLR au milieu de culture (Jonuleit *et al.*, 1997, Mailliard *et al.*, 2004, C. Massa *et al.*, 2015). Cependant, cette méthode s'est parfois révélée peu efficace et un certain épuisement des cellules a été observé lors de tests *in vitro* (Kalinski *et al.*, 1999, Langenkamp *et al.*, 2000). Alternativement, la modification directe des DC par électroporation d'ARN messagers (ARNm) ou de petits ARN interférents afin d'induire l'expression de CD40L ou CD70 ou d'inhiber l'expression des ligands de PD-1 sur les DC transférées, a démontré un grand potentiel lors de tests *in vivo* avec des modèles de cancers murins, des expériences *ex vivo* avec des PBMC de patients ou encore dans un essai clinique avec des patients atteints de mélanome de stade avancé (Hobo *et al.*, 2013, Kikuchi *et al.*, 2000, Wilgenhof *et al.*, 2011). L'équipe du Dr Sampson a aussi démontré que le conditionnement des patients atteints d'un glioblastome avec la toxine tétanique génère une réponse inflammatoire qui mène à une augmentation de la migration des DC transférées dans les ganglions, ce qui résulte en une amélioration de la survie (Mitchell *et al.*, 2015).

Les DC utilisées proviennent majoritairement du patient, mais peuvent aussi être isolées d'un donneur. En fait, il semble que les DC provenant d'un donneur compatible soient souvent plus efficaces que les DC provenant du patient. D'une part, les DC autologues sont potentiellement dysfonctionnelles, due à la présence d'un environnement immunosuppresseur chez le patient. D'autre part, les DC présentant des alloantigènes permettent de générer des CTL plus efficaces grâce au développement d'une aide CD4⁺ (Suzuki *et al.*, 2005, Yasuda *et al.*, 2007). En outre, le choix des antigènes et de la méthode utilisés pour charger ces APC n'est pas non plus à négliger. Alors que l'expression des TAA par les DC était initialement restreinte à l'utilisation de peptides ou de lysats tumoraux qui requière l'emploi d'une approche personnalisée, elle se fait maintenant de plus en plus grâce à la transformation des DC avec des ARNm. Bien que cette méthode puisse affecter la viabilité des cellules, elle permet de générer des TAA protéiques contenant plusieurs épitopes pouvant activer autant les lymphocytes T CD4⁺ que CD8⁺. De plus, elle ne nécessite pas de se préoccuper de la restriction HLA (*human leukocyte antigen*) et a mené à des résultats prometteurs pour le traitement du mélanome (Bonehill *et al.*, 2009, Kyte *et al.*, 2006, Van Lint *et al.*, 2014, Wilgenhof *et al.*, 2011). Enfin, l'immunisation avec les DC pourrait aussi être associée à d'autres stratégies dans le but de surmonter le

microenvironnement immunosuppresseur de la tumeur et d'obtenir un bénéfice supérieur (Palucka *et al.*, 2011a, Palucka *et al.*, 2011b).

4.3.1.2 Le transfert de lymphocytes T CD8⁺

Afin d'obtenir des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques anti-tumoraux fonctionnels, une autre stratégie adoptée est le transfert direct de ces cellules. Ainsi, les TIL sont isolés de la tumeur du patient et sont cultivés *ex vivo* en présence de différents facteurs de croissance afin de les amplifier pour ensuite les réinjecter au patient. Avec cette méthode, on assume que les TIL sont spécifiques pour des antigènes tumoraux et que leur présence en plus grande quantité permettra un meilleur contrôle de celle-ci. Cependant, cette méthode a rencontré plusieurs obstacles freinant son utilisation. Par exemple, il a été démontré dans un modèle de mélanome chez la souris, qu'il y avait production de CXCL12 qui freine l'infiltration des CTL dans la tumeur, les empêchant par le fait même d'effectuer leurs fonctions effectrices (Vianello *et al.*, 2006). D'autre part, bien que ces cellules semblent fonctionnelles *in vitro*, une perte des capacités cytolytiques a été observée *in vivo*. Cela est en partie due au microenvironnement immunosuppresseur de la tumeur. En effet, il a été observé que les MDSC ainsi que les T_{reg} limitent l'action des lymphocytes T transférés (Antony *et al.*, 2005, Arina *et al.*, 2015). La perte de fonction peut aussi être engendrée par un épuisement causé par l'expansion de ces cellules *in vitro* (Janelle *et al.*, 2015). Ainsi, une des méthodes utilisées pour améliorer l'efficacité du transfert adoptif est d'effectuer une lymphodéplétion et d'injecter de façon concomitante de l'IL-2 afin de soutenir la prolifération, la survie et la fonctionnalité des lymphocytes T transférés. Cette combinaison a permis d'atteindre des taux de réponse très élevés dans les essais cliniques chez des patients atteints de mélanome métastatique en plus de mener à l'élimination complète des tumeurs pour certains patients (Dudley *et al.*, 2008, Rosenberg *et al.*, 2011). En outre, il a été remarqué que l'efficacité de l'immunothérapie à l'aide de lymphocytes T CD8⁺ diffère selon le phénotype des cellules utilisées. En effet, plus les cellules sont dans un état de différenciation avancée, moins leurs capacités prolifératives et anti-tumorales sont bonnes (Gattinoni *et al.*, 2005, Restifo *et al.*, 2012). Dans le même ordre d'idées, il a été démontré dans un modèle de mélanome murin, ainsi que lors de tests *in vitro* avec des cellules humaines, que les cellules T CD8⁺ naïves avaient de meilleures aptitudes que les cellules mémoires (Hinrichs *et al.*, 2009, Hinrichs *et al.*, 2011) et que les T_{CM} étaient plus efficace que les T_{EM} (Klebanoff *et al.*, 2005) en contexte de transfert adoptif. De façon encore plus intéressante, les T_{SCM} possèdent plusieurs des qualités requises pour mener à la réussite du transfert adoptif. Phénotypiquement, ces cellules sont similaires aux cellules naïves, via leur expression de CCR7, CD62L, CD27, CD28

et IL-7R, mais aussi aux lymphocytes T mémoires puisqu'elles expriment CD95, IL-2R β , CXCR3 et LFA-1 (Gattinoni *et al.*, 2011). En comparaison aux autres populations de lymphocytes T, les T_{SCM} présentent des capacités de prolifération, de survie et de reconstitution de souris immunodéficientes supérieures, ce qui leur permet dans le modèle de mélanome murin B16, d'induire une réponse anti-tumorale plus efficace (Gattinoni *et al.*, 2009). Beaucoup d'espoir est donc mis dans la thérapie cellulaire utilisant le transfert de T_{SCM}.

Lorsque les TAA sont connus, une nouvelle approche utilisant le transfert de lymphocytes T modifiés afin qu'ils expriment un récepteur antigénique chimérique (CAR) est aussi possible. Les CAR sont des récepteurs composés de la région variable des chaînes lourdes et légères d'un anticorps monoclonal joint à un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique contenant des motifs ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) comme la chaîne zêta du TCR, afin de médier le signal (figure 5). De plus, puisque les signaux de costimulation sont peu présents dans l'environnement tumoral, les CAR de deuxième et troisième génération ont été modifiés afin de contenir au niveau de leur queue cytoplasmique un ou des domaines intracellulaires de récepteur de costimulation tel que CD28, OX40 et 4-1BB, afin d'engendrer un signal suffisamment fort pour mener à une activation efficace des lymphocytes T CD8⁺ (Dotti *et al.*, 2014). Ainsi, lorsque le fragment d'anticorps reconnaît l'épitope auquel il est spécifique, cela active la prolifération et les fonctions cytolytiques des lymphocytes T CD8⁺ transformés. Cette technique a permis d'améliorer le taux de réponse obtenu lors de transfert adoptif de lymphocytes T, mais engendre aussi de fortes toxicités dues à la production excessive de cytokines et peut mener au phénomène d'évasion tumoral (Kershaw *et al.*, 2014, R. A. Morgan *et al.*, 2010). Dans le but d'améliorer la spécificité de la réponse immunitaire et de limiter les effets secondaires, différentes stratégies sont envisagées. D'une part, les cellules T peuvent être modifiées afin de contenir un gène suicide permettant d'induire l'apoptose de 99% des cellules transférés suite à l'injection d'une molécule biologiquement inerte en cas d'effets secondaires non désirables (Di Stasi *et al.*, 2011, Straathof *et al.*, 2005). En outre, les lymphocytes T peuvent exprimer un deuxième récepteur qui engendre des signaux activateurs ou inhibiteurs dans le but d'affiner la sensibilité du CAR. Par exemple, il est possible d'ajouter un récepteur inhibiteur qui reconnaît un antigène exprimé par des cellules normales afin d'éviter l'attaque des cellules saines ou d'adjoindre un récepteur co-stimulateur qui va permettre une réponse optimale seulement lors de la détection d'un deuxième TAA (Kloss *et al.*, 2013, Lanitis *et al.*, 2013, Wilkie *et al.*, 2012). Comme les CAR reconnaissent des épitopes exprimés à la surface des cellules tumorales, cela permet de contourner le problème de perte de reconnaissance au niveau des tumeurs ayant des mutations dans la machinerie de présentation

antigénique, de ne pas avoir à se soucier de la restriction HLA et de pouvoir cibler des antigènes non protéiques (Dotti *et al.*, 2014).

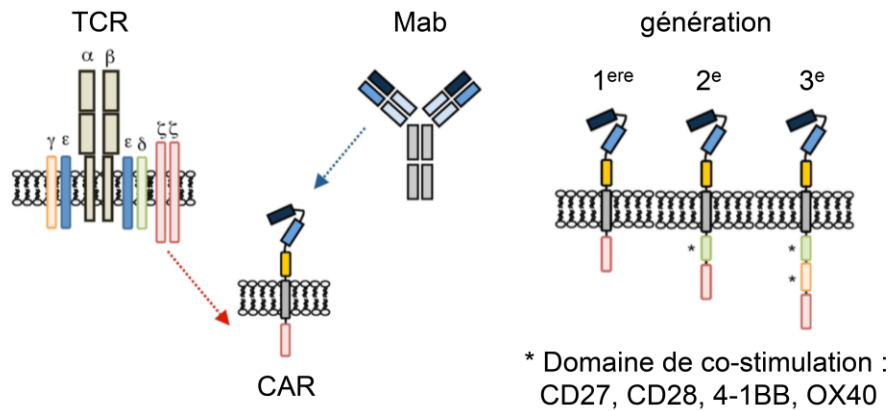


Figure 5. Les récepteurs antigéniques chimériques (CAR)

Adapté de Dotti *et al.*, 2014

La thérapie cellulaire est donc une méthode prometteuse d'immunothérapie du cancer, mais dont le plein potentiel ne pourra être atteint si on ne réussit pas à surmonter l'immunosuppression présent dans environnement tumoral.

4.3.2 Le blocage de mécanismes inhibiteurs

Afin de prévenir le développement de réponse immunitaire exacerbée ou d'auto-immunité, plusieurs mécanismes ont été mis en place par le système immunitaire. Cependant, ces mécanismes peuvent aussi freiner le développement de réponses immunitaires désirables comme la réponse anti-tumorale. Ainsi, afin d'éviter l'inhibition de ce type de réponse immunitaire, différentes stratégies ont été développées.

À titre d'exemple, il a été observé que les niveaux d'expression de plusieurs récepteurs inhibiteurs ainsi que leurs ligands sont augmentés dans plusieurs cas de cancer et qu'ils contribuent à freiner la réponse immunitaire anti-tumorale. Les chercheurs ont donc créé des anticorps bloquant ces molécules afin de rétablir la réponse immunitaire anti-tumorale. Ainsi, l'anticorps anti-CTLA-4 a été autorisé aux États-Unis pour le traitement du mélanome en 2011 et ceux dirigés contre PD-1 ont pu être utilisés à partir de 2014 dans la thérapie du mélanome et de certains cancers du poumon et rénaux. L'administration de ces anticorps s'est révélée efficace pour augmenter l'activation des lymphocytes T, ainsi que restaurer leur prolifération et leur fonctions effectrices (Duraiswamy *et al.*, 2013, Spranger *et al.*, 2014, Tumeh *et al.*, 2014).

Par le fait même, une augmentation significative de la survie des patients a été observée (Hamid *et al.*, 2013, Hodi *et al.*, 2010, P. A. Ott *et al.*, 2013, Wolchok *et al.*, 2013a). D'autres anticorps ciblant des récepteurs inhibiteurs comme Tim-3 et LAG-3 ou le ligand PD-L1 ont aussi été développés et ont démontré un bon potentiel dans des études chez la souris, ainsi que lors d'essais cliniques chez des patients atteints de mélanome (Brahmer *et al.*, 2012, Fourcade *et al.*, 2010, Ge *et al.*, 2013, Sakuishi *et al.*, 2010, Woo *et al.*, 2012).

Les anticorps bloquant les récepteurs inhibiteurs ont tout d'abord été utilisés seuls, mais de plus en plus d'études démontrent un avantage à les combiner entre eux ou encore avec d'autres méthodes de traitement du cancer. Par exemple, comme ils ont des mécanismes d'action différents (Parry *et al.*, 2005), des bénéfices ont été observés en combinant les anticorps anti-PD-1 et anti-CTLA-4 ou encore l'anti-PD-1 avec l'anticorps bloquant Tim-3 ou LAG-3 (Duraiswamy *et al.*, 2013, Fourcade *et al.*, 2010, Matsuzaki *et al.*, 2010, Twyman-Saint Victor *et al.*, 2015, Wolchok *et al.*, 2013b). Cependant, les effets secondaires causés par ce type de thérapie sont d'autant plus importants lorsqu'elles sont utilisées en combinaison (Swaika *et al.*, 2015, Wolchok *et al.*, 2013b). En outre, les anticorps bloquant sont aussi en essais cliniques en association avec d'autres types de thérapies comme la vaccination, la chimiothérapie ou la radiothérapie (Apetoh *et al.*, 2015). En effet, comme les radiations mènent à la libération d'antigènes tumoraux, le blocage de différents inhibiteurs de la réponse T à l'aide d'anticorps anti-PD-L1 ou CTLA-4 s'est avéré efficace pour augmenter la réponse immunitaire anti-tumorale et par le fait même l'efficacité de la radiothérapie, avec une augmentation de l'effet abscopal (Dovedi *et al.*, 2014, Grimaldi *et al.*, 2014, Reynders *et al.*, 2015). En outre, d'autres stratégies basées sur le blocage de mécanismes inhibiteurs sont aussi en développement. C'est entre autres le cas de molécules permettant la déplétion des T_{reg} , qui se sont révélées efficaces pour augmenter la réponse immunitaire anti-tumorale sans engendrer d'autoimmunité majeure chez des patients atteints de cancers métastatiques (Ghiringhelli *et al.*, 2007, Rech *et al.*, 2009). Enfin, des anticorps permettant de diminuer la présence des MDSC dans la tumeur ainsi que des inhibiteurs d'IDO ou de la signalisation du TGF- β sont aussi en essais cliniques (Mahoney *et al.*, 2015).

4.3.3 L'administration de molécules immunomodulatrices

Tel que mentionné ci-haut, la production de chimiokines et de cytokines est souvent altérée dans la tumeur, ce qui limite l'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale. Ainsi, l'injection

de ces cytokines a rapidement suscité de l'intérêt afin de rétablir la fonctionnalité des cellules immunitaires et plus particulièrement des lymphocytes T. Dans les années 90, la FDA a approuvé l'administration de deux cytokines, l'IL-2 et l'IFN- α , pour le traitement de différents types de cancer dont le mélanome. Dans ce contexte, l'IL-2 permet d'augmenter la survie et la fonctionnalité des lymphocytes T, alors que l'IFN- α permet de maintenir une forte expression du CD25 et de donner un signal de co-stimulation (Rosenberg, 2014, Starbeck-Miller *et al.*, 2014). Bien que le taux de réponse à ces traitements dépassent rarement les 15%, l'administration de ces cytokines permet d'atteindre une rémission complète chez une petite proportion de ces patients, ce qui n'est pas négligeable (Atkins *et al.*, 1999, Legha, 1997). Cependant, la toxicité que ces traitements engendrent (hyperperméabilité capillaire, troubles hépatiques, neurologiques et rénaux), combinée avec l'arrivée de nouvelles thérapies, a mené à une réduction de leur utilisation (Jonasch *et al.*, 2000, Schwartz *et al.*, 2002). Néanmoins, d'autres cytokines telles que l'IL-15 et l'IL-21 sont aussi à l'étude grâce à leur capacité à augmenter la prolifération et les fonctions des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺, ce qui les rend particulièrement intéressantes en contexte de transfert adoptif de lymphocytes T (G. Wang *et al.*, 2003, Zeng *et al.*, 2005). En fait, des résultats prometteurs ont été obtenus dans des modèles animaux et ces cytokines sont présentement en essais cliniques afin de valider leur sécurité et d'évaluer leur efficacité (Conlon *et al.*, 2015, Hoyos *et al.*, 2010, Perna *et al.*, 2013, Petrella *et al.*, 2012).

Une autre méthode utilisée afin d'augmenter la fonctionnalité des cellules immunitaires est la stimulation à l'aide de ligands de TLR. En effet, bien que ces derniers n'aient pas d'effet cytotoxique direct sur les cellules tumorales, ils favorisent le contrôle de la tumeur en augmentant la réponse immunitaire anti-tumorale (Stier *et al.*, 2013). Plus précisément, différentes études, ainsi que des essais cliniques ont démontré que l'administration de ligands des TLR3, 7/8 ou 9 près de la tumeur engendre l'activation des cellules immunitaires, la production de cytokines pro-inflammatoires et la présentation des antigènes tumoraux par les CPA, ce qui permet d'obtenir un environnement favorable pour le développement de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques fonctionnelles (Krieg, 2007, Molenkamp *et al.*, 2007, Nierkens *et al.*, 2009, Singh *et al.*, 2014, Stier *et al.*, 2013). Par ailleurs, il a été observé qu'un ligand de TLR7 permet de renverser l'état tolérogène des pDC tumorales et que le poly(I:C) diminue la fréquence et les fonctions immunosuppressives des MDSC, ce qui, dans les deux cas, favorise le contrôle de la tumeur dans des modèles de cancer du sein chez la souris (Forghani *et al.*, 2015, Le Mercier *et al.*, 2013). De plus, l'activation des TLR permet non seulement d'avoir un effet positif sur la réponse immunitaire, mais aussi d'augmenter l'immunogénicité des cellules

tumorales. En effet, l'équipe du Dr Kershaw a observé que l'administration de poly(I:C) et de CpG ODN dans la tumeur augmente l'expression de molécules de CMH-I par les cellules de mélanome B16, ce qui pourrait faciliter leur reconnaissance par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques (Amos *et al.*, 2011). Ainsi, l'injection de ligands de TLR intra- ou péri-tumoral s'est révélée efficace pour limiter la croissance des tumeurs dans plusieurs modèles de cancer chez la souris et augmenter la survie des individus lors d'essais cliniques. D'ailleurs, l'imiquimod, un ligand de TLR7 formulé dans une crème topique, est actuellement utilisé pour le traitement de maladies précancéreuses et cancéreuses de la peau. Cependant, l'administration systémique de ces agonistes a donné des résultats décevants pour le traitement du mélanome et l'administration locale ne permet pas de générer une réponse systémique ce qui est limitant dans le but de traiter des patients atteints de métastases ou de tumeurs non atteignables de façon locale (Broomfield *et al.*, 2009, Dummer *et al.*, 2008, Nierkens *et al.*, 2009). Néanmoins, l'utilisation des ligands de TLR permet aussi d'améliorer l'efficacité de différents traitements du cancer. Par exemple, l'injection de poly(I:C) et de CpG ODN permet d'augmenter la survie et la fonctionnalité de lymphocytes T transférés, ce qui résulte en une augmentation significative de la survie des souris atteints d'un mélanome (Amos *et al.*, 2011). Enfin, l'application locale d'un agoniste du TLR7, s'est quant-à-elle révélée efficace pour augmenter le potentiel thérapeutique de la vaccination avec des DC (F. Ma *et al.*, 2010), l'utilisation d'anticorps bloquant anti-PD-L1 (Singh *et al.*, 2014) et l'injection d'anticorps activant le CD40 (Broomfield *et al.*, 2009).

En conclusion, les recherches et les études cliniques réalisées ces dernières années ont permis d'avoir une meilleure compréhension des capacités et des mécanismes d'action de chacun de ces traitements et a mis en lumière l'importance d'attaquer le cancer de plusieurs fronts en combinant différents traitements afin de parvenir à traiter de cette maladie.

5- LE SYSTÈME DU COMPLÉMENT

Le système du complément, découvert par Jules Bordet dans les années 1890, a initialement été défini comme un composant thermolabile du plasma qui augmente l'activité d'opsonisation et de destruction des bactéries. Nous savons maintenant que le système du complément est composé de plus de 30 protéines qui sont situées principalement au niveau du sang, mais aussi localement dans les tissus ou au niveau des membranes (Tableau 4). La production des protéines solubles du complément est majoritairement réalisée par les hépatocytes. Néanmoins, la plupart des cellules dont les monocytes, les macrophages et les cellules épithéliales peuvent aussi y participer (Laufer *et al.*, 2001, B. P. Morgan *et al.*, 1997, Reis *et al.*, 2006, Wurznner *et al.*, 1994). Le principal rôle du système du complément est de contribuer à l'élimination des agents pathogènes. Plus précisément, le système du complément est impliqué au niveau de la réponse immunitaire innée, dans 1- l'opsonisation des agents pathogènes, ce qui facilite leur phagocytose, 2- la lyse directe des agents pathogènes, via la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC), 3- l'induction d'inflammation, ce qui permet le recrutement et l'activation de cellules phagocytaires et finalement 4- l'élimination des complexes immuns.

Tableau 4. Liste des protéines du complément et de leur fonction
(Compilation d'après Kuby, Immunology, 2012)

Protéines	Voies	Localisation	Fonction
C1q	Classique	Soluble	Lie la partie Fc des immunoglobulines, initie l'activation de la voie classique du complément et la phagocytose des cellules apoptotiques
C1r	Classique	Soluble	Sérine protéase, clive C1r et C1s
C1s	Classique	Soluble	Sérine protéase, clive C4 et C2
C2a	Classique et des lectines	Soluble	Sérine protéase, forme une C3 convertase avec C1 et C4b
C2b	Classique et des lectines	Soluble	Portion inactive du C2, le clivage de C2b par la plasmin relâche le C2 kinin, un peptide qui stimule la vasodilatation
C3a	Les 3 voies	Soluble	Anaphylatoxine, engendre de l'inflammation suite à la liaison du C3aR
C3b	Les 3 voies	Soluble	Opsonisation des pathogènes, identifier les complexes immuns, les agents pathogènes et les cellules apoptotique pour la phagocytose. Forme la C3 convertase avec Bb, forme la C5 convertase avec C4b et C2a ou avec Bb et d'autres molécules de C3b (C3bBb3b)
C4a	Classique et des lectines	Soluble	Anaphylatoxine ayant une faible activité inflammatoire
C4b	Classique et des lectines	Soluble	Lie les membranes cellulaires microbiennes, forme la C3 convertase avec C1 et C2a
C5a	Les 3 voies	Soluble	Anaphylatoxine, se lie au C5aR pour induire de l'inflammation
C5b	Les 3 voies	Soluble	Composant du MAC, lie la membrane cellulaire et facilite la liaison des autres composants du MAC

C6	Les 3 voies	Soluble	Composant du MAC, stabilise C5b
C7	Les 3 voies	Soluble	Composant du MAC, lie C5bC6 et induit un changement conformationnel permettant à C7 de s'insérer à l'intérieur de la membrane
C8	Les 3 voies	Soluble	Composant du MAC, lie C5bC6C7 pour créer un pore dans les membranes, initie la polymérisation du C9
C9	Les 3 voies	Soluble	Composant du MAC, se lie à C5bC6C7C8 pour créer un grand pore dans les membranes
CR1	Les 3 voies	Membranaire	Lie le C3b, C4b, C1q, iC3b. Joue un rôle dans l'élimination des complexes immuns. Augmente la phagocytose et régule le clivage du C3 (bloque la formation et accélère la dissociation des C3 convertase en liant le C4b et le C3b) cofacteur du facteur I pour dégrader le C3b et le C4b à la surface des cellules de l'hôte. Impliquée dans la localisation des complexes immuns dans les centres germinatifs
CR2	Les 3 voies	Membranaire	Augmente l'activation des lymphocytes B, corécepteur des lymphocytes B, retient les complexes immuns contenant du C3d et C3dg, Récepteur du EBV
CR3	Les 3 voies	Membranaire	Lie les molécules d'adhésion, facilite l'extravasation
CR4	Les 3 voies	Membranaire	Lie le iC3b et médie sa phagocytose
CR1g	Les 3 voies	Membranaire	Lie le iC3b et le C3b pour médier la phagocytose. Inhibition de la voie alternative
Bb	Alternative	Soluble	Gros fragment du facteur B généré suite au clivage par le facteur I. Forme la C3 convertase dans la phase fluide avec C3(H ₂ O), forme la C3 convertase liée aux membranes avec C3b, forme la C5 convertase avec 2 molécules de C3b
Facteur D	Alternative	Soluble	Enzyme protéolytique qui clive le facteur B en Ba et Bb lorsqu'il est lié à C3b
MASP-2	Des lectines	Soluble	Sérine protéase, en complexe avec MBL/ficolin clive C4 et C2
MBL	Des lectines	Soluble	Lie les glucides sur la surface microbienne et initie l'activation de la cascade du complément
Ficolins	Des lectines	Soluble	Lie les glucides sur la surface microbienne et initie l'activation de la cascade du complément
Properdin	Alternative	Soluble	Stabilise le complexe C3bBb sur la surface microbienne
C4BP	Classique et des lectines	Soluble	Bloque la formation et accélère la dissociation de la convertase C4b2a. Cofacteur avec le facteur I pour la dégradation du C4b
C1INH	Classique et des lectines	Soluble	Inhibiteur de sérine protéase qui induit la dissociation de C1r2s2 avec C1q et de MASP-2 avec MBL
MCP	Les 3 voies	Membranaire	Cofacteur du facteur I pour la dégradation du C3b et C4b
DAF	Les 3 voies	Membranaire	Accélère la dissociation des convertases C4b2a et C3bBb
Facteur H	Alternative	Soluble	Bloque la formation et accélère la dissociation de la C3 convertase C3bBb. Cofacteur avec le facteur I pour la dégradation du C3b
Facteur I	Les 3 voies	Soluble	Sérine protéase qui clive le C4b et le C3b à l'aide de cofacteurs (facteur H, MCP, C4BP et CR1)
CD59	Les 3 voies	Membranaire	Lie le C5bC6C7C8 sur les cellules du soi et bloque la liaison du C9 pour la formation du MAC
iC3b	Les 3 voies	Soluble	Fragment du C3b généré par le facteur I, lie les récepteurs CR3, CR4 et CR1g, stimule la phagocytose
C3c	Les 3 voies	Soluble	Fragment de iC3b généré par le facteur I. Lie CR1g
C3d	Les 3 voies	Soluble	Fragment de iC3b généré par le facteur I. Lie le CR2 et facilite la reconnaissance des antigènes par les lymphocytes B
C3dg	Les 3 voies	Soluble	Fragment de iC3b généré par le facteur I. Lie le CR2 et facilite la reconnaissance des antigènes par les lymphocytes B
C4c	Classique et lectine	Soluble	Produit de clivage du C4 généré par le facteur I

C4d	Classique et lectine	Soluble	Produit de clivage du C4 généré par le facteur I
Ba	Alternative	Soluble	Petit fragment du facteur B généré suite au clivage par le facteur I, pourrait inhiber la prolifération des lymphocytes B activés, rôle peu défini
C3aR	Les 3 voies	Membranaire	Induit la dégranulation suite à la liaison du C3a, augmente la perméabilité vasculaire
C5aR	Les 3 voies	Membranaire	Induit la dégranulation et la chimiotaxie suite à la liaison du C5a, agit avec l'IL-1 β et/ou le TNF- α pour induire la réponse de phase aigüe, induit la flambé oxydative chez le neutrophile. Augmente la perméabilité vasculaire
C5L2	Les 3 voies	Membranaire	Rôle incertain, diminue probablement l'effet pro-inflammatoire du C5a
Vibronectine	Les 3 voies	Soluble	Lie le C5bC6C7 soluble afin de prévenir son insertion dans les membranes de cellules du soi

5.1 Le mécanisme d'action du système du complément

La reconnaissance des agents pathogènes par le système du complément peut se faire par trois différentes voies, soit la voie classique, alternative et des lectines (voir figure 6). La voie classique est initiée par la liaison de la protéine de reconnaissance C1q à la partie Fc des anticorps (un IgM pentamérique ou au moins 2 IgG) ayant opsonisés une surface. La voie alternative, quant à elle, débute par la liaison directe de la composante du complément C3 lors d'une activation spontanée sur la surface d'un agent microbien. Enfin, la voie des lectines implique la liaison du *mannose binding lectine* (MBL) aux glucides composant les membranes des pathogènes. Suite à l'activation des différentes voies, une cascade de protéolyse engendre les différentes actions du complément précédemment mentionnées. Bien que l'initiation se fasse de différentes façons, l'activation du système du complément, mène invariablement à la formation de la convertase C3 (C4b2a ou C3bBb), qui clive le C3 en C3b et C3a. C3b peut agir d'une part comme opsonine, mais peut aussi former la convertase C5 (C4b2a3b ou C3b₂Bb) qui permet le clivage de C5 en C5a et C5b. C5b est par la suite un élément clé initiateur de la formation du MAC, composé de C5b, C6, C7, C8 et C9, qui permet la lyse des cellules cibles suite à la création d'un pore à la membrane. Les fragments C3a, C4a et C5a, générées suite au clivage de C3, C4 et C5 respectivement, sont des anaphylatoxines. Leur nom provient du fait que lorsqu'elles sont produites en trop grande quantité, elles peuvent induire un choc anaphylactique. Ces peptides sont reconnus pour induire la contraction des muscles lisses, la relâche d'histamine par les mastocytes, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'induction d'inflammation ainsi que le recrutement de cellules phagocytaires suite à la liaison de leur récepteur (el-Lati *et al.*, 1994, Guo *et al.*, 2005, Hugli, 1990). Afin de ne pas avoir d'activation

indésirable, le système du complément comprend plusieurs protéines régulatrices, présentes dans le plasma ou à la surface des cellules hôtes. Ces protéines vont jouer principalement sur la fonction et la formation des convertases ou du MAC. Par exemple, DAF (*Decay-accelerating factor*) ainsi que le facteur H peuvent compétitionner avec le facteur B pour la liaison du C3b, ce qui va inhiber l'assemblage de nouvelles convertases C3 (Lublin *et al.*, 1989, J. Wu *et al.*, 2009). Le facteur I, quant à lui, va cliver le C3b et C4b en forme inactive à l'aide de cofacteurs situés à la surface des cellules hôtes (MPC, CD46, CR1) (Sim *et al.*, 1993). Enfin, l'expression du CD59 sur les cellules du soi empêche la formation du complexe d'attaque membranaire (Meri *et al.*, 1990).

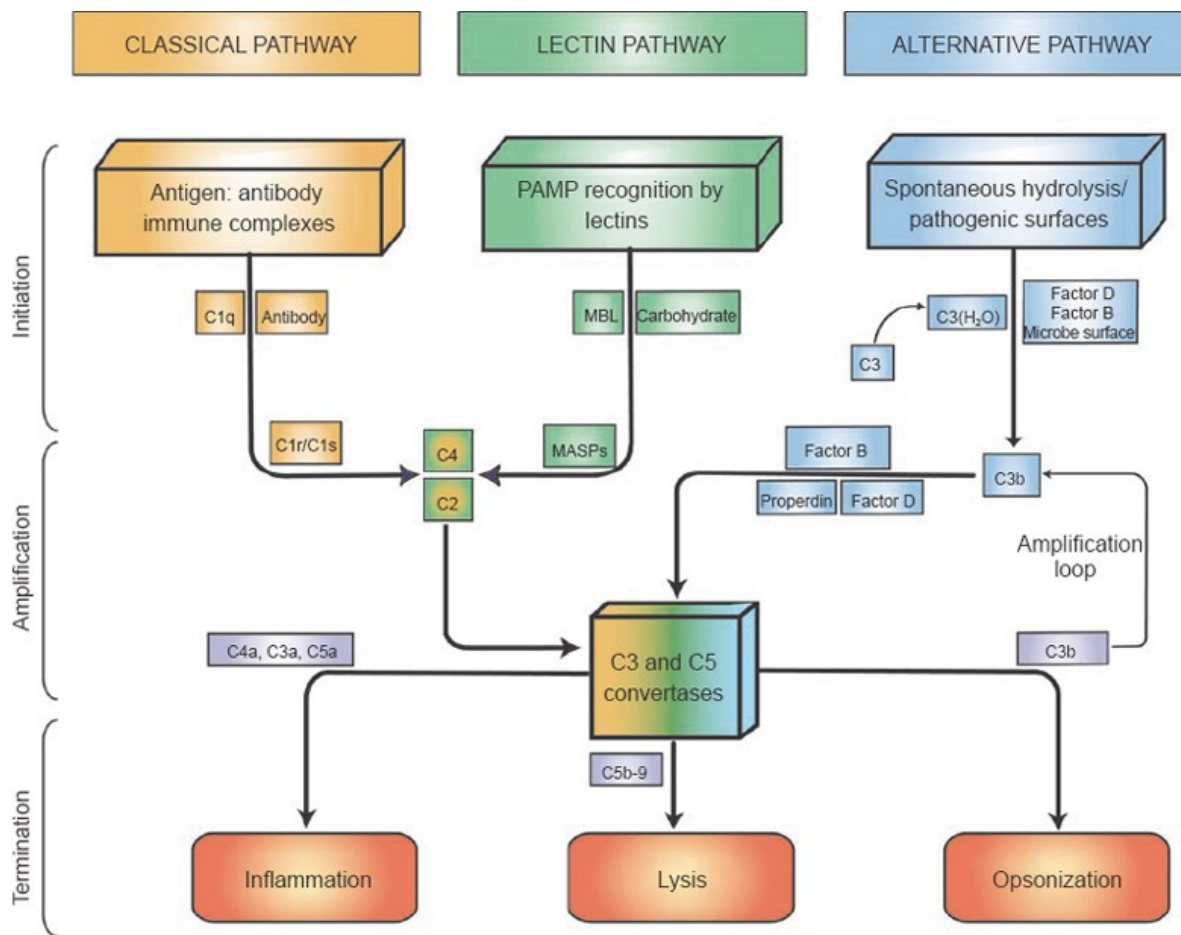


Figure 6. Les voies d'activation du complément
(Dunkelberger and Song 2010)

La compréhension initiale du rôle du système du complément a été élucidée grâce aux observations effectuées chez des patients aux prises avec des problèmes de santé, chez qui on a découvert des déficiences en protéines du complément (Figuroa *et al.*, 1991). Par exemple, de faible niveau de MBL a été associé avec des infections respiratoires répétitives durant

l'enfance (Cedzynski *et al.*, 2004) alors que la difficulté à contrôler plus spécifiquement les bactéries du type *Neisseria* a été observée chez des patients déficients en composant terminaux (C5-C9) de la voies du complément, responsables de causer la lyse de ces bactéries (Lee *et al.*, 1978, Matthews *et al.*, 1980, McBride *et al.*, 1991, Morris *et al.*, 1992, Nicholson *et al.*, 1979, Sanal *et al.*, 1992), établissant par le fait même le rôle de ces protéines dans le contrôle de ce type d'infection. Plusieurs déficiences en protéines du complément ont aussi été reliées au développement de maladies auto-immunes. C'est entre autres le cas des protéines de la voie classique du complément. En effet, puisque ces dernières sont impliquées dans l'élimination des cellules en apoptose et des débris, il semblerait que leur absence engendre une inflammation néfaste pouvant mener aux développements de maladies comme le lupus (Benoit *et al.*, 2012, Navratil *et al.*, 2000, Paidassi *et al.*, 2008, Pickering *et al.*, 2000, Roumenina *et al.*, 2011, Verneret *et al.*, 2014). Par ailleurs, une activation incontrôlée du système du complément, due à une déficience en protéine régulatrice de la voie alternative comme le facteur H, le facteur I ou MCP, peut mener au développement d'un syndrome urémique hémolytique ou de glomérulopathie causé par le dépôt de MAC entraînant des dommages au niveau de l'endothélium vasculaire des glomérules du rein (Joseph *et al.*, 2013, Loirat *et al.*, 2011). Ainsi, l'étude de ces maladies a permis d'éclaircir le rôle et le fonctionnement du système du complément, en plus de mettre en évidence l'importance de l'équilibre de ce système. Cependant, ce n'est qu'avec l'élaboration de différents outils que notre compréhension du mécanisme d'action du système du complément a vraiment avancée.

5.2 Les outils permettant l'étude du complément

Le facteur de venin de cobra (FVC), un composé non toxique du venin de cobra analogue au C3b, a été utilisé abondamment afin de mieux comprendre le rôle du complément. Lors de l'administration du FVC chez la souris, il s'associe avec le facteur B pour former la C3/C5 convertase (FVC,Bb) qui engendre un clivage du C3 et du C5 avec tous les effets qui l'accompagne (Vogel *et al.*, 2010). Contrairement au C3b et à la convertase C3b,Bb, le FVC et FVC,Bb sont insensibles aux effets du facteur I et H; il n'y a donc pas d'inhibition de la formation ou de dissociation de la convertase (Alper *et al.*, 1976, Lachmann *et al.*, 1975). Cela permet une déplétion complète du C3 et du C5 durant 3 à 4 jours. L'injection du FVC engendre donc une perte de fonction des trois voies du complément. Cependant, puisque cette déplétion passe par une activation de la cascade du complément, elle mène aussi à la production d'anaphylatoxines (X. Zhang *et al.*, 2007). Afin de surmonter ce problème et de caractériser plus précisément

l'importance des trois voies du complément, plusieurs souris déficientes en différentes protéines du complément ont été générées. Une autre approche consiste aussi à injecter des anticorps bloquants ou neutralisants ainsi que des agonistes ou des antagonistes. Cependant, il est parfois difficile de bien interpréter les résultats contradictoires qui ont été obtenus et des études affirment que certains antagonistes sont finalement des agonistes (M. C. Mathieu *et al.*, 2005), ce qui fait en sorte qu'il faut revoir la signification de certaines études et élaborer de nouveaux outils (Coulthard *et al.*, 2015).

5.3 L'implication du système du complément dans la réponse immunitaire adaptative

Le rôle du système du complément, au niveau de la réponse immunitaire innée, dans le contrôle initial des agents pathogènes et l'élimination des cellules apoptotiques est bien caractérisé. Par ailleurs, de plus en plus d'études mettent en évidence l'impact considérable du système du complément sur la réponse immunitaire adaptative. Par exemple, l'importance du système du complément pour la réponse humorale a été exposée après avoir observé que des déficiences en protéines de la voie classique du complément (C1q, C2, C3 ou C4) (M. B. Fischer *et al.*, 1996, C. G. Jackson *et al.*, 1979) ou des récepteurs CR1 et CR2 (Ahearn *et al.*, 1996, Carlsson *et al.*, 2009, Croix *et al.*, 1996, Molina *et al.*, 1996) affectaient la production d'anticorps. En fait, le système du complément est primordial pour plusieurs étapes du développement de la réponse humorale. Premièrement, les antigènes opsonisés par des produits de clivage du complément (C3b, C3d, iC3b) peuvent lier le CR1 et le CR2 exprimés par les lymphocytes B et engendrer une potentialisation du signal du récepteur des cellules B (BCR) diminuant la force du signal nécessaire pour mener à une activation efficace des lymphocytes B (Carter *et al.*, 1988, Cherukuri *et al.*, 2001b, Fearon *et al.*, 2000, Kozono *et al.*, 1998). Cela permet aussi d'augmenter la phagocytose, la dégradation et la présentation des antigènes par les lymphocytes B facilitant ainsi le développement des réponses humorales T-dépendantes (Cherukuri *et al.*, 2001a). D'ailleurs, le C3d est considéré comme un adjuvant efficace pour augmenter la réponse immunitaire humorale (Dempsey *et al.*, 1996). L'expression du CR1 et CR2 par les cellules dendritiques folliculaires (fDC) permet quant à elle une rétention efficace des complexes immuns dans les centres germinatifs (Donius *et al.*, 2013, Y. Fang *et al.*, 1998). Ce processus est important pour la sélection des lymphocytes B durant la maturation d'affinité (Aydar *et al.*, 2005) en plus de rendre les antigènes plus immunogéniques (Test *et al.*, 2001).

L'expression par les lymphocytes B des récepteurs pour les anaphylatoxines C3a et C5a permet aussi à ces molécules d'affecter la réponse humorale. D'un côté, la production de C3a affecte négativement la production d'anticorps et de cytokines par les lymphocytes B (W. H. Fischer *et al.*, 1997, E. L. Morgan *et al.*, 1982), alors que celle de C5a permet d'augmenter la réponse humorale (E. L. Morgan *et al.*, 1983). Enfin, le système du complément en plus d'avoir un impact sur la qualité de la réponse primaire, est aussi important pour la maintenance de la réponse mémoire humorale grâce à la rétention des antigènes sous forme de complexes immuns par les fDC (Brockman *et al.*, 2006, Carroll *et al.*, 2012, Y. Fang *et al.*, 1998, Fernandez Gonzalez *et al.*, 2008, Klaus *et al.*, 1977).

Plus récemment, l'importance du système du complément pour le développement de la réponse cellulaire a aussi été soulignée. Lors de l'interaction entre les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T, une production locale d'anaphylatoxines combinée à une augmentation de l'expression de leur récepteur ont été observées (Strainic *et al.*, 2008). Ce phénomène permet de générer un signal critique au développement d'une réponse immunitaire cellulaire fonctionnelle. D'une part, la signalisation par le C5aR et le C3aR sur les cellules présentatrices d'antigènes mène à l'activation de la voie NFκB et subséquemment à l'augmentation de la production des cytokines IL-12 et IL-23 et de l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86, deux éléments clés au développement de la réponse Th1 (Lalli *et al.*, 2007, Moulton *et al.*, 2007, Peng *et al.*, 2009). D'autre part, les anaphylatoxines C5a et C3a ont aussi un effet directement sur les lymphocytes T en engendrant une augmentation de la production du facteur anti-apoptotique Bcl2 et une diminution du facteur pro-apoptotique Fas (Lalli *et al.*, 2008). Tout cela mène à une différenciation, une expansion et une survie augmentée des lymphocytes T (Lalli *et al.*, 2008, Strainic *et al.*, 2008). Plus concrètement, le rôle du complément pour la réponse T a été confirmé dans différents modèles. En effet, lorsqu'on élimine le système du complément, soit en utilisant des souris déficientes, des anticorps bloquants ou en effectuant une déplétion du composant central C3 à l'aide du FVC, la réponse T en est affaiblie (Suresh *et al.*, 2003), ce qui limite le contrôle d'infections virales (Kopf *et al.*, 2002, Suresh *et al.*, 2003) et retarde le rejet de greffe (Gueler *et al.*, 2008). Inversement, l'utilisation de souris DAF déficientes, qui présentent une activation constante de la voie alternative du complément, engendre une augmentation de l'activation des cellules présentatrices d'antigènes ainsi qu'une réponse T plus forte (Heeger *et al.*, 2005, Raedler *et al.*, 2009) menant à un rejet de greffe accéléré (Pavlov *et al.*, 2008, Vieyra *et al.*, 2011) ainsi qu'un meilleur contrôle d'une infection virale (C. Fang *et al.*, 2007).

5.4 Interactions entre les PRR et le système du complément

Bien que plusieurs études aient rapporté des interactions entre les PRR et le système du complément, la complexité de ces interactions a mené à l'obtention de conclusions parfois opposées, ce qui fait en sorte que la relation entre les deux est encore aujourd'hui mal défini. Les principales protéines du complément qui ont été rapportées pour interagir avec les PRR sont les anaphylatoxines C3a et C5a, ainsi que CD46 et C1qR. Ainsi, plusieurs études ont démontré que la signalisation via le C3aR et le C5aR en combinaison avec une stimulation du TLR4, 2/6 ou 9 avait un effet synergique pour augmenter la production de cytokines pro-inflammatoires tout en inhibant la production d'IL-12 et d'IL-23 via l'activation des voies ERK1/2 et PI3K par le C3a et le C5a (C. Fang *et al.*, 2009, Hajishengallis *et al.*, 2011, la Sala *et al.*, 2005, X. Zhang *et al.*, 2007). Cependant, des études similaires ont plutôt rapporté une augmentation de la production d'IL-12 et IL-23 suite à une stimulation simultanée par les anaphylatoxines C3a, C5a et un ligand de TLR4, toujours via une activation de la voie ERK1/2 (Kohl, 2006, Peng *et al.*, 2009, Strainic *et al.*, 2008). Le cofacteur CD46, qui contribue au clivage du C3b et C4b avec le facteur I pour les rendre inactif, a quant à lui été identifié pour influencer la production d'IL-12 ou d'IL-23 suite à la stimulation du TLR4 soit à la hausse (Vaknin-Dembinsky *et al.*, 2008) ou à la baisse (Kohl, 2006, A. Smith *et al.*, 2003). Un impact du récepteur pour le C1q liant la région globulaire (gC1qR) ou collagène (cC1qR) du C1q sur la production de cytokine suite à l'activation du TLR4 a aussi été observé. D'un côté le gC1qR active la voie PI3K et diminue la production d'IL-12 (Waggoner *et al.*, 2005, Waggoner *et al.*, 2007) alors que le cC1qR régule la réponse Th1 via la voie NF κ B en augmentant la production de TNF- α et IL-12 (Csomor *et al.*, 2007). Réciproquement, la stimulation des PRR peut aussi affecter la réponse aux protéines du complément. Par exemple, le prétraitement de cellules mononucléaires périphériques du sang (PBMC) humaines avec différents ligands de TLR potentialise la production d'IL-8 suite à la stimulation avec le C5a (Raby *et al.*, 2011). Des résultats similaires ont été obtenus suite à la stimulation d'une lignée de macrophage murin avec le muramyl dipeptide, un ligand de NOD2 (H. Tang *et al.*, 2013). Dans ces deux situations, il semble que l'effet soit dû à une diminution de l'expression du récepteur alternatif du C5a, le C5L2, qui a un effet inhibiteur sur la réponse au C5a. Enfin, plusieurs ligands de TLR induisent l'activation du système du complément (Mangsbo *et al.*, 2009, X. Zhang *et al.*, 2007) ou encore la production de protéine du complément comme le facteur B, qui est nécessaire à la formation de la C3 convertase de la voie alternative (Kaczorowski *et al.*, 2010).

Malgré les divergences de résultats observées, il est clair que le système du complément et les récepteurs de type Toll ont une influence bidirectionnelle. Ces mécanismes ont probablement évolués afin, d'assurer qu'en condition d'infection (stimulation des TLR) que le système du complément soit activé afin de contrôler adéquatement les agents pathogènes. D'autre part, l'activation du système du complément permet de réguler la réponse aux ligands de TLR dans le but d'avoir une réponse immunitaire suffisante mais régulée. Ainsi, il importe de continuer à mieux comprendre les éléments régissant ces deux voies cruciales du système immunitaire innée afin de pouvoir les contrôler adéquatement en cas de pathologie et de mieux les cibler dans des contextes de traitement ou de vaccination.

6. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

La vaccination est la méthode la plus efficace de lutter contre les maladies infectieuses. Les vaccins ont non seulement permis de diminuer l'incidence de plusieurs de ces maladies telles que la rougeole ou la diphtérie, ils ont aussi contribué à la diminution de la mortalité et de la morbidité associées, en plus de permettre l'éradication de la variole (Ehreth, 2003). Cependant, plusieurs défis persistent. Par exemple, la création de vaccins contre l'hépatite C, la malaria ou le cancer pose certains problèmes puisque les méthodes de vaccination traditionnelles ne sont pas envisageables ou sont inefficaces. Une des façons d'augmenter l'efficacité des vaccins est l'ajout d'un adjuvant. La majorité des vaccins actuellement utilisés sont de type vivant atténué ou inactivé, ce qui fait en sorte qu'ils contiennent un pouvoir adjuvant intrinsèque. Cependant, avec l'utilisation croissante des vaccins sous-unitaires contenant seulement la protéine ou le peptide d'intérêt, les propriétés immunomodulatrices des vaccins sont perdues, rendant l'ajout d'adjuvant nécessaire. Cependant, encore peu d'adjuvants sont autorisés pour l'utilisation chez l'humain et ceux qui le sont ont un mécanisme d'action encore mal défini et engendrent principalement une réponse immunitaire de type humorale, ce qui, dans certains cas, est insuffisant. Ainsi, un effort de recherche majeur est présentement dédié à la découverte de nouveaux adjuvants sécuritaires et efficaces ainsi qu'à l'élucidation de leurs mécanismes d'action.

Dans cette optique, notre équipe de recherche a évalué le potentiel de PapMV comme adjuvant et plateforme vaccinale. Tel que discuté précédemment, nous avons démontré que PapMV, utilisé comme adjuvant, permet d'améliorer la réponse immunitaire humorale de différents vaccins. De plus, il peut être modifié génétiquement afin d'exprimer des épitopes vaccinaux à sa surface afin de générer une réponse anticorps spécifiques. Enfin, ces nanoparticules possèdent plusieurs qualités faisant de lui un outil prometteur pour le développement de nouveaux vaccins sécuritaires et efficaces. Cependant, le mécanisme d'action de PapMV, ainsi que sa capacité en tant qu'adjuvant à améliorer la réponse immunitaire cellulaire, dans un contexte de vaccination prophylactique ou thérapeutique reste à déterminer. Ainsi dans le cadre de mon doctorat, mes objectifs étaient :

1. Déterminer le mécanisme d'action de PapMV ainsi que sa capacité à améliorer l'efficacité d'un vaccin à médiation cellulaire
2. Évaluer le potentiel de PapMV dans un contexte d'immunothérapie du cancer

3. Mesurer l'implication du système du complément dans la reconnaissance et le pouvoir immunogénique de PapMV

Dans le but de déterminer le mécanisme d'action de PapMV nous avons effectué différentes expériences d'immunisation chez la souris. Dans un premier temps, nous avons caractérisé la réponse immunitaire innée et adaptative engendrée par l'injection du PapMV dans des souris sauvages (C57BL/6) en comparaison avec des souris déficientes en différentes molécules impliquées dans la reconnaissance et la réponse aux PAMPS. De plus, nous avons utilisé le modèle d'immunisation avec des BMDC afin d'évaluer la capacité de PapMV à augmenter la quantité et la fonctionnalité des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques générés par cette méthode d'immunisation. Enfin, nous avons infecté les souris immunisées avec *Listeria monocytogenes* dans le but de déterminer si le PapMV permettait d'obtenir une meilleure protection contre une infection.

Pour le deuxième objectif, le modèle de mélanome murin B16 a été utilisé. Ces cellules tumorales ont été injectées soit au niveau sous-cutané afin de générer une tumeur locale visible et mesurable ou par voie intraveineuse, ce qui engendre la formation de métastases pulmonaires qui peuvent être dénombrées. Tout d'abord, nous avons caractérisé l'impact de l'injection du PapMV sur la croissance des tumeurs ainsi que la survie des souris. Par la suite nous avons déterminé l'effet du PapMV sur la réponse immunitaire anti-tumorale. Enfin, le PapMV a été combiné à d'autres traitements d'immunothérapie soit la vaccination à l'aide de BMDC et l'injection d'anticorps bloquant anti-PD-1, de manière à déterminer s'il peut améliorer l'efficacité de ces thérapies.

Dans le troisième objectif, le FVC a été injecté à des souris afin d'éliminer les principales composantes du système du complément. Ainsi, nous avons pu évaluer l'importance de ces protéines dans la reconnaissance et le pouvoir immunogénique du PapMV. Nous avons ensuite comparé le pouvoir adjuvant du PapMV en contexte de vaccination avec les BMDC et de prévention de l'établissement de métastases pulmonaires dans des souris traitées avec le FVC. Enfin, nous avons utilisé des souris déficientes en différentes protéines du complément afin d'élucider le mécanisme d'action du système du complément lors de l'injection du PapMV.

CHAPITRE 2 : RÉSULTATS

1. ARTICLE 2 : NANOPARTICLE ADJUVANT SENSING BY TLR7 ENHANCES CD8⁺ T CELL-MEDIATED PROTECTION FROM *LISTERIA MONOCYTOGENES* INFECTION

Titre en français : L'activation du TLR7 par un adjuvant à base de nanoparticules augmente la réponse CD8⁺ protectrice contre une infection par *Listeria monocytogenes*

Auteurs : Marie-Ève Lebel¹, Jean-François Daudelin², Karine Chartrand¹, Esther Tarrab¹, Ulrich Kalinke³, Pierre Savard⁴, Nathalie Labrecque^{2,5}, Denis Leclerc⁶ and Alain Lamarre¹

Affiliations :

¹Immunovirology Laboratory, Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC H1V 1B7, Canada;

²Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H1T 2M4

³Institute for Experimental Infection Research, TWINCORE, Centre for Experimental and Clinical Infection Research, a joint venture between the Helmholtz-Centre for Infection Research and the Hannover Medical School, Hannover, Germany

⁴Department Neurosciences, Laval University, Quebec city, Quebec, Canada, G1V 4G2

⁵Department of Medicine and Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

⁶Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Infectious Disease Research Centre, Laval University, Quebec City, Quebec G1V 4G2, Canada;

Contributions des différents auteurs :

MÈL : Conception du projet, exécution des expériences, rédaction de l'article

JFD : Exécution des expériences

KC : Exécution des expériences

ET : Conseils techniques

UK : Dons de souris déficientes en récepteur de l'IFN-I

PS : Développement du procédé de production du PapMV

NL : Conseils théoriques et techniques

DL : Correction de l'article

AL : Conception du projet, rédaction et correction de l'article

Titre du journal : The Journal of Immunology, publié le 27 décembre 2013

Résumé en français : Le développement de nouveaux adjuvants et de nouvelles stratégies de vaccination est d'une importance primordiale pour lutter contre de nombreuses maladies infectieuses ainsi que le cancer. En effet, très peu d'adjuvants sont présentement autorisés pour l'utilisation chez l'humain et ceux-ci engendrent principalement une réponse de type humorale. Cependant, les anticorps spécifiques ne sont pas suffisants pour conférer une protection contre les infections persistantes ou le cancer. Par conséquent, le développement d'adjuvants et d'immunomodulateurs en mesure d'engendrer le développement de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques est crucial. Nous avons récemment démontré que les pseudoparticules du virus de la mosaïque de la papaye (PapMV), formées de protéines de capsid du virus et d'un d'ARN simple brin non codant, sont fortement immunogéniques chez la souris. De plus, PapMV peut être utilisé soit comme plateforme vaccinale, grâce à la fusion de divers épitopes à sa surface, ou comme adjuvant en l'ajoutant à un vaccin. Cependant, le mécanisme d'action de PapMV, ainsi que sa capacité à améliorer les vaccins à médiation cellulaire ne sont pas connus. Nous démontrons dans cette étude que PapMV est un nouvel agoniste de TLR7 avec de fortes propriétés immunomodulatrices chez la souris. De façon plus importante, l'injection de PapMV aux souris permet de significativement améliorer la réponse T CD8⁺ effectrice et mémoire générée suite à la vaccination avec des cellules dendritiques, ce qui résulte en une augmentation de la protection contre une infection par *Listeria monocytogenes*.

1.1 Abstract

Developing new adjuvants and vaccination strategies is of paramount importance to successfully fight against many life-threatening infectious diseases and cancer. Very few adjuvants are currently authorized for human use and these mainly stimulate a humoral response. However, specific antibodies are not sufficient to confer protection against persisting infections or cancer. Therefore, development of adjuvants and immunomodulators able to enhance cell-mediated immune responses represents a major medical need. We recently showed that Papaya Mosaic Virus nanoparticles (PapMV), self-assembled from the coat protein (CP) of a plant virus and a non-coding ssRNA molecule, are highly immunogenic in mice. PapMV can be used either as a vaccine delivery platform, through fusion of various epitopes to the CP or as adjuvant to enhance humoral immune responses against co-administered antigens or vaccines. However, the mechanisms that confer these immunomodulatory properties to PapMV and its ability to enhance T-cell vaccines remain unknown. Using immunization studies in mice, we demonstrate here that PapMV represents a novel TLR7 agonist with strong immunostimulatory properties.

More importantly, pre-treatment with PapMV significantly improves effector and memory CD8⁺ T cell responses generated through dendritic cell vaccination increasing protection against a *Listeria monocytogenes* challenge.

1.2 Introduction

Vaccination is considered to be the most effective method of protection against infectious diseases. Indeed, vaccines have not only helped to reduce the incidence of several infectious diseases such as measles or diphtheria, they also contributed to the decrease in mortality and morbidity related to infectious diseases and in the eradication of smallpox (Fenner, 1977, Plotkin, 2005). However, the generation of safe vaccines with the capacity to generate protective cellular immunity, which is essential to protect against most chronic infections (Callan, 2003, Doherty *et al.*, 2001) and cancers (Baumgaertner *et al.*, 2012, Udono *et al.*, 1994), is still a challenge. Cell-mediated immune responses are often induced following the detection of pathogen associated molecular patterns (PAMPs) by APCs leading to their activation, which increases their stimulatory capabilities towards pathogen-specific T lymphocytes. This has led to the development of numerous vaccination trials that include various PAMPs in the formulation of candidate vaccines (Dendouga *et al.*, 2012, R. Ma *et al.*, 2007, W. W. Zhang *et al.*, 2008) instead of traditional adjuvants such as alum, which mostly induces a humoral response (Reed *et al.*, 2009). As such, TLR7/8 ligands that induce the production of IL-12 and interferon-alpha (IFN- α), which are important for the generation of an appropriate cellular immune response, are actively being evaluated for this purpose (Kastenmuller *et al.*, 2011). Unfortunately, the natural ligand of TLR7/8, ssRNA, when used alone, is rapidly degraded *in vivo* (Diebold *et al.*, 2004, Lund *et al.*, 2004). To solve this problem and allow optimal presentation of vaccine antigens, researchers have developed various delivery systems to increase the bioavailability of such molecules. These tools include molecules that induce the formation of aggregates such as alum, liposomes, oil in water emulsions and nanoparticles (Bachmann *et al.*, 2010). These formulations of vaccine antigens increase their phagocytosis by APCs, the first step required to generate a potent immune response. Another way to efficiently trigger a T cell response is to mimic a viral infection through the use of virus-like particles (VLPs). VLPs do not contain infectious genetic material providing a safer alternative to attenuated or inactivated viruses (Noad *et al.*, 2003). In addition, the shape of such particles and the display of repeated arrays of epitopes on their surface renders them easily recognizable by APCs which are then activated by intrinsic PAMPs present on the VLPs (Jennings *et al.*, 2008). However, many VLPs in

development still require the coadministration of adjuvants to be fully effective (Storni *et al.*, 2002, Storni *et al.*, 2004). VLPs can easily be engineered to express foreign epitopes using genetic fusion or chemical conjugation (Denis *et al.*, 2008, Kazaks *et al.*, 2008, Tissot *et al.*, 2010). At present, there are two vaccines used in humans derived from VLPs: The hepatitis B virus vaccine and the human papillomavirus vaccine.

We have previously shown that papaya mosaic virus-like nanoparticles (PapMV) are efficiently recognized and taken-up by immune cells leading to their activation (Lacasse *et al.*, 2008). In addition, we have shown that various foreign antigens can be fused to the surface of the PapMV without affecting its ability to self-assemble. Vaccination with such nanoparticles generates a specific cellular and humoral immune response against displayed antigens and provides protection against various viral infection models (Acosta-Ramirez *et al.*, 2008, Babin *et al.*, 2013, Denis *et al.*, 2008, Lacasse *et al.*, 2008, Rioux *et al.*, 2012a). Moreover, we have demonstrated that the fused antigens are efficiently cross-presented on MHC-I of human APCs and cause the expansion of human antigen-specific T cells (Leclerc *et al.*, 2007). Finally, we recently showed that PapMV used as an immunomodulator leads to the development of protective immune responses against influenza or *Streptococcus pneumoniae* challenges (C. Mathieu *et al.*, 2013). Thus, PapMV represents a promising candidate adjuvant for the development of novel vaccines or treatments. However, the mechanisms by which PapMV activates the immune system are unknown.

We demonstrate here that PapMV induces immune activation through TLR7 ligation and type I interferon production. In addition, PapMV enhances effector and memory CD8⁺ T cell responses induced through bone marrow-derived dendritic cell (BMDC) vaccination increasing protection against a *Listeria monocytogenes* challenge. These results suggest that PapMV could be useful for the development of T-cell vaccines against infectious diseases.

1.3 Materials and Methods

Ethics statement. This study was performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines. All animal experiments were reviewed and approved by the INRS-IAF institutional animal care committee.

Mice. Female 6- to 10-week-old C57BL/6 mice were purchased from Charles River. *Tlr7* KO and *Myd88* KO mice were purchased from The Jackson Laboratory. Type I Interferon Receptor knockout mice (*Ifnar* KO) on a C57BL/6 genetic background were kindly provided by Ulrich

Kalinke (Institute for Experimental Infection Research, Germany) and *Irf5/7* KO mice by Paula Pitha-Rowe (Johns Hopkins University, USA).

PapMV nanoparticles. PapMV nanoparticles used in this study were kindly provided by Folia Biotech and were produced as described in our previous study (C. Mathieu *et al.*, 2013). LPS contamination was always below 50 endotoxin units (EU)/mg of protein and considered as negligible.

Generation of BMDC. BMDC were differentiated as described before (Lacombe *et al.*, 2005). On day 6, LPS (Sigma-Aldrich) (1 $\mu\text{g/ml}$) was added to cultures to induce maturation and the OVA_{257–264} peptide (SIINFEKL) (2 $\mu\text{g/ml}$) (Midwest Bio-Tech) was added (BMDC-OVA) or not (unloaded BMDC) overnight. BMDCs were harvested on day 7.

Immunization. PapMV (Folia Biotech) injections were done i.v. or s.c. with 100 μg . For BMDC-OVA immunization experiments, 100 μg of PapMV or 100 μl of PBS were injected i.v. or s.c. 6 h before i.v. or s.c. immunization with 1.25×10^6 mature BMDC-OVA or unloaded BMDC. OVA-specific CD8⁺ T cell responses were analyzed at days 7 and 45 post-immunization in the spleen or blood. To follow BMDC phenotype following immunization, BMDC were labeled with 5 μM CFSE (Life Technologies) for 10 min at 37°C. WT mice were injected i.v. with 100 μg PapMV or PBS and 6 h later with 10×10^6 BMDC-CFSE. The expression of CD86 and CD70 were then analyzed on the CD11c⁺CFSE⁺ population, 6 h after BMDC immunization.

LM-OVA infection. Mice were infected with $2-5 \times 10^3$ *Listeria monocytogenes* expressing OVA (LM-OVA) i.v. at least 45 days post BMDC immunization. Five days post-infection (p.i.) spleen and liver were harvested, homogenized in distilled water plus 0.5% NP-40 (Sigma) and fold serial dilutions were plated onto brain heart infusion (BHI, BD Biosciences) agar plates containing 200 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin (Bio Basic). Plates were incubated at 37°C for 24 h and colonies were enumerated.

Plasmacytoid dendritic cell depletion. The hybridoma cell line producing monoclonal antibody 927, specific for the mouse bone marrow stromal antigen 2 (BST2), used for the depletion, was kindly provided by Dr Marco Colonna (Washington University school of Medicine, USA). Depletion was done as described previously (Rajagopal *et al.*, 2010). Briefly, mice were injected (i.p.) with 500 μg of purified antibody 927 or an isotype control 24 and 48 hours before PapMV immunization. Depletion leads to a reduction of at least 60% of pDC numbers in the spleen as measured by flow cytometry.

Flow cytometry analysis and antibodies. Flow cytometry analysis of mouse surface antigens was performed with the following antibodies: anti-CD69 (H1.2F3), -CD86 (GL1), -CD11c (N418), -CD8a (53-6.7), -CD45R/B220 (RA3-6B2), -CD19 (6D5), -CD317 (PDCA-1) (927), and -CD44 (IM7) (Biolegend) and H-2Kb (AF6-88.5.5.3) (eBioscience). Staining was performed for 20 min at 4°C. H-2Kb-OVA monomers were purchased from CANVAC tetramer core facility and tetramers were generated using extravidin-PE (Sigma). PE-coupled Kb-OVA tetramer staining was done at 37°C for 15 min. For intracellular cytokine staining, splenocytes were cultured with OVA (2 µg/ml) in the presence of brefeldin A (10 µg/ml) for 5 h at 37°C. Following staining for surface antigens as described above, cells were stained for intracellular cytokines using fixation/permeabilization buffer (Biolegend) according to the manufacturer's instructions. Antibodies used for intracellular cytokine detection were anti-IFN- γ (XMG1.2), -TNF- α (MP6-XT22), -IL-2 (JES6-5H4) (Biolegend) and -granzyme B (NGZB) (eBioscience). Flow cytometry analyses were performed on a BDLSR II or BDLSR fortessa flow cytometer (BD) and data analyzed using the FlowJo software (Tree Star).

ELISA. PapMV-specific antibody titers were determined as described previously (Denis *et al.*, 2007). Results are expressed as an antibody endpoint titer, determined when the OD value is 3-fold greater than the background value obtained with a 1:50 dilution of serum from PBS-injected mice. IFN- α and IL-6 levels in sera and spleen homogenates from immunized mice were determined following the manufacturer's instructions (PBL InterferonSource and Biolegend).

Statistical analysis.

Data were analyzed for statistical significance using Student t test. Statistical significance was determined as $p < 0.05$.

1.4 Results

PapMV induces the activation of a broad range of immune cells through TLR7. To evaluate the extent of the immunomodulatory properties of PapMV, we first measured the activation of various immune cells following i.v. immunization of C57BL/6 wild type (WT) mice. We analyzed the expression of co-stimulatory molecule CD86, early activation marker CD69 and MHC molecule H-2Kb by flow cytometry in the spleen, peripheral lymph nodes and blood. We observed that every subtype of immune cells analyzed expressed higher levels of CD86, CD69 and H-2Kb 24 h following administration of PapMV (Fig. 1A and S1). For example, a 5-fold

increase in the expression level of CD69 on splenic T cells was measured in the PapMV-treated group in comparison with PBS-treated controls. To determine which component of the PapMV was responsible for its immunomodulatory properties, mice received either the coat protein (CP) subunit alone (containing monomers, dimers and trimers of the CP) or the complete nanoparticle. In contrast to intact PapMV nanoparticles, immunization with the CP alone did not lead to an increased expression of CD86, CD69 or H-2Kb on splenic DCs, B cells or CD8⁺ T cells when compared to negative controls (Fig. 1B and S1B). This suggests that the ssRNA molecule contained within the VLP could be responsible for its immunomodulatory properties. To confirm this hypothesis, we immunized mice deficient in the ssRNA sensor TLR7 or molecules involved in its signaling pathway and measured immune cell activation. In contrast to WT mice, the expression levels of CD86, CD69 or H-2Kb on splenic DCs, B cells or CD8⁺ T cells in *Tlr7*, *Myd88* or *Irf5/7* KO mice remained unchanged upon treatment with PapMV (Fig. 1B and S1B). Since activation through TLR7 signaling can lead to type I interferon production, we tested whether PapMV induced the production of IFN- α in immunized mice. Indeed, immunization with PapMV lead to the production of IFN- α in the serum and spleen of WT mice with a peak at 6 h post-immunization whereas it was completely undetectable in *Tlr7* or *Myd88* KO mice (Fig 1C and S2A). We next sought to determine the contribution of plasmacytoid dendritic cells (pDCs), which strongly express TLR7 and secrete high amounts of IFN- α , to this response. We depleted pDCs by injection of a neutralizing antibody directed against BST2, which has been shown in steady-state conditions to be mostly expressed on pDCs (Blasius *et al.*, 2006). *In vivo* depletion of BST2⁺ cells reduced IFN- α production in serum below the detection limit (Fig. 1C) and significantly decreased the expression levels of activation markers on immune cells following PapMV immunization (Fig. 1B and S1B). Since depletion of BST2⁺ cells caused such a dramatic decrease in the activation of immune cells with no detectable IFN- α production, we next assessed the importance of this cytokine in the immunomodulatory effect of PapMV. While IFN- α production remained high following PapMV immunization in *lfnar*-deficient mice (Fig. 1C), expression levels of CD86, CD69 and H-2Kb in splenic DCs, B lymphocytes and CD8⁺ T cells were not increased demonstrating a crucial role played by type-I interferon signaling in PapMV-dependent immune activation (Fig. 1B and S1B). Finally, we observed that immunization with PapMV leads to IL-6 production in serum and spleen of WT mice but not in *lfnar* KO and *Tlr7* KO mice (Fig. 1D and S2B). Taken together, these results demonstrate that injection of PapMV in mice induces the activation of a broad range of immune cells through IFN- α production by pDCs in a TLR7-dependent manner.

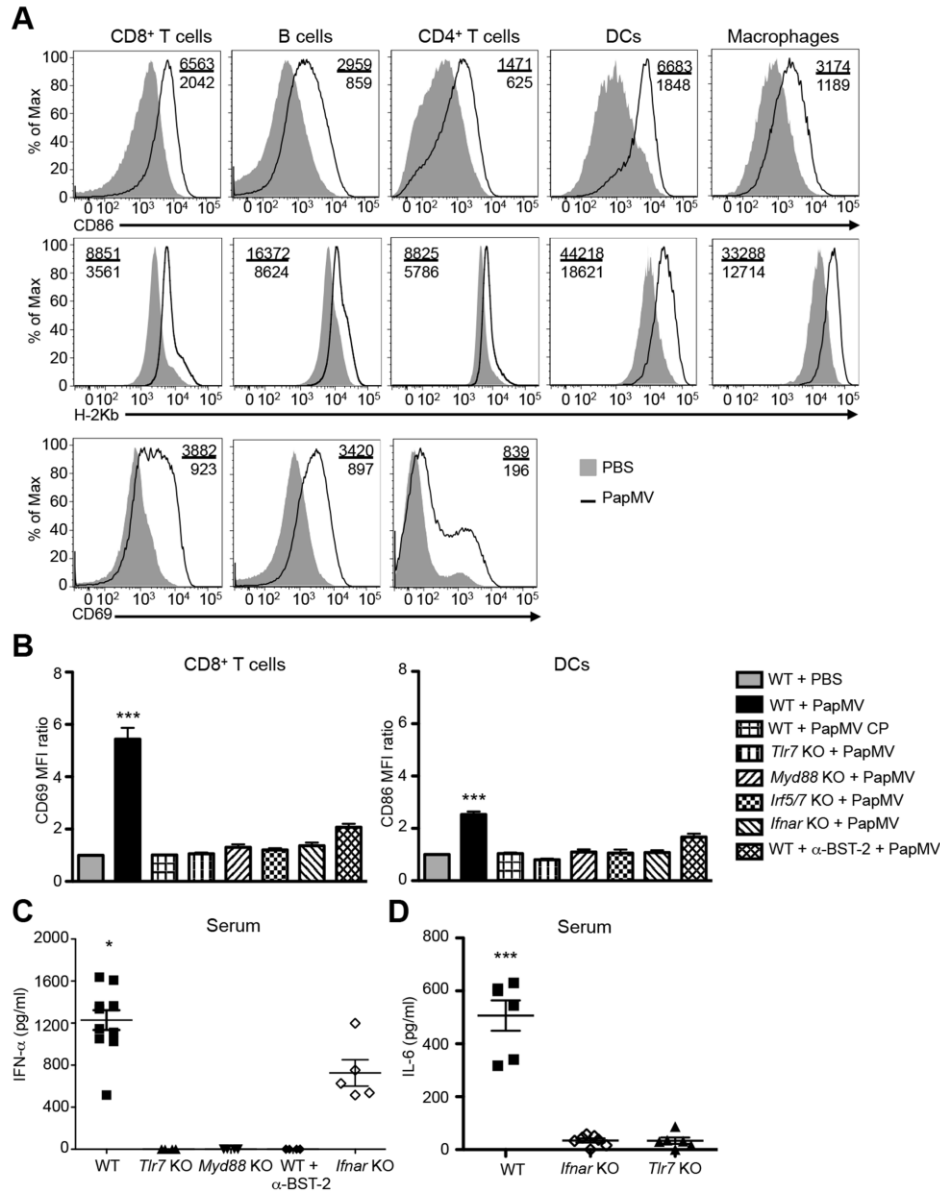


Figure 1. TLR7, MYD88, IRF5/7 and IFNAR are essential for the activation of murine splenocytes by PapMV. (A) Representative overlay histograms showing CD86, CD69 and H-2Kb expression on CD8⁺ T cells, B cells (CD19⁺), CD4⁺ T cells, macrophages (F4/80⁺) and DCs (CD11c⁺) of WT mice 24 h after i.v. immunization with PapMV (bold lines) or PBS (filled histograms). (B) Compilation of CD69 and CD86 expression on CD8⁺ T cells and DCs 24 h post-immunization. Results are presented as a ratio of the Mean Fluorescence Intensity (MFI) of the analyzed sample on the MFI of the PBS sample. Results are shown as the mean ± SEM. (C) ELISA quantification of serum IFN-α or IL-6 (D) 6 h post-immunization with PapMV. (n = 3; 2-5 mice per group). *p < 0.05, ***p < 0.001.

Humoral immune response generated following administration of PapMV depends on TLR7 and MYD88. To determine whether ligation of TLR7 and strong IFN-α production induced upon injection of PapMV affects the generation of the adaptive immune response we first analyzed the development of PapMV-specific antibodies. We observed that *Tlr7* and *Myd88* KO mice produced significantly reduced amounts of PapMV-specific IgG and IgM in serum

compared with WT mice (Fig. 2). In contrast to early immune activation, production of PapMV-specific antibodies was not greatly affected by the absence of IFNAR since production of PapMV-specific IgG (Fig. 2A) was only slightly delayed in *Ifnar* KO mice while IgM levels were not affected at day 7 post-immunization (Fig. 2B). In addition, we observed that immunization with PapMV induced the production of high titers of IgG2c and IgG3 isotypes and low titers of IgG1 isotype (Fig. 2C). These results demonstrate that activation through TLR7 and MYD88 is important to induce the development of PapMV-specific antibody responses while absence of type I interferon signaling only slightly delays IgG production.

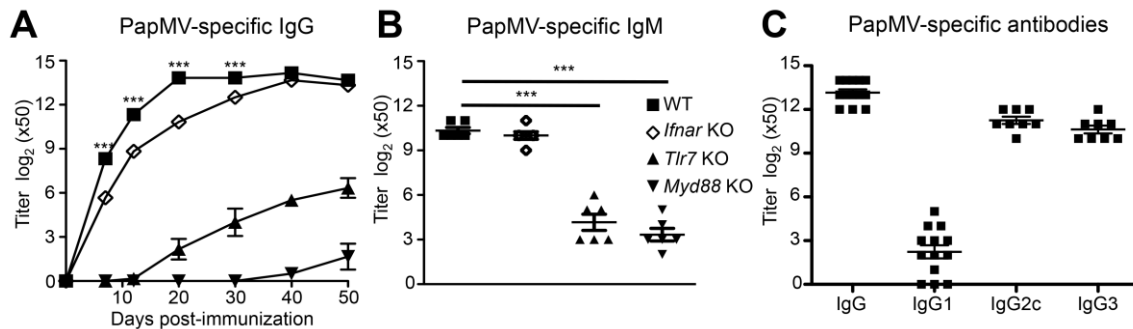


Figure 2. TLR7 and MYD88 are important for the humoral response generated following PapMV nanoparticle immunization.

(A) Kinetics of anti-PapMV IgG production in serum of WT, *Ifnar* KO, *Tlr7* KO and *Myd88* KO mice following immunization with PapMV measured by ELISA. (B) Anti-PapMV IgM production at day 7 post-immunization in serum of WT and KO mice. (C) IgG isotypes (IgG1, IgG2c and IgG3) titer in the serum of WT mice 20 days post-immunization. (n = 3; 2-5 mice per group). ****p* < 0.001.

Pretreatment of mice with PapMV prior to BMDC vaccination increases CD8⁺ T cell responses. Several studies have shown that TLR7 ligands and IFN-I can act as adjuvants for the induction of cellular immune responses (Kastenmuller *et al.*, 2011, W. W. Zhang *et al.*, 2008). Moreover, BMDC immunization is a promising type of vaccination to induce CD8⁺ T cell responses against loaded antigens (Paczesny *et al.*, 2004). We therefore investigated the adjuvant potential of PapMV for the induction of CD8⁺ T cell responses generated following vaccination with BMDC-OVA. BMDC-OVA were injected at the peak of IFN- α production following PapMV administration (6 h) and the generation of an effector CD8⁺ T cell response was analyzed. At day 7 post-immunization (peak of the response) PapMV-treated mice immunized with BMDC-OVA showed significantly higher proportions (Fig. 3A) and numbers (Fig. 3B) of OVA-specific CD8⁺ T cells in comparison with mice receiving only BMDC-OVA. Moreover, PapMV pre-treatment increased the functionality of OVA-specific CD8⁺ T cells since they produced more IFN- γ , TNF- α and IL-2, following *in vitro* restimulation (Fig. 3A and 3C). Mice deficient in TLR7 treated with PapMV did not show any increase in OVA-specific CD8⁺ T cell

numbers while *Ifnar* KO mice showed only a slight increase (Fig. 3D). Moreover, pretreatment of mice with PapMV increases the expression of co-stimulation markers such as CD86 and CD70 (Fig. 3E) and MHC molecule H-2Kb (not shown) on BMDC. Finally, administration of PapMV significantly increases the proportion of OVA-specific memory CD8⁺ T cells at day 45 post-immunization (Fig. 3F). In addition, this pretreatment slightly increased the proportion of cells that produce IFN- γ , TNF- α and IL-2, although this did not reach statistical significance (Fig 3G). Similar results were obtained when PapMV was injected by the subcutaneous (s.c.) route 6 h before s.c. BMDC immunization (Fig. S3).

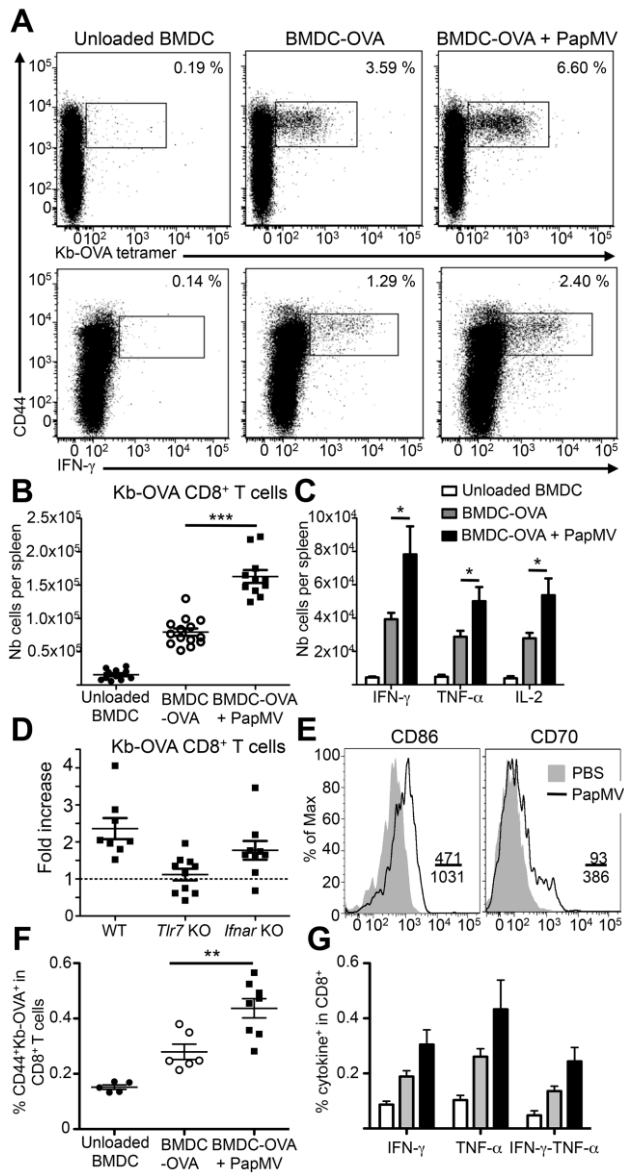


Figure 3. PapMV administration increases the number of OVA-specific effector and memory CD8⁺ T cells generated by BMDC-OVA immunization.

(A) Representative results of the percentage of Kb-OVA CD8⁺ T cells (upper panel) or that produce IFN- γ following restimulation with OVA (lower panel). (B) Compilation of the numbers of OVA-specific CD8⁺ T cells in the spleen or (C) CD8⁺ T cells producing IFN- γ , TNF- α or IL-2 after OVA restimulation. (D) Measurement of the increase in the numbers of OVA-specific CD8⁺ T cells in the spleen detected following pretreatment with PapMV in WT, *Tlr7* KO and *Ifnar* KO mice. The fold increase was calculated by dividing the number of OVA-specific CD8⁺ T cells in the BMDC-OVA + PapMV group by that of the BMDC-OVA group. (E) Representative overlay histogram of CD86 and CD70 expression on BMDCs (CD11c⁺CFSE⁺) 6 h post-immunization in the spleen of WT mice pretreated with PBS (filled histogram) or PapMV (bold line) (F) Proportions of Kb-OVA CD8⁺ T cells and (G) cytokine producing CD8⁺ T cells detected following splenocyte restimulation 45 days post-immunization. (n = 3; 3 mice per group) *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

PapMV administration increases protection against LM-OVA. We next investigated whether administration of PapMV prior to BMDC-OVA immunization could provide greater protection against a bacterial challenge at the memory stage. To address this question, we infected mice at day 45 post-immunization with LM-OVA. As shown in figure 4A, mice immunized with BMDC-OVA showed a greater proportion of OVA-specific CD8⁺ T cells in the spleen compared to the unloaded BMDC group at day 5 post-infection indicating that OVA-specific memory CD8⁺ T cells expanded following infection with LM-OVA. More interestingly, PapMV treatment increases the secondary CD8⁺ T cell response when compared to BMDC-OVA treatment alone group since there are a greater proportion of OVA-specific secondary effector CD8⁺ T cells (Fig. 4A) and more CD8⁺ T cells producing TNF- α or IFN- γ in the PapMV-treated group (Fig. 4B). In addition, more polyfunctional CD8⁺ T cells producing both, IFN- γ and TNF- α or IFN- γ and granzyme B were induced in the PapMV-treated group (Fig. 4B). This led to a decreased number of LM-OVA in the spleen and liver of the PapMV-treated group compared with the group vaccinated with BMDC-OVA alone (Fig. 4C). In summary, administration of PapMV 6 h before BMDC-OVA immunization results in an increased CD8⁺ T cell memory response and better protection against a bacterial challenge.

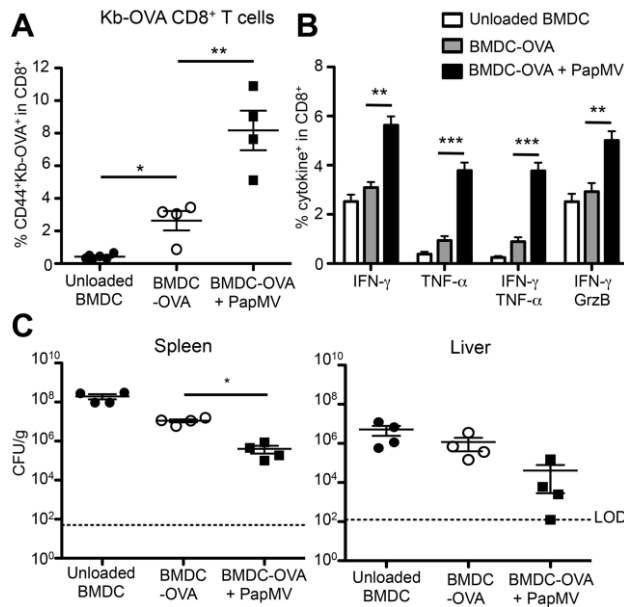


Figure 4. PapMV increases the quality of the immune response generated by BMDC-OVA vaccination and protection against LM-OVA.

(A) Compilation of the percentage of CD44⁺Kb-OVA⁺ CD8⁺ T cells and (B) CD8⁺ T cells that produce cytokines following OVA restimulation. (C) Numbers of LM-OVA CFU per gram (g) of spleen and liver enumerated 5 days post-infection. LOD : Limit of detection. (n = 3; 4 mice per group, a representative experiment is shown) **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

1.5 Discussion

The efficiency of PapMV nanoparticles when used as adjuvant or as a vaccine platform has been largely demonstrated (Babin *et al.*, 2013, Denis *et al.*, 2008, Denis *et al.*, 2007, Lacasse *et al.*, 2008, Rioux *et al.*, 2012a, Savard *et al.*, 2011, Savard *et al.*, 2012). In this study we have elucidated the mechanism by which PapMV induces immune activation and demonstrated its potential as an adjuvant for T-cell vaccination. In previous studies, we showed that following i.v. immunization, splenic DCs take up PapMV *in vivo* and acquire a mature phenotype (Lacasse *et al.*, 2008). In addition, we recently showed that subcutaneous (Savard *et al.*, 2011) and intranasal (C. Mathieu *et al.*, 2013) administration of PapMV leads to the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines. In the present paper, we explored more deeply the immunogenic properties of PapMV upon i.v. immunization. Twenty-four hours after injection of PapMV in mice, we observed that CD8⁺ and CD4⁺ T cells, B lymphocytes, macrophages, monocytes and dendritic cells isolated from the spleen, the blood and the peripheral lymph nodes showed increased expression of activation markers demonstrating the induction of a generalized state of activation of the immune system. This was observed only with the complete nanoparticle and not with the CP. PapMV nanoparticles, are produced *in vitro* from monomers of the capsid protein and a synthetic ssRNA by self-assembly into a filamentous rod-shape nanoparticle. Thus, the composition of the complete nanoparticle and of the CP differs only by the presence of the nucleic acid. This strongly suggested that the ssRNA was responsible for the immunogenicity of the PapMV. This hypothesis was further supported by the fact that PapMV failed to induce the activation of immune cells in mice deficient in TLR7, MYD88 or IRF5/7. Furthermore, IFN- α , a cytokine produced upon TLR7 activation, was rapidly detected in serum and spleen of immunized mice. We next sought to determine whether the generalized immune activation observed following PapMV administration was resulting from this strong IFN- α production. Indeed, absence of the type I interferon receptor completely abolished the immunomodulatory effect of PapMV nanoparticles on immune cells *in vivo*. Moreover, similar results were obtained following depletion of BST2 positive cells, which in naïve mice, mainly consists of pDCs, the main source of IFN- α . We thus suggest that following immunization with PapMV, pDCs and most certainly other APCs as we have shown previously (Denis *et al.*, 2007, Hanafi *et al.*, 2010, Lacasse *et al.*, 2008), take-up the particles and degrade them in the endosome allowing recognition of the ssRNA by TLR7, which leads to a massive production of IFN- α in a MYD88 and IRF5/7-dependent fashion. Subsequently, IFN- α is detected by various

immune cells through IFNAR leading to their activation as observed by an increased expression of activation markers such as CD69, co-stimulatory molecules like CD86 and MHC proteins, and the production of other immune mediators such as the proinflammatory cytokine IL-6.

Having uncovered a major role played by TLR7 in the activation of the innate immune response following i.v. immunization with PapMV, we next analyzed its impact on the humoral immune response. We observed that in the absence of TLR7 and even more in the absence of MYD88, production of PapMV-specific IgG and IgM was greatly reduced. Since absence MYD88 had a greater impact on PapMV-specific IgG production than TLR7 deficiency, it is possible that PapMV activates another MYD88-dependent receptor such as TLR8. In fact, TLR7 and TLR8 are known to sense similar ligands such as ssRNA and small synthetic molecules like imidazoquinolines and nucleoside analogs. In addition, many ligands (CL097, CL075, R848, Poly(dT)) are known to activated both. Therefore we cannot exclude the possible implication of TLR8 in IgG production following PapMV immunization. However, the involvement of TLR8 in the activation of immune cells and IFN- α production seems negligible since absence of TLR7 completely abrogates the effect of PapMV on these processes. In addition, absence of type I interferon receptor only transiently decreased the amount of IgG in the serum of immunized mice. This result suggests that detection of PapMV by TLR7 on B lymphocytes is required for specific antibody production, while B lymphocyte activation by IFN- α is not necessary. Consistently with this hypothesis, it was demonstrated that, in an immunization context involving a PRR ligand, direct PRR stimulation of B cells was required to obtained a robust antibody response (Kasturi *et al.*, 2011, Pasare *et al.*, 2005) especially when immunization was performed with VLPs (Hou *et al.*, 2011). Moreover, Le Bon *et al.* showed that type I interferon enhances humoral immunity and promotes isotype switching by stimulating dendritic cells (Le Bon *et al.*, 2001). We showed that IgG isotypes produced following PapMV administration were mainly composed of IgG2c and IgG3 with low IgG1 titers arguing for the skewing of the CD4⁺ T cell response towards a Th1 phenotype. In addition, IgG3 production is indicative of a T-independent antibody response in the presence of IFN- γ (Snapper *et al.*, 1992). This is likely the result of the direct cross-linking of specific B cell receptors by repeated antigenic patterns found on the surface of PapMV nanoparticles, which could induce antibody production without help from CD4⁺ T cells. Although some studies have shown that antibodies directed towards a vaccine platform can be detrimental to the effectiveness of a recall injection (C. Cheng *et al.*, 2010), the presence of high levels of antibodies against PapMV does not affect the efficacy of a booster vaccination (Denis *et al.*, 2008, C. Mathieu *et al.*, 2013, Savard *et al.*, 2011).

The cellular immune response is critical for the control of viral infections, intracellular microbial infections and cancer (Celluzzi *et al.*, 1996, Condotta *et al.*, 2012, Doherty *et al.*, 2001, Schmidt *et al.*, 2010, Uono *et al.*, 1994). To determine the capacity of PapMV to enhance T cell-mediated immune responses we used PapMV as adjuvant in a BMDC-OVA vaccination regimen. We observed an increased proportion of OVA-specific effector CD8⁺ T cells producing cytokines such as TNF- α , IFN- γ and IL-2, when PapMV was administered before BMDC-OVA vaccination. It is noteworthy that this increased number of OVA-specific effector CD8⁺ T cells was not observed in *Tlr7* KO mice highlighting once again the importance of this receptor in the immunogenic effect of PapMV. Interestingly, absence of IFNAR did not abrogate totally the effect of PapMV on the number of OVA-specific CD8⁺ T cells. In past years, several studies have shown that direct stimulation of T cells by IFN-I was required for optimal CD8⁺ T cell responses (Le Bon *et al.*, 2006, Wiesel *et al.*, 2012). In our case, it seems that IFN-I produced following PapMV immunization acts not only on CD8⁺ T cell but also directly on injected BMDC since IFN-I produced in *Ifnar* KO mice can only act on these cells as they are the only one expressing the IFNAR. Additionally, it was shown that IFN- α facilitates terminal differentiation of DCs *in vitro* (Luft *et al.*, 1998). Accordingly, we observed that pretreatment of mice with PapMV increases the expression of co-stimulatory molecules on injected BMDC, which could explain the adjuvant effect observed with PapMV. CD4 help is very important for the functionality of the memory CTL response induced following BMDC immunization (Livingstone *et al.*, 1999). Since we have shown that PapMV immunization induces CD4⁺ T cell activation, it is possible that CD4 help plays a role in PapMV's enhancement of CTL responses. In addition, it has recently been shown that the CD4 help signal is transmitted from antigen presenting cells to CD8⁺ T cells via CD27–CD70 interactions (Feau *et al.*, 2012). In agreement with these results, we observed that PapMV induced an increased expression of CD70 on BMDCs. More importantly, PapMV also increased long-term memory CD8⁺ T cell response, the ultimate goal of any vaccine. Since CD8⁺ T cells are important to control infection with LM (Harty *et al.*, 1996, Ladel *et al.*, 1994), an enhanced memory response should result in better control against a recall infection. Fittingly, we showed that the use of PapMV as adjuvant for a BMDC-OVA vaccine increases the quality of the secondary effector T cell response and protection of mice against a LM-OVA challenge. Thus, we demonstrated that PapMV is a suitable adjuvant for the generation of protective CD8⁺ T cell responses.

The type of immune response generated by a vaccine and therefore the choice of the adjuvant used is crucial to ensure an effective protection or treatment. Thus, increasing efforts are being made to determine the modes of action of adjuvants and to understand the type of immune

responses necessary to protect against various infections or disease. The findings of this study are very important to further develop novel effective adjuvants for T-cell vaccines. We have established that PapMV is a potent TLR7 agonist that induces strong IFN- α production and broad immune cell activation. TLR7 agonists such as imidazoquinolines (like R837) have been shown to increase the efficiency of vaccines that trigger cellular immune responses against pathogens or cancer (Bourquin *et al.*, 2011, Kastenmuller *et al.*, 2011, Stary *et al.*, 2007, Sterry *et al.*, 2002, Wille-Reece *et al.*, 2005). However, use of imidazoquinolines is limited to specific applications such as topical creams because of their side effects and short half-life when administered systemically (Tomai *et al.*, 2011). PapMV have not shown any signs of toxicity *in vivo* in pre-clinical studies and have a stable repetitive and crystalline structure that protects the ssRNA from degradation and efficiently targets APCs. Other VLPs displaying various TLR ligands have provided encouraging results in various pathological settings. In particular, VLPs loaded with CpG oligodeoxynucleotides (TLR9 ligands) have shown a very promising therapeutic potential against cancer (Speiser *et al.*, 2010, Z. Xu *et al.*, 2013), but also in other context such as allergen-specific immunotherapy (Klimek *et al.*, 2013a, Klimek *et al.*, 2013b, Senti *et al.*, 2009). Cancer immunotherapy with DC-based vaccines has also provided great promises in the last few years, but requires optimization to become fully effective (Palucka *et al.*, 2012, Zheng *et al.*, 2013). Our results demonstrate that PapMV is a suitable adjuvant for BMDC-based vaccines that could be applicable to the development of improved therapeutic DC vaccination strategies against cancer and chronic infections.

1.6 Acknowledgements

We are grateful to P. Pitha-Rowe for providing the *Irf5/7^{-/-}* mice and to C. Daniel, P. Duplay, K. Heinonen, and S. Stäger for critical reading of the manuscript.

1.7 Supplementary figures

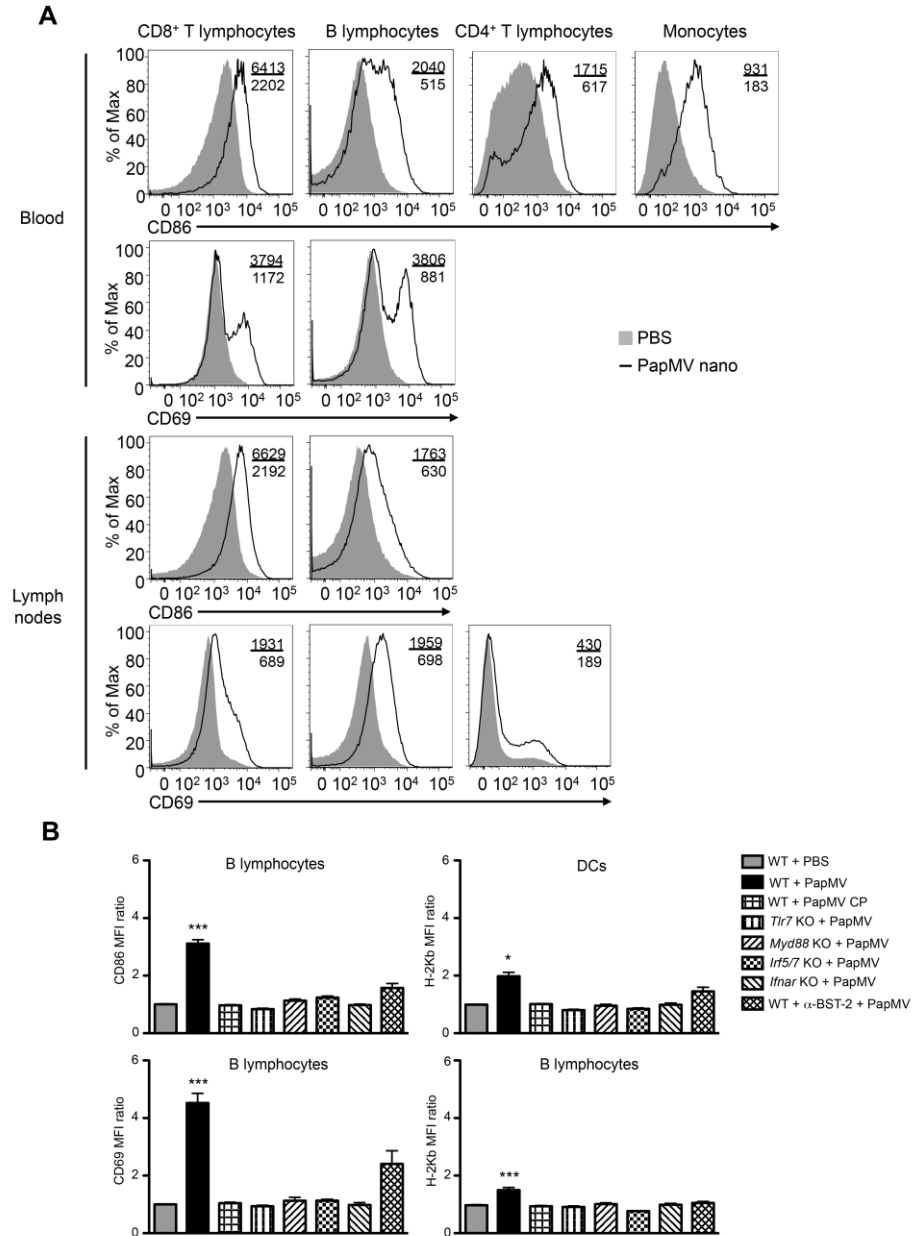


Figure S1. PapMV nanoparticles induce the activation of a broad range of immune cells in mice.

Histograms represent flow cytometry analysis of CD86, CD69 and H-2Kb expression on CD8⁺ T cells, CD4⁺ T cells, B cells and monocytes in peripheral lymph nodes (pLN) and blood of WT mice 24 h after i.v. immunization with 100 mg of PapMV (bold lines) or 100 ml PBS (filled histograms). (B) Compilation of CD86, H-2Kb and CD69 expression on B cells and DCs 24 h post-immunization. Results are presented as a ratio of the Mean Fluorescence Intensity (MFI) of the analyzed sample on the MFI of the PBS sample. Results are shown as the mean \pm SEM. (n = 3; 2-5 mice per group) * p < 0.05, *** p < 0.001.

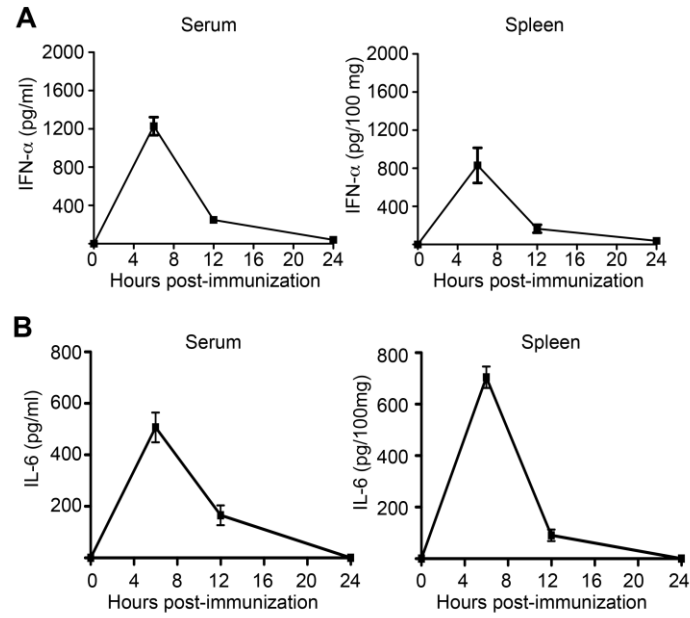


Figure S2. Kinetics of IFN- α (A) and IL-6 (B) production in serum and spleen of WT mice following immunization with PapMV by ELISA.

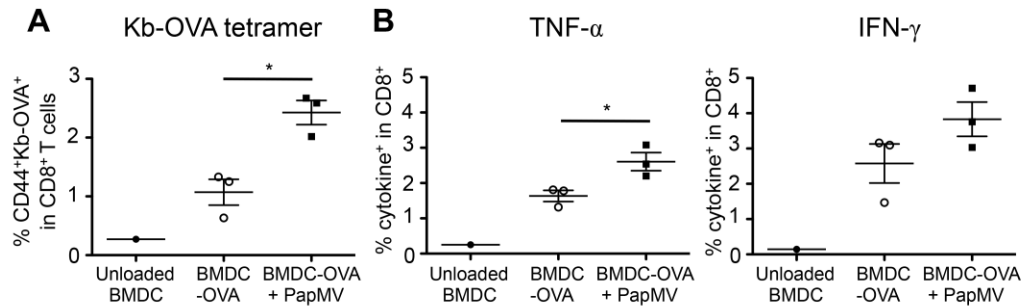


Figure S3. PapMV administration s.c. increases the OVA-specific effector CD8⁺ T cell immune response generated by BMDC-OVA s.c. immunization.

(A) Proportions of Kb-OVA CD8⁺ T cells and (B) Cytokine producing CD8⁺ T cells detected following splenocyte restimulation 7 days post-immunization. (n = 2; 3 mice per group) **p* < 0.05

2. ARTICLE 3 : POTENTIATING CANCER IMMUNOTHERAPY USING PAPAYA MOSAIC VIRUS-DERIVED NANOPARTICLES

Titre en français : Potentialisation de l'immunothérapie du cancer en utilisant des nanoparticules dérivées du virus de la mosaïque de la papaye

Auteurs : Marie-Ève Lebel¹, Karine Chartrand¹, Esther Tarrab¹, Pierre Savard², Denis Leclerc³ and Alain Lamarre¹

Affiliations :

¹Immunovirology Laboratory, Institut National de la Recherche Scientifique (INRS), INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada H7V 1B7

²Department Neurosciences and ³Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Infectious Disease Research Centre, Laval University, Quebec City, Quebec, Canada, G1V 4G2

Contributions des différents auteurs :

MÈL : Conception du projet, exécution des expériences, rédaction de l'article

KC : Exécution des expériences

ET : Conseils techniques

PS : Développement du procédé de production du PapMV

DL : Correction de l'article

AL : Conception du projet, rédaction et correction de l'article

Titre du journal : nano letters, publié le 18 février 2016

Résumé en français : Le récent développement de nouvelles méthodes d'immunothérapie est en train de révolutionner le traitement du cancer. Celles-ci comprennent par exemple : le blocage de point de contrôle immunitaire, l'immunomodulation ainsi que la vaccination thérapeutique. Bien que ces méthodes soient efficaces, la combinaison de plusieurs approches d'immunothérapie sera nécessaire afin d'atteindre un bénéfice thérapeutique maximal. À cet égard, nous avons démontré précédemment que les pseudoparticules du virus de la mosaïque de la papaye (PapMV), grâce à leur capacité intrinsèque d'activer la réponse immunitaire innée suite à la production d'IFN- α , peuvent être utilisées en tant que : i) molécules

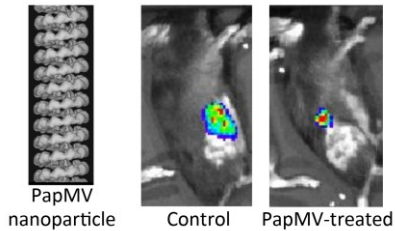
immunostimulatrices, ii) adjuvants et iii) plateformes vaccinales. Dans cet article, nous démontrons que l'administration intra-tumorale de PapMV ralentit considérablement la croissance du mélanome B16 et prolonge la survie des souris. De plus, ce traitement engendre une augmentation de la production de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires, ce qui résulte en une hausse de l'infiltration des cellules immunitaires dans la tumeur. La proportion de lymphocytes T CD8⁺ totaux et spécifiques à la tumeur est aussi augmentée tandis que celles des MDSC est réduite suite à l'injection de PapMV. En outre, l'administration systémique de PapMV empêche l'implantation de métastases dans les poumons. Enfin, l'ajout du PapMV à deux méthodes d'immunothérapie, soit l'immunisation à l'aide de DC et l'utilisation d'anticorps bloquant anti-PD-1, améliore significativement leur effet thérapeutique en augmentant la réponse immunitaire anti-tumorale. Dans cette étude, nous avons démontré que les nanoparticules dérivées d'un virus de plante avaient un grand potentiel, autant seuls qu'en association avec d'autres immunothérapies prometteuses, pour la thérapie du cancer.

2.1 Abstract

The recent development of novel immunotherapies is revolutionizing cancer treatment. These include, for example: immune checkpoint blockade, immunomodulation or therapeutic vaccination. Although effective on their own, combining multiple approaches will most likely be required in order to achieve the maximal therapeutic benefit. In this regard, the papaya mosaic virus nanoparticle (PapMV) has shown tremendous potential as: i) an immunostimulatory molecule, ii) an adjuvant and iii) a vaccine platform through its intrinsic capacity to activate the innate immune response in an IFN- α -dependent manner. Here, we demonstrate that intratumor administration of PapMV significantly slows down melanoma progression and prolongs survival. This correlates with enhanced chemokine and pro-inflammatory-cytokine production in the tumor and increased immune-cell infiltration. Proportions of total and tumor-specific CD8⁺ T cells dramatically increase following PapMV treatment whereas those of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) concomitantly decrease. Moreover, systemic PapMV administration prevents metastatic tumor-implantation in the lungs. Importantly, PapMV also synergistically improves the therapeutic benefit of dendritic cell (DC)-based vaccination and PD-1 blockade by potentiating anti-tumor immune responses. This study illustrates the immunostimulatory potential of a plant virus-derived nanoparticle for cancer therapy either alone or in conjunction with other promising immunotherapies in clinical development.

KEYWORDS: Cancer immunotherapy, plant virus-derived nanoparticle, immune checkpoint blockade, immunomodulation, therapeutic vaccination

Table of Contents Graphic



2.2 Text

In recent years, a growing number of studies have demonstrated the importance of the immune system in controlling cancer development highlighting the possibility of targeting immune cells to improve cancer therapy. Manipulation of the immune system, using immune checkpoint blockade, immunomodulators or therapeutic vaccination, has indeed shown great promise for the treatment of various types of cancer (Illidge, 2015, Rini, 2014, P. Sharma *et al.*, 2015). However, the enormous complexity of cancer emphasizes the need of combining multiple treatment approaches in order to achieve the maximal medical outcome. In this regard, plant virus-like nanoparticles (VLPs) offer an attractive means of stimulating immune responses towards tumors due to their intrinsic immunostimulatory properties (Lebel *et al.*, 2015). For example, VLPs derived from the potato virus X were successfully used to protect mice against a lymphoma challenge through specific antibody production (Jobsri *et al.*, 2015). In addition, cowpea mosaic virus nanoparticles were recently shown to confer therapeutic activity in various poorly immunogenic murine tumor models (Lizotte *et al.*, 2015). Furthermore, we have shown that PapMV nanoparticles possess multiple desirable properties that could be extremely useful for cancer immunotherapy applications. PapMV is recognized by various human and murine immune cells leading to their efficient activation (Denis *et al.*, 2008, Hanafi *et al.*, 2010, Lacasse *et al.*, 2008, Leclerc *et al.*, 2007). This is achieved through its rapid endocytosis by antigen presenting cells (APC), such as plasmacytoid dendritic cells (pDCs), followed by the release of the non-coding ssRNA contained within the nanoparticle and of its recognition by endosomal TLR7 (Hanafi *et al.*, 2010, Lebel *et al.*, 2014, Leclerc *et al.*, 2007). This leads to the production of interferon-alpha (IFN- α), which is an antiviral cytokine with potent immunomodulatory properties

(Lebel *et al.*, 2014). We have shown that these properties can be exploited to stimulate the development of protective humoral and cellular immune responses against various bacterial and viral infections (Denis *et al.*, 2008, Lacasse *et al.*, 2008, Lebel *et al.*, 2014, C. Mathieu *et al.*, 2013, Savard *et al.*, 2011). We demonstrate here that PapMV is also highly efficient at inducing antitumor immunity.

Therapy with high-dose IFN- α has been shown to improve relapse-free and overall survival in melanoma patients (Tarhini *et al.*, 2012). We therefore chose to evaluate the immunotherapeutic potential of PapMV in the B16 syngeneic melanoma-mouse model knowing that the immunomodulatory properties of PapMV largely depend on IFN- α production (Lebel *et al.*, 2014). Moreover, B16 is weakly immunogenic due to low major histocompatibility complex (MHC) expression making it a highly relevant model for immunotherapeutic studies (Sfondrini *et al.*, 2013). PapMV is a nanoparticle possessing a flexible rod-like structure of about 80 nm in length with a neutral charge (figure S1a-c). By conducting *in vitro* stimulation assays, we showed that PapMV had no direct cytotoxic properties towards B16 melanoma cells (figure S1d). However, when PapMV is injected into subcutaneously (s.c.) implanted B16-OVA tumors or systemically, it interacts with several types of immune cells (figure S2a). As shown, all immune cells within the tumor analyzed were found to be associated with PapMV following intratumor administration of A647-labelled PapMV. In contrast, PapMV was mainly found within the macrophage population in tumor-draining lymph nodes suggesting that these cells phagocytose PapMV in the tumor and migrate to draining lymph nodes. When PapMV is injected intravenously (i.v.) however, it is predominantly found associated with phagocytic cells from the blood, lungs and spleen such as dendritic cells, B cells and macrophages (figure S2b). Importantly, while we have shown that i.v. injection of PapMV induces systemic IFN- α production by pDCs (Lebel *et al.*, 2014), intratumor administration leads to local IFN- α production by macrophages in the tumor and draining lymph node (figure S2c). Thus, PapMV strongly interacts with immune cells and induces IFN- α production following systemic and local administration.

In order to evaluate the therapeutic activity of PapMV against melanoma, B16-OVA tumors were injected with PapMV on days 7-, 12- and 17-post implantation. As shown in Figure 1a, treatment significantly slowed down tumor progression compared to vehicle treated controls as well as prolonged survival by more than a week in this typically highly aggressive model (Figure 1b). In addition, the percentage of B16 cells expressing Ki67, an activation/proliferation marker, decreased following PapMV administration indicating a reduction in tumor-cell proliferation (Figure 1c). Furthermore, levels of MHC-I surface expression significantly increased suggesting

the potential enhancement of tumor immunogenicity (Figure 1d); this is in agreement with the well-characterized effect of IFN- α on MHC-I upregulation (Gallucci *et al.*, 1999) as well as with our previous findings which illustrated that systemic PapMV administration increases MHC-I surface expression on various immune cells along with other activation markers and costimulatory molecules (Lebel *et al.*, 2014). Importantly, the therapeutic effect of PapMV administration on tumor progression and mice survival was also observed with a notably higher efficacy in the less immunogenic parental B16F10 melanoma line, which does not express the OVA model antigen (Figures 1e-f).

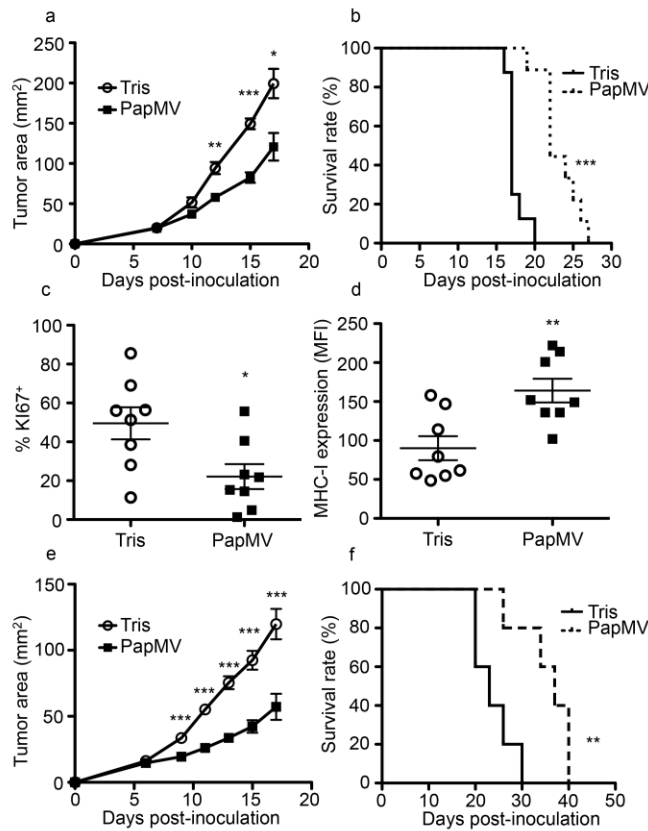


Figure 1. PapMV treatment decreases the growth rate of B16-OVA melanoma tumors and increases survival. C57BL/6 mice were implanted with $2.5-5 \times 10^5$ B16-OVA (a-d) or B16F10 (e-f) cells s.c. before receiving 100 μ g of PapMV or Tris 10 mM directly into the tumor on days 7-, 12- and 17-post implantation. (a and e) Tumor growth was followed by measuring the tumor diameter and calculation of the tumor area. (b and f) Survival rates of treated mice. Mice were euthanized when tumors reached a diameter of 17 mm. (c) Proportions of Ki67⁺ cells and (d) Mean Fluorescence Intensity (MFI) of MHC-I expression in the CD45⁺ tumor-cell population measured by flow cytometry on day 15-post implantation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

To determine the ability of PapMV treatment to induce anti-tumor immune responses, we harvested tumors 6 h after the final administration of PapMV and quantified chemokine and cytokine production in tumor homogenates using a Luminex detection assay. Here we observed

that intratumor concentrations of chemokines IP-10 (Figure 2a), MIG (Figure 2b) and MCP-1 (Figure 2c) were all significantly increased in PapMV-treated animals compared to controls. Notably, these molecules have been previously shown to be potent chemoattractants especially for T cells, monocytes and DCs (Griffith *et al.*, 2014). Similarly, the concentrations of pro-inflammatory cytokines IL-1 α (Figure 2d) and IL-5 (Figure 2e) were significantly increased in PapMV-treated mice compared to controls; although the levels of IL-6 (Figure 2f) and IFN- γ (Figure 2g) were elevated in a subset of animals, these increases did not attain statistical significance. Pro-inflammatory cytokines have also been implicated in immune-cell recruitment and activation within tumor tissue, that drives or inhibits tumor development depending on the nature of the immune infiltrate (Giraldo *et al.*, 2014). Thus we sought to characterize immune-cell infiltration 3 days following the second PapMV administration on day 15 post tumor implantation. Using the leukocyte antigen CD45 as a marker of immune cells, we observed that relative to control mice, PapMV-treated mice featured an elevated proportion of immune cells in tumor homogenates (Figure 2h). Interestingly, proportions of MDSCs significantly decreased in treated tumors (Figure 2i) even though their absolute number did not vary (Figure 2j), possibly due to the large immune infiltrate induced following PapMV administration. MDSCs have been previously shown to favor tumor development through suppression of T-cell responses (Talmadge, 2007). We surmise that the decrease in the proportion of MDSCs observed is due to IFN- α a cytokine that has been demonstrated to inhibit MDSC-mediated immunosuppression (Zoglmeier *et al.*, 2011) and which is highly induced following PapMV administration (Lebel *et al.*, 2014) (Figures S2-3). Next we quantified the level of CD8⁺ T-cell infiltration in tumors from PapMV-treated mice and found that it was strikingly increased relative to controls (Figures 2j-k). Importantly, proportions (Figures 2l-n) and absolute numbers (Figure 2j) of tumor-specific CD8⁺ T cells, as quantified by flow cytometry using tetramers specific for the dominant melanocyte self-epitopes of gp100 and TRP2 or the model tumor antigen OVA, also significantly increased in treated mice. Collectively, these results indicate that the intrinsic ability of PapMV to activate the innate immune system leads to increased priming of tumor-specific T-cell responses and resultantly, better tumor control.

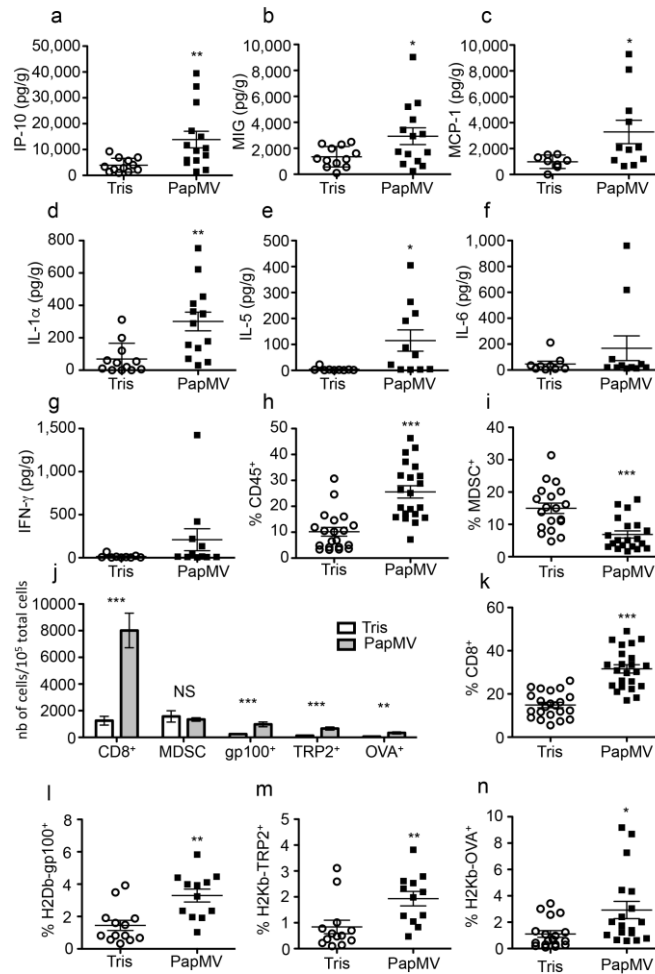


Figure 2. PapMV administration induces chemokine/cytokine production and tumor immune-cell infiltration.

C57BL/6 mice were implanted with 5×10^5 B16-OVA cells s.c. before receiving 100 μ g of PapMV or Tris 10 mM directly into the tumor on days 7-, 12- and 17-post implantation. Six hours following the last PapMV treatment, tumors were harvested, homogenized and chemokines/cytokines quantified using Luminex to assay levels of (a) IP-10, (b) MIG, (c) MCP-1 (d) IL-1 α , (e) IL-5, (f) IL-6 and (g) IFN- γ . On day 15-post implantation, tumors were harvested to quantify immune-cell infiltration by flow cytometry. (h) Proportions of total CD45⁺ cells. (i) Proportions of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) within the CD45⁺ cell population. (j) Absolute numbers of different immune-cell populations in the tumor per 10⁵ total cells. Proportions of (k) CD8⁺ T cells, (l) gp100- (m) TRP2- and (n) OVA-specific CD8⁺ T cells within the CD45⁺ cell population. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

The most significant advantage of using non-infectious virus-derived nanoparticles for cancer immunotherapy, as opposed to live oncolytic viruses or nucleoside analogs, possibly lies in their utility for systemic delivery applications. For understandable safety concerns, it would be prudent to avoid using live viruses for such applications wherein non-infectious nanoparticles would provide a viable alternative. Moreover, the use of nucleoside analogs as agonists of TLR7/8 induce adverse systemic side effects *in vivo* limiting their use to topical applications (Engel *et al.*, 2011). In contrast, i.v. administration of PapMV does not lead to significant systemic cytokine production except from IFN- α and IL-12p40, which bear desirable anti-tumor adjuvant properties

(Rafique *et al.*, 2015, Tugues *et al.*, 2015) (Figure S3). This is an important consideration to make given that systemic treatment is probably the most appropriate means of preventing metastasis development. To investigate the suitability of this approach, PapMV was administered systemically to mice followed by i.v. administration of B16-OVA cells 6 h later to evaluate the induction of metastatic implantation in the lungs as previously described (Stackpole, 1981). Mice were euthanized 17 days post-inoculation to assess metastasis development in harvested lungs. PapMV-treated mice showed radically reduced numbers of tumor nodules compared to controls with some mice being practically free of metastasis (Figure 3a). To provide a more quantitative assessment of the anti-metastatic effect of PapMV in this experimental setting, treatment with PapMV was performed 6 h before or 2 days after i.v. administration of B16-OVA cells expressing luciferase (B16-OVA-oFL) followed by luciferase quantification in lung homogenates 21 days later. Systemic delivery of PapMV before tumor injection provided significant protection against metastasis implantation in the lungs (Figure 3b). Remarkably, treatment with PapMV 2 days after metastasis implantation also provided significant therapeutic benefit. The protective anti-metastatic effect correlated with an elevated proportion of tumor-specific T cells in lung-draining mediastinal lymph nodes (Figure 3c) again indicating the development of PapMV-induced immune mediated protection. As expected and in accordance with our previous study (Lebel *et al.*, 2014), the beneficial effect of PapMV was highly dependent on TLR7 (Figure S4a). Moreover, treatment with ssRNA or capsid monomers from PapMV either locally or systemically did not provide any significant therapeutic (Figures S4a-b) or immune stimulatory (Figures S4c-i) activity confirming the requirement for PapMV to be in a nanoparticle structure to exhibit adjuvant properties. Remarkably, we also observed a greater therapeutic benefit from PapMV compared to equivalent amounts of R837, a TLR7 agonist already in clinical use for cancer treatment (Figures S4a-i).

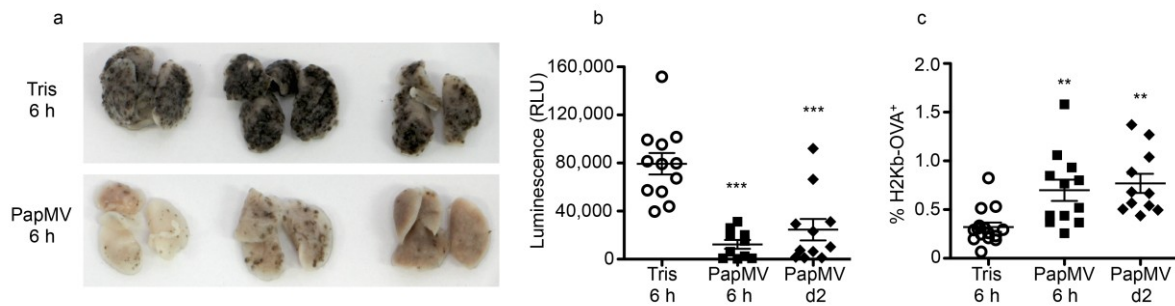


Figure 3. Systemic PapMV administration reduces B16-OVA metastasis implantation in the lungs.

(a) C57BL/6 mice were injected i.v. with Tris (top) or PapMV (bottom) 6h before i.v. inoculation with B16-OVA cells. Mice were euthanized 17 days post B16-OVA injection to observe lung nodule formation. (b) Mice were injected with Tris or PapMV 6 h before or 2 days after (d2) B16-OVA-oFL (B16-OVA cells expressing luciferase) inoculation. Luminescence was quantified in lung homogenates 21 days post tumor-cell inoculation by measuring Relative Light Units (RLUs). (c) Flow cytometry analysis of OVA-specific CD8⁺ T cells in mediastinal lymph nodes at day 21-post B16-OVA-oFL inoculation. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

The efficacy of PapMV for cancer immunotherapy is supported by its ability to increase the number of tumor-specific T cells and enhance their effector function (Lebel *et al.*, 2014). Of note, various immunotherapy approaches are currently being developed to either favor the expansion of tumor-specific T cells or increase their effector capacity and some of these have already been translated into clinical application (Rini, 2014). In light of these trends, we sought to determine whether administration of PapMV in concert with immunotherapeutic approaches in clinical development could drive enhanced anti-tumor activity. First, we tested its capacity to augment the effectiveness of a DC-based vaccine when used as an adjuvant. Here, mice were treated with PapMV directly into s.c. B16-OVA tumors 7 days after implantation after which an s.c. injection of DCs pulsed with the immunodominant ovalbumin peptide, SIINFEKL, was administered in the opposite flank 6 h later. Upon administration of an identical vaccine boost at day 14, we observed increased proportions of OVA-specific CD8⁺ T cells in the blood of PapMV-treated mice compared to mice treated with unpulsed DCs or OVA-pulsed DCs in the absence of adjuvant (Figure 4a). Notably, this is consistent with our previous findings in which we used a systemic DC-OVA vaccination approach and observed that PapMV significantly increased proportions of OVA-specific splenic-T cells (Lebel *et al.*, 2014). More importantly, PapMV treatment dramatically reduced tumor growth compared to DC-OVA vaccination in the absence of PapMV adjuvant (Figure 4b and 4c), which translated into a significant increase in the survival rate of treated animals with one mouse completely clearing the tumor (Figure 4d). To determine the mechanism of protection in the surviving mouse, B16-OVA-oFL cells were injected i.v. 45 days post tumor clearance and metastasis development was evaluated 21 days later. No signal

was detected upon quantification of luciferase activity thus confirming the establishment of protective immunological memory following PapMV treatment (data not shown). These data clearly demonstrate the adjuvant properties of PapMV, which can be applied towards increasing the therapeutic potential of DC-based vaccination strategies.

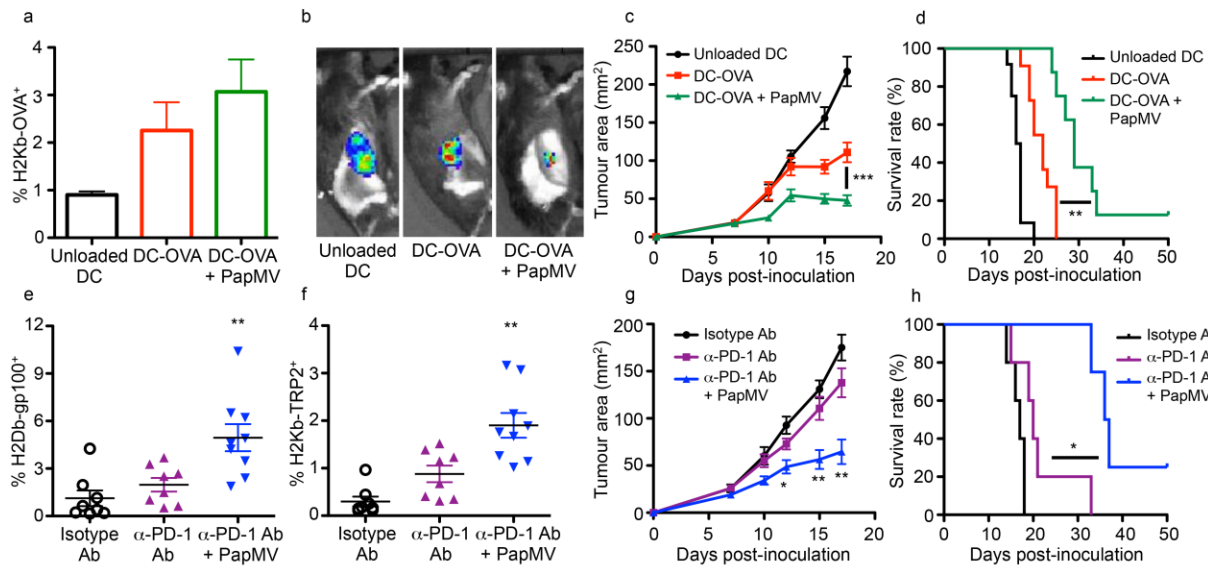


Figure 4. PapMV administration potentiates the therapeutic effect of dendritic cell-based vaccination and PD-1 blockade.

C57BL/6 mice were implanted s.c. with B16-OVA (a, c, d) or B16-OVA-oFL cells (b). On day 7 post implantation, mice were treated with PapMV directly into tumors followed 6 h later by s.c. vaccination with DCs pulsed with the immunodominant peptide from ovalbumin SIINFEKL in the opposite flank. An identical vaccine boost was given on day 14. (a) Proportions of OVA-specific CD8⁺ T cells in the blood and (b) *in vivo* imaging of mice with B16-OVA-oFL tumors on day 14-post implantation. (c) Tumor growth was followed by measuring the tumor diameter and calculation of the tumor area. (d) Survival rates of treated mice. Mice were euthanized when tumors reached a diameter of 17 mm. In a separate set of experiments, mice were implanted s.c. with B16-OVA tumors and treated with 100 µg PapMV on days 7-, 12- and 17-post implantation. On days 7, 11 and 15, mice received i.p. administrations of 250 µg of anti-PD-1 blocking antibody or isotype control. (e) Proportions of gp100- and (f) TRP2-specific CD8⁺ T cells within the CD45⁺ cell population on day 15-post implantation. (g) Tumor growth was followed by measuring tumor diameter and calculation of the tumor area. (h) Survival rates of treated mice. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001

As previously mentioned, another recent and extremely promising immunotherapeutic approach is the development of immune checkpoint blockade protocols especially against the PD-1 immunoregulatory pathway (Topalian *et al.*, 2015). *In vivo* blockade of PD-1 or of its receptor PD-L1 has been shown to impede the inhibitory effect of this pathway on T cells thus potentiating the development of a more effective immune response. Therefore, we evaluated the synergistic effect of PapMV treatment in combination with PD-1 blockade. Mice receiving PapMV combined with an anti-PD1 blocking antibody showed a significant increase in proportions of CD8⁺ T cells specific for the tumor antigens gp100 (Figure 4e) and TRP2 (Figure

4f) compared to anti-PD-1 treatment alone which by itself, did not significantly increase tumor-specific T-cell numbers when compared to groups receiving the isotype control. Moreover, tumor-specific CD8⁺ T-cell proportions in tumors of mice treated with PapMV combined with anti-PD-1 antibodies were not significantly higher than those that we previously observed with PapMV treatment alone (Figure 2l and 2m). These results indicate that on its own, PD-1 blockade does not favor immune-cell infiltration in tumor tissue and that the ability of PapMV to induce immune-cell infiltration is not enhanced by PD-1 blockade. This conclusion is in agreement with clinical data indicating that the therapeutic benefit of PD-1 blockade is mainly achieved in the presence of pre-existing anti-tumor T-cell immunity (Kamphorst *et al.*, 2013, Spranger *et al.*, 2015). However, in concert, the two agents work synergistically towards improved tumor immunity as shown by the reduction in tumor growth (Figure 4g) and increased survival (Figure 4h) compared to PD-1 blockade alone. Furthermore, the combined efficacy was also improved over that of PapMV alone (Figure 1a and 1b). This is consistent with a recent study using a mouse melanoma model describing an increased therapeutic effect when anti-PD-1 blockade was combined with poly(I:C) administration (Bald *et al.*, 2014a). The synergistic effect is likely the result of increased immune-cell infiltration and tumor-specific T-cell priming, through PapMV's capacity to increase antigen presentation (Lacasse *et al.*, 2008, Leclerc *et al.*, 2007), alongside the well-known action of PD-1 blockade on increasing T-cell function. In agreement with this hypothesis, we observed a significantly increased proportion of effector CD8⁺ T cells producing granzyme B and IFN- γ when the two treatments were combined (Figure 5a and 5b) which translated into a significant reduction of tumor progression (Figure 5c).

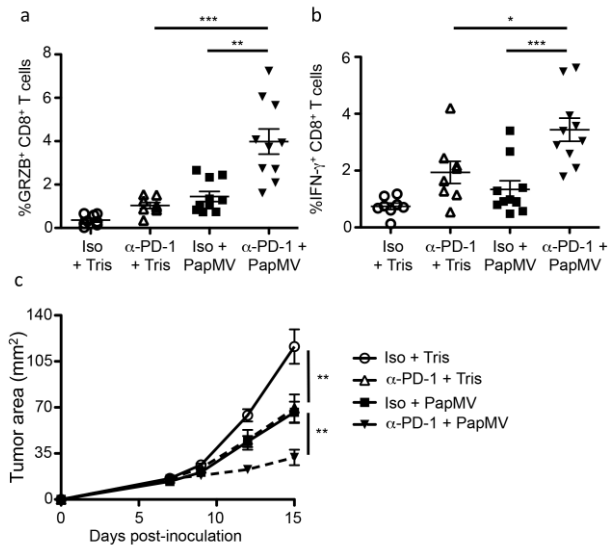


Figure 5. Combined PapMV and anti-PD-1 antibody treatment increases the functionality of infiltrating CD8⁺ T cells.

C57BL/6 mice were implanted s.c. with B16-OVA cells and treated with 100 μ g PapMV on days 7- and 12-post implantation. On days 7- and 11-, mice received i.p. administrations of 250 μ g of anti-PD-1 blocking antibody or isotype control. (a) Proportions of granzyme B and (b) IFN- γ positive CD8⁺ T cells within the CD45⁺ cell population on day 15-post implantation. (c) Tumor growth was followed by measuring the tumor diameter and calculation of the tumor area. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

It is important to note that the therapeutic effects observed with PapMV were obtained without having to vaccinate against any tumor epitopes. Indeed, treatment with PapMV alone induced the development of CD8⁺ T-cell responses against endogenous tumor epitopes possibly by breaking immune tolerance towards these antigens or by significantly enhancing pre-existing anti-tumor immune responses. This confers a significant advantage to PapMV over classical therapeutic vaccination approaches that require identifying and selecting the most appropriate patient-specific antigenic tumor peptides for vaccine design (Trajanoski *et al.*, 2015). Another advantage is conferred by the ease with which PapMV can be engineered to express peptides on its surface, which provides an opportunity to further increase its therapeutic potential by generating nanoparticles displaying various tumor epitopes potentially strengthening even more specific anti-tumor immune responses generated (Babin *et al.*, 2013, Lacasse *et al.*, 2008). Furthermore, nanoparticles derived from plant viruses offer significant benefits over other immunomodulatory molecules in clinical development such as endosomal TLR agonists. Indeed, unlike RNA or nucleoside analogues that induce undesirable side effects through indiscriminate cellular target and entry as well as exhibit short half-lives (Bumcrot *et al.*, 2006, Engel *et al.*, 2011, Robinson *et al.*, 1976), plant virus-derived nanoparticles are safe, immunogenic, stable

and predominantly target antigen-presenting cells (Lebel *et al.*, 2015). Moreover, in contrast to other plant virus particles, PapMV carries a non-coding ssRNA making it environmentally safe.

In conclusion, PapMV's intrinsic capacity to activate the innate immune system can be harnessed to advance anti-tumor T-cell responses providing a novel immunotherapy approach with a strong translational potential for cancer treatment. PapMV is presently being tested in a phase 1 randomized, controlled, dose escalation trial when used as adjuvant for the seasonal flu vaccine to determine its safety, tolerability and effectiveness (Folia Biotech Inc., 2015). Results from this trial could thus provide a strong basis for future immunotherapy trials in cancer patients.

2.3 Methods

PapMV nanoparticles

PapMV nanoparticles were provided by Folia Biotech Inc. (Quebec city, Quebec, Canada) and produced as described in our previous study (C. Mathieu *et al.*, 2013). In all experiments, nanoparticles were diluted in Tris 10mM prior to be used. LPS contamination was always < 50 endotoxin units/mg protein and considered as negligible.

Dynamic light scattering

The size of nanoparticles was recorded with a ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, United Kingdom) at a temperature of 10°C at a concentration of 0.1 mg/ml diluted in 10mM Tris pH8 or PBS buffer.

Electron microscopy

Electron micrograph were taken on a FEI Technai Spirit G2. We used negative staining with uranyl acetate 2% dissolved in 10mM Tris/HCl pH 8.0.

Cell culture

B16F10 and B16-OVA cells were kindly provided by Dr. Adrian Ochsenbein (Bern University, Bern, Switzerland) and Dr. Richard Vile (Mayo Clinic, Rochester, MN) respectively and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10 % fetal bovine serum and 5 mg/mL of G418 to select for OVA expression. B16-OVA cells were transfected with an SR- α vector containing the optimized firefly luciferase gene (oFL) kindly provided by Dr. Patrick Hwu (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX) and selected using 1 μ g/ml puromycin to generate the

B16-OVA-oFL cell line. Bone marrow derived dendritic cells were generated as described previously (Lebel *et al.*, 2014).

In vitro cytotoxic assay

B16-OVA cells were incubated with 100 µg/ml PapMV and viable cells were enumerated after 24, 48 and 72 h of stimulation.

Mice

Six- to 10-wk-old, female C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories. All animal experiments were reviewed and approved by the Institut national de la recherche scientifique animal care committee. To establish s.c. tumors, $2.5-5 \times 10^5$ B16-OVA, B16-OVA-oFL or B16F10 in 100 µl PBS were injected in the right flank of mice. In vivo visualization of B16-OVA-oFL was performed using the Xenogen IVIS 100 in vivo imaging system by injecting 2 mg D-luciferin intraperitoneally to tumor bearing mice.

PapMV distribution experiment

PapMV was labeled with Alexa 647 using the Molecular Probes® Protein Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) following the manufacturers' instructions. Alexa 647-labeled PapMV was injected i.t. or i.v. and mice were sacrificed two to four hours post-immunization for flow cytometry analysis.

Immunotherapy treatments

When tumors were palpable, at day 7-post inoculation, immunotherapy treatments were initiated. For treatments using PapMV alone, 100 µg PapMV or 100 µl Tris 10 mM was injected directly into the tumor on days 7- and 12-post inoculation for immune response analyses on day 15 and on days 7-, 12- and 17-post inoculation for tumor progression and survival studies. When PapMV was combined with BMDC vaccination, 100 µg PapMV was injected directly into the tumor on days 7- and 14-post inoculation in combination with s.c. injection in the left flank of 1.25×10^6 BMDC loaded with the OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (SIINFEKL) 6h later. For PapMV treatments combined with anti-PD1 blockade, intratumor injections of 100 µg PapMV on days 7 and 12 were combined with i.p. administration of 250 µg anti-PD-1 blocking antibody or isotype control (BioXcell) on days 7- and 11-post inoculation and immune response analyses were conducted on day 15-post inoculation. Tumors were collected, dissociated and digested with collagenase D and DNase I before red blood cell lysis was performed prior to flow cytometry analysis. For tumor progression and survival studies, a third administration of anti-PD-1 or isotype control

antibody was given on day 15 while a third PapMV treatment was given on day 17-post inoculation. Tumor growth was followed by measuring tumor diameter using a caliper and calculation of the tumor area. Mice were euthanized when tumors reached a diameter of 17 mm.

Lung nodule establishment assay

Mice were injected i.v. with 100 μ l Tris or 100 μ g PapMV 6 h before tumor inoculation with 5×10^5 B16-OVA and euthanized on day 17-post inoculation. Lungs were perfused with 5 ml PBS and conserved in Fekete's solution for nodule visualization. For metastasis quantification, mice were injected i.v. with 100 μ l Tris or 100 μ g PapMV 6h before or 2 days after tumor inoculation with 1×10^6 B16-OVA-oFL and euthanized on day 21-post inoculation. Lungs were homogenized in 1 ml Reporter Lysis Buffer (Promega Corp) for luminescence quantification while mediastinal draining lymph nodes were harvested for tetramer staining analysis by flow cytometry.

Luminex cytokine analyses

Mice were injected s.c. in the right flank with 5×10^5 B16-OVA cells. At day 7-post inoculation, 100 μ g PapMV or 100 μ l Tris 10 mM were injected directly into the tumor. Treatment was repeated at days 12- and 17-post inoculation. 6h after the last injection, tumors were harvested, weighed and homogenized in 1 ml PBS. Supernatants were used to evaluate cytokine production using a Luminex screening assay kit (R & D systems) following the manufacturers' instructions. Chemokine/cytokine concentrations are reported in pg per gram of tumor. Chemokine/cytokine production was evaluated in the blood of mice, 6 h after 100 μ g PapMV i.v. injection and are reported in pg/ml of blood.

Flow cytometry analyses and antibodies

Tumors were recovered from mice and dissociated using frosted slides (VWR International). Cells were digested with 1mg/ml collagenase D (Roche) and 100 μ g/ml DNase I (Roche) for 15 minutes at 37°C and passed through a 100 μ m cell strainer (BD Biosciences). Red blood cell lysis was then performed using a 0.83% NH_4Cl solution. Single-cell suspensions were finally washed with FACS buffer (PBS, 1% BSA, 0.1% sodium azide). Flow cytometry analyses of mouse surface antigens in tumor-infiltrating cells was performed with the following antibodies: anti-CD44 (IM7), -CD11b (M1/70), -CD8 α (53-6.7), gr-1 (RB6-8C5), -F4/80 (BM8), (BioLegend), -CD45 (30-F11) (BD Biosciences), and H-2Kb (AF6-88.5.5.3) (eBioscience). Staining was performed for 20 min at 4°C. PE-coupled gp100-H2Db, TRP2-H2Kb and OVA-H2Kb tetrameric complexes were generated as previously described(Altman et al., 1996) and staining was

performed at 37 °C for 15 min. Intra-nuclear staining of Ki67 (solA15) was performed using Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer (eBioscience), according to the manufacturer's instructions. Intra-cellular staining for IFN- γ (XMG1.2) (BioLegend) and Granzyme B (NGZB) (eBioscience) was performed after a 5 h restimulation with OVA (2 mg/ml) in the presence of brefeldin A (10 mg/ml) while IFN- α production was evaluated after 4 h incubation with brefeldin A (10mg/ml) (RMMA-1) (PBL assay science) using fixation/permeabilization buffer (BioLegend), according to the manufacturer's instructions. Flow cytometry analyses were performed on a BDLSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) and data was analyzed using the FlowJo software (Tree Star Inc.).

Statistical analyses

For pairwise comparisons, data were analyzed for statistical significance using Student's t test. Statistical significance was determined as $P < 0.05$. Survival curves were plotted according to the Kaplan–Meier method, and statistical significance in the different treatment groups was compared using the log-rank test.

2.4 Supplementary figures

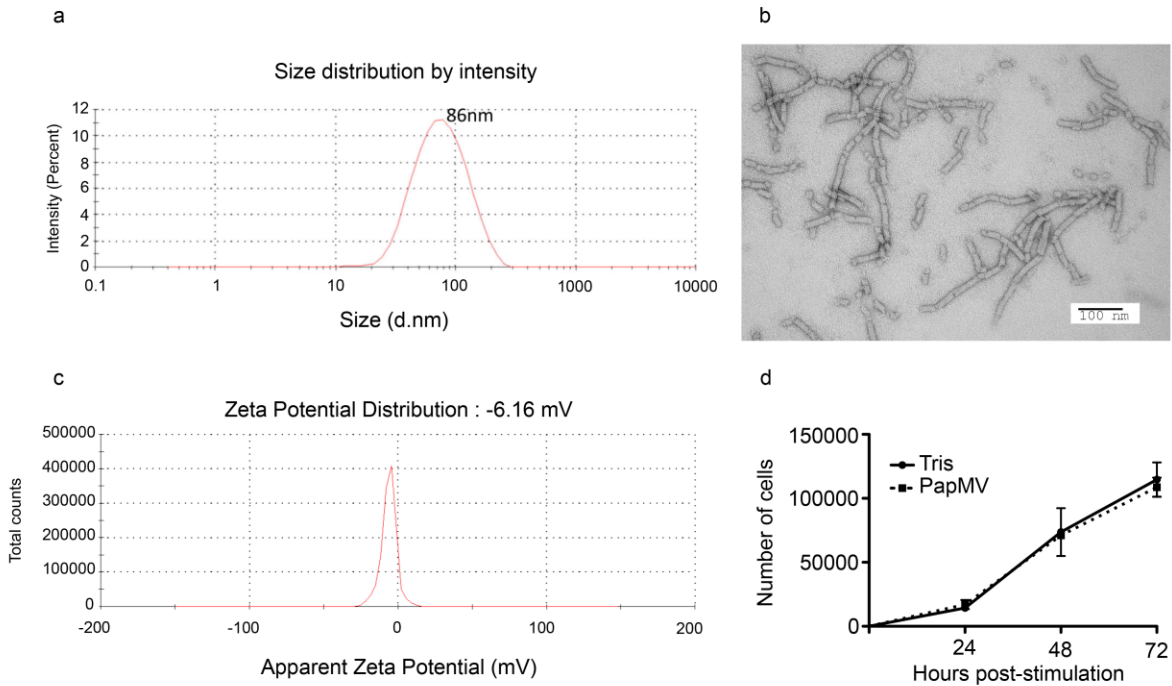


Figure S1. Physicochemical and cytotoxic properties of PapMV.

(a) Size measured by dynamic light scattering (DLS) (b) electron micrograph and (c) zeta potential distribution of PapMV nanoparticles. (d) B16-OVA cells in culture were incubated with 100 $\mu\text{g/ml}$ PapMV and cell numbers were determined at various time points following stimulation.

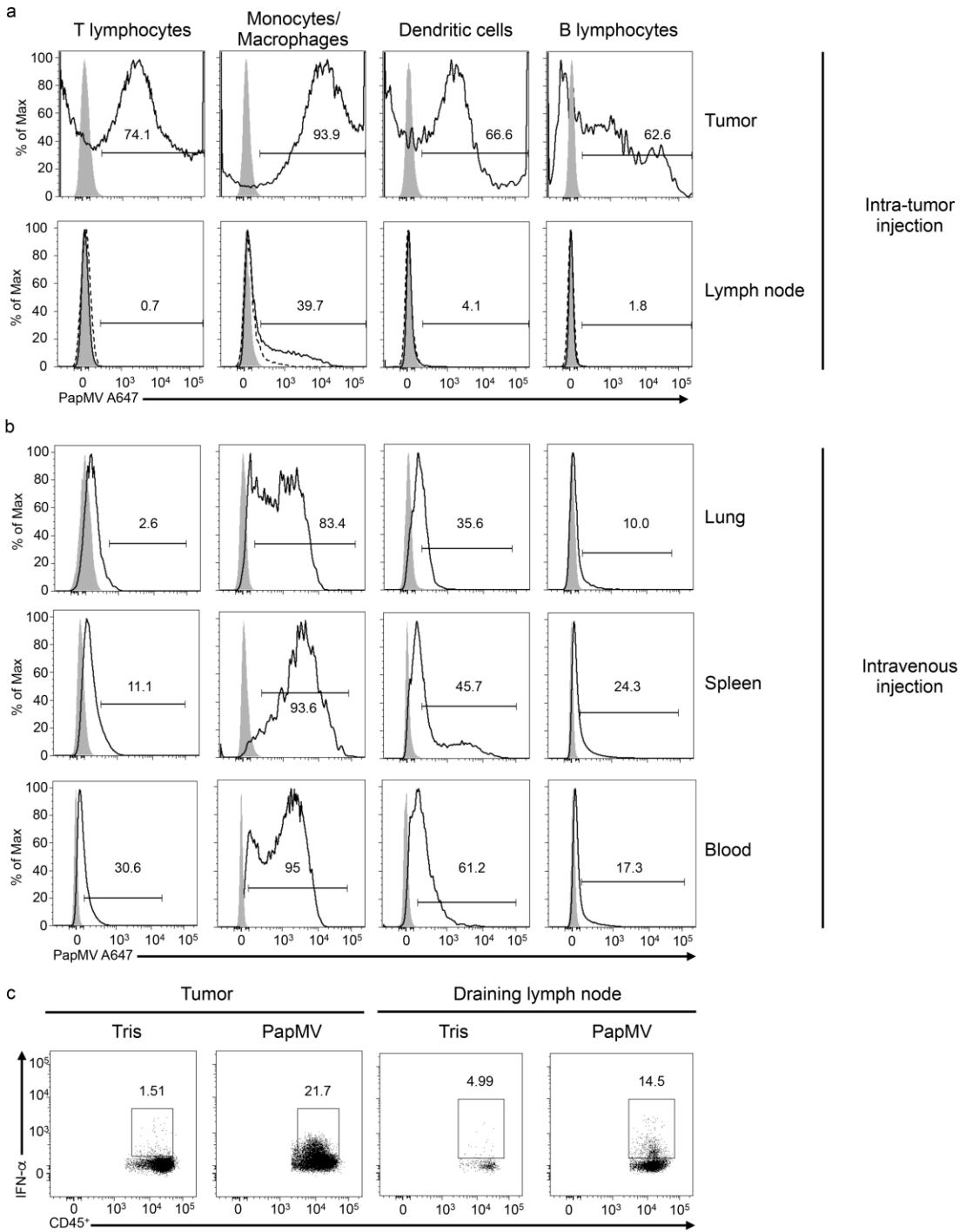


Figure S2. PapMV is predominantly found associated with phagocytic cells following administration.

Representative overlay histograms showing the distribution of PapMV nanoparticles in the tumor (upper graph) and draining (bold lines) and non-draining (dash lines) lymph nodes (lower graph) in different immune cell populations after intratumor (a) or intravenous (b) injection in comparison with naïve mice (filled histograms). (c) Flow cytometry analysis of IFN- α production by F4/80⁺CD11b⁺ macrophages in the tumor and draining lymph node 4 h after PapMV injection in the tumor.

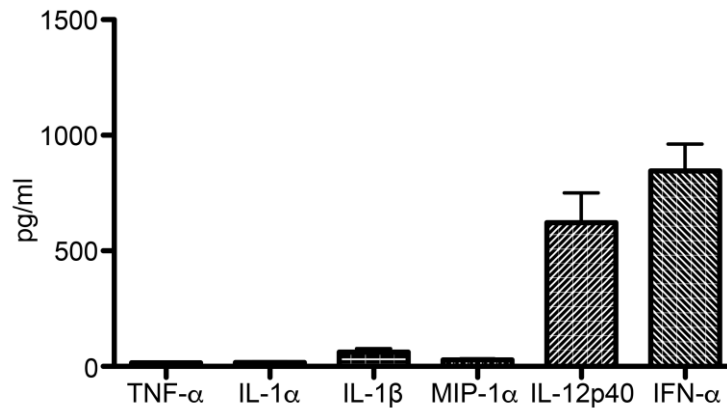


Figure S3. Systemic administration of PapMV induces the production of IL-12p40 and IFN- α but not of other pro-inflammatory cytokines.

Luminex quantification of TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , MIP-1 α , IL-12p40 and IFN- α production in the blood 6 h after intravenous administration of PapMV.

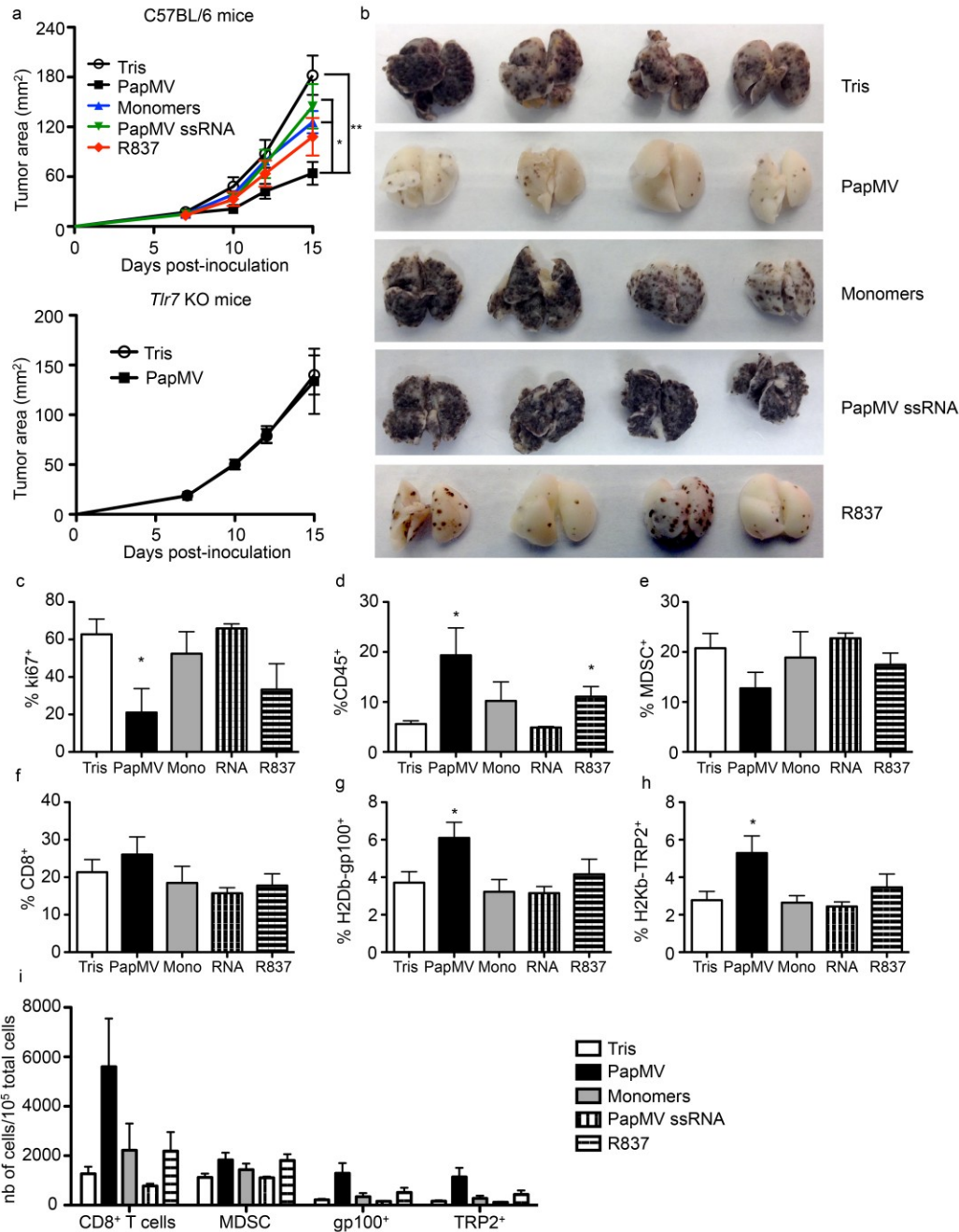


Figure S4. TLR7- and nanoparticle-dependent therapeutic and immune stimulating properties of PapMV. C57BL/6 mice were implanted subcutaneously with 5×10^5 B16-OVA cells. On d7, mice were injected directly into the tumor with 100 μ l Tris 10 mM, 100 μ g PapMV (5 μ g of ssRNA equivalent), 95 μ g monomers, 5 μ g PapMV ssRNA or 5 μ g R837. Treatments were repeated on d12 post implantation. (a) Tumor growth in C57BL/6 (upper panel) or *Tlr7* KO mice (lower panel) was followed by measuring the tumor diameter and calculation of the tumor area. (b) C57BL/6 mice were injected i.v. with 100 μ l Tris 10 mM, 100 μ g PapMV (5 μ g of ssRNA equivalent), 95 μ g monomers, 5 μ g PapMV ssRNA or 5 μ g R837 6 h before i.v. inoculation with B16-OVA cells. Mice were euthanized 17 days post B16-OVA injection to observe lung nodule formation. On d15 post implantation, tumors were harvested to evaluate tumor cell proliferation and to analyze immune-cell infiltration by flow cytometry. (c) Proportions of Ki67⁺ cells in the CD45⁺ tumor-cell population. (d) Proportions of total CD45⁺ cells or (e) myeloid-derived suppressor cells (MDSC), (f) CD8⁺ T cells, (g) gp100- and (h) TRP2-specific CD8⁺ T cells within the CD45⁺ cell population. (i) Absolute numbers of different immune-cell populations in the tumor per 10⁵ total cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3. ARTICLE 4 : COMPLEMENT COMPONENT 3 CONTROLS IFN- α PRODUCTION BY PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS FOLLOWING TLR7 ACTIVATION BY A PLANT VIRUS-LIKE NANOPARTICLE

Titre en français : La molécule C3 du complément contrôle la production d'IFN- α par les cellules dendritiques plasmacytoides suite à l'activation du TLR7 par une nanoparticule dérivée d'un virus de plante.

Auteurs : Marie-Ève Lebel^{*}, Marie-Pierre Langlois^{*}, Jean-François Daudelin[†], Pierre Savard[‡], Denis Leclerc[§] and Alain Lamarre^{*}

Affiliations :

^{*}Immunovirology Laboratory, Institut National de la Recherche Scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada, H7V 1B7

[†]Maisonnette-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H1T 2M4

[‡]Department Neurosciences, Laval University, Quebec city, Quebec, Canada, G1V 4G2

[§]Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Infectious Disease Research Centre, Laval University, Quebec City, Quebec, Canada, G1V 4G2

Contributions des différents auteurs :

MÈL : Conception du projet, exécution des expériences, rédaction de l'article

MPL : Exécution des expériences

JFD : Exécution des expériences

PS : Développement du procédé de production du PapMV

DL : Correction de l'article

AL : Conception du projet, rédaction et correction de l'article

Titre du journal : Article en préparation pour soumission dans The Journal of Immunology

Résumé en français : L'utilisation croissante des virus de plante pour le développement de nouveaux vaccins et traitements d'immunothérapie soulève des questionnements à propos de la façon dont le système immunitaire reconnaît ces virus. Par exemple, alors que les anticorps naturels et le système du complément sont des protéines majeures impliquées dans l'opsonisation, la phagocytose et la destruction des microorganismes infectant les mammifères, leur implication dans la reconnaissance des virus de plante n'est pas bien définie. Dans cette étude, nous avons évalué l'implication des anticorps naturels et du système du complément lors d'une immunisation avec une nanoparticule dérivée du virus de la mosaïque de la papaye (PapMV) présentement utilisée pour le développement de nouveaux vaccins et méthodes d'immunothérapie. Nous avons démontré que les anticorps naturels, bien qu'ils se lient au PapMV ne sont pas impliqués dans sa reconnaissance par les cellules immunitaires. D'un autre côté, la protéine C3 du complément se lie fortement au PapMV et sa déplétion réduit significativement l'interaction entre le PapMV et les cellules immunitaires. Néanmoins, une augmentation de l'activation des cellules immunitaires est observée suite à l'injection du PapMV dans des souris décomplémentées. En fait, il est intéressant de noter qu'en absence de C3, l'injection de PapMV induit une plus grande production d'IFN- α , ce qui résulte en une activation supérieure des cellules immunitaires et des propriétés immunomodulatrices augmentées. En conclusion, dans cette étude, nous avons déterminé le rôle des anticorps naturels et du système du complément dans la reconnaissance et la phagocytose d'un virus de plante, en plus d'identifier l'implication insoupçonnée du C3 dans la régulation de la production d'IFN- α suite à l'activation du TLR7.

3.1 Abstract

The increasing use of plant viruses for the development of new vaccines and immunotherapy treatments raises questions about the way the mammalian immune system recognizes these viruses. For example, while natural antibodies and the complement system are key proteins involved in the opsonisation, phagocytosis and destruction of microorganisms infecting mammals, their implication in plant virus recognition is not well defined. In this study, we address the involvement of natural antibodies and the complement system during immunization with the engineered papaya mosaic virus-like nanoparticle (PapMV) used in vaccines and immunotherapy method currently under development. We demonstrate that natural antibodies, although binding to PapMV, are not involved in its recognition by the immune system. On the

other hand, complement component 3 (C3) strongly binds to PapMV and its depletion significantly reduces PapMV's interaction with immune cells. Nevertheless, an increased immune cell activation was observed following complement depletion. Interestingly, TLR7 activation by PapMV in absence of C3 induces a higher IFN- α production thereby resulting in superior immune cell activation and increased immunomodulatory properties. In conclusion, we uncovered in this study the role of NA and the complement system in the recognition and the phagocytosis of a plant virus and identified an unsuspected role for C3 in regulating the production of IFN- α following TLR7 activation.

3.2 Introduction

The use of plant viruses for vaccination and cancer immunotherapy has gained great interest in recent years (Lebel *et al.*, 2015). We and others have shown that plant viruses can be engineered to express vaccine epitopes, thus resulting in the development of specific humoral and cellular immune responses in vaccinated hosts (Babin *et al.*, 2013, Carignan *et al.*, 2015, Jobsri *et al.*, 2015, Lacasse *et al.*, 2008, Mallajosyula *et al.*, 2014). In addition, plant viruses are highly immunogenic in mammals making them effective adjuvants, vaccines and immunomodulators (Carignan *et al.*, 2015, Jobsri *et al.*, 2015, Lebel *et al.*, 2016, Lebel *et al.*, 2014, Lizotte *et al.*, 2015, C. Mathieu *et al.*, 2013). More specifically, in our work with papaya mosaic virus-like nanoparticles (PapMV), we demonstrated that the ssRNA contained within PapMV activates the TLR7 pathway in plasmacytoid dendritic cells (pDCs) resulting in strong IFN- α production when injected intravenously. IFN- α then activates a number of immune cells, which promote the development of protective CD8⁺ T cell responses in the context of bone marrow-derived dendritic cell (BMDC) immunization in mice (Lebel *et al.*, 2014). Moreover, the immunomodulatory properties of PapMV advantageously alter the tumor microenvironment, thereby increasing the anti-tumoral immune response generated and consequently slowing down tumor growth in the stringent B16 melanoma model (Lebel *et al.*, 2016). Importantly, PapMV, used in conjunction with other immunotherapy treatments, such as DC vaccination and PD-1 blockade, greatly potentiates their therapeutic effect. Therefore, plant viruses, such as PapMV, constitute promising tools in the fight against infectious diseases and cancer. However, how the mammalian immune system recognizes and interacts with plant viruses is not fully understood.

Initial recognition of microorganisms infecting mammals is achieved mainly through interaction with components of the innate immune system such as natural antibodies (NA) or the complement system. NA and complement proteins bind conserved motifs expressed on the surface of pathogens or dying cells favouring their clearance from the bloodstream (Baumgarth *et al.*, 2005, Vas *et al.*, 2013). They are crucial for the initial containment of viral and bacterial infections before the adaptive immune response is developed. They can directly neutralize or eliminate pathogens and are involved in their recruitment to the spleen, an important step to prevent infection of other organs such as the brain (Ochsenbein *et al.*, 1999a) and for the development of the adaptive immune response (Ochsenbein *et al.*, 1999b, Ochsenbein *et al.*, 2000a, Ochsenbein *et al.*, 2000b). Recognition of pathogens by the complement system can be done in three different ways: the classical, the alternative and the lectins pathway. The classical pathway is initiated by the binding of C1q to the Fc portion of antibodies opsonizing pathogens while in the alternative pathway C3 directly binds to the surface of the microorganism. Finally, the lectin pathway involves the fixation of mannose binding lectin (MBL) to carbohydrate component in the membranes of pathogens. Although initiation takes place in different ways, activation of the complement system, invariably leads to the formation of C3 convertase and cleavage of C3. Then a proteolytic cascade leads to the different effector activities of the complement system. Thus, elimination of the central protein C3, following injection of cobra venom factor (CVF), blocks the activation of the three pathways. In summary, NA and the complement system are well known to be implicated in the initial control of microorganisms infecting mammals (Baumgarth *et al.*, 2005, Ochsenbein *et al.*, 2000b). However, their role in plant virus recognition has not been studied. Since plant viruses are not very different from mammalian viruses, it is very likely that these elements of the innate immune system are also involved in their recognition. This could have a significant impact on their dissemination in the body, but also on the development of the adaptive immune response and thus the effectiveness of vaccines and immunotherapy treatments that use plant viruses.

In this study, we evaluate the role of NA and the complement system during immunization with PapMV, an engineered plant virus used in vaccines and immunotherapy treatments currently under development. Using B cell-deficient JHT mice and CVF we demonstrated that NA have no involvement during immunization with PapMV. On the contrary, C3 binds to the surface of the PapMV and its absence reduces PapMV phagocytosis. However, complement depletion enhances immune cells activation following PapMV injection. Unexpectedly, absence of C3 results in higher IFN- α production after TLR7 activation by PapMV ssRNA, thus increasing its immunomodulatory properties.

3.3 Materials and Methods

Ethics statement. This study was performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines. All animal experiments were reviewed and approved by the INRS-IAF institutional animal care committee.

Mice. Female 6- to 10-week-old C57BL/6 mice were purchased from Charles River. *Tlr7* KO, *Myd88* KO and *C3* KO mice were purchased from The Jackson Laboratory. Where indicated, complement depletion was performed by injecting 20 µg CVF (Quidel) i.p. 24 h before using the mouse.

PapMV nanoparticles. PapMV nanoparticles used in this study were kindly provided by Folia Biotech Inc, and were produced as described in our previous study (C. Mathieu *et al.*, 2013). LPS contamination was always below 50 endotoxin units (EU)/mg of protein and considered as negligible.

Cell culture. B16-OVA cells were kindly provided by Dr. Richard Vile (Mayo Clinic, Rochester, MN) and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10 % fetal bovine serum and 5 mg/mL of G418 to select for OVA expression. Bone marrow derived dendritic cells were generated as described previously (Lebel *et al.*, 2014).

Virus. VSV was propagated and titrated on Vero cells. In order to evaluate immune cell activation, IFN- α production and virus recruitment to the spleen, mice were infected with 2×10^6 PFU VSV Indiana i.v. Blood samples were taken at 7, 14 and 24 h post-infection (p.i.) for the quantification of IFN- α and mice were euthanized at 24 h p.i. to evaluate immune cells activation and at 2 h p.i. for virus titration. For survival analysis, C57BL/6 and JHT mice were infected with 1×10^6 or 1×10^3 PFU VSV Indiana i.v. respectively. Mice were euthanized upon reaching an endpoint (paralysis of the back legs or convulsions).

Immunization. PapMV injections were done i.v. with 100 µg. For BMDC-OVA immunization experiments, 100 µg of PapMV or 100 µl of vehicle (Tris 10 mM) were injected i.v. 6 h before i.v. immunization with 1.25×10^6 mature BMDC-OVA or unloaded BMDC. OVA-specific CD8⁺ T cell response was analyzed at day 7 post-immunization in the spleen and the peripheral lymph nodes.

Plasmacytoid dendritic cell depletion. The hybridoma cell line producing monoclonal antibody 927, specific for the mouse bone marrow stromal antigen 2 (BST2), used for the depletion, was kindly provided by Dr Marco Colonna (Washington University school of Medicine, USA). Depletion was done as described previously (Rajagopal *et al.*, 2010). Briefly, mice were injected (i.p.) with 500 μ g of purified antibody 927 or an isotype control 24 and 48 hours before PapMV immunization. Depletion leads to a reduction of at least 60% of pDC numbers in the spleen as measured by flow cytometry.

Flow cytometry analysis and antibodies. Flow cytometry analysis of mouse surface antigens was performed with the following antibodies: anti-CD69 (H1.2F3), -CD86 (GL1), -CD11c (N418), -CD11b (M1/70), -F4/80 (BM8), -CD8 α (53-6.7), -CD19 (6D5), -CD45R/B220 (RA3-6B2), -CD317 (PDCA-1) (927), -CD44 (IM7) (BioLegend). Staining was performed for 20 min at 4°C. PE-coupled OVA-H-2Kb tetrameric complexes were generated as previously described (Altman *et al.*, 1996) and staining was performed at 37 °C for 15 min. Intra-cellular staining for IFN- γ (XMG1.2) (BioLegend) and Granzyme B (NGZB) (eBioscience) was performed after a 5 h restimulation with OVA (2 μ g/ml) in the presence of brefeldin A (10 μ g/ml) using fixation/permeabilization buffer (BioLegend), according to the manufacturer's instructions. Flow cytometry analyses were performed on a BDLSR fortessa flow cytometer (BD) and data were analyzed using the FlowJo software (Tree Star).

PapMV distribution experiment. PapMV was labeled with Alexa 647 using the Molecular Probes® Protein Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) following the manufacturers' instructions. Alexa 647-labeled PapMV was injected i.v. and mice were sacrificed two hours post-immunization for flow cytometry analysis.

Cytokine analyses. IFN- α levels in sera, lymph nodes and spleen homogenates from immunized mice were determined by ELISA following the manufacturer's instructions (PBL InterferonSource). IL-6, IP-10 and MCP-1 production was evaluated in the blood of mice 6 h after PapMV injection using a Luminex screening assay kit (R & D systems) following the manufacturers' instructions and are reported in pg/ml of serum.

Lung nodule establishment assay. Mice were injected i.v. with 100 μ l Tris 10 mM or 100 μ g PapMV 6 h before tumor inoculation with 5×10^5 B16-OVA and euthanized on day 17-post inoculation. Lungs were perfused with 5 ml PBS and conserved in Fekete's solution for nodule visualization.

Complement proteins and IgM detection by ELISA.

To evaluate the binding of complement proteins or IgM to PapMV and VSV, ELISA plate was coated with 5 µg/ml of each protein and freshly harvested serum from C57BL/6 or JHT mice was used as source of proteins. After 20 minutes incubation at 37°C the detection of the proteins was done with biotinylated anti-IgM, anti-C3, anti-C1q or anti-C4 antibodies (Cedarlane), follow by streptavidin-HRP (Southern Biotech).

PapMV ssRNA quantification by qPCR.

Spleen samples were homogenized in TRIzol (Life Technologies) using a Polytron homogenizer and total RNA was extracted following the manufacturer's recommendations. Two µg was reverse-transcribed with Superscript II using random hexamers (Life Technologies) according to the supplier's instructions. qPCR was performed with the following primers and probes. For *Gapdh*: Taqman gene expression assay ID: Mm99999915_g1. In the case of PapMV ssRNA, sequences used were as follows: (Forward) 5'-CTCACTCCGGGCTGTTATTC-3', (Probe) 5'-FAM-AGAGGCCTACAGAGACATTAAGCTCACT-MGB-3' and (Reverse) 5'-CTGCTACTGCTACTGGATGTG-3'. Each reaction was performed in triplicate using a real-time cycler ABI Prism 7500 (Life Technologies). The PapMV ssRNA copy number was determined using a standard curve established by serial dilution of pure PapMV RNA. Results were normalized on *Gapdh* expression and were presented as number of PapMV ssRNA copy by µg of total RNA.

Statistical analysis. Data were analyzed for statistical significance using Student t test. Statistical significance was determined as $p < 0.05$.

3.4 Results

The complement system is involved in PapMV recognition by immune cells. To evaluate the implication of NA and the complement system during immunization with PapMV, we first analyzed their binding on PapMV. Performing ELISA experiments with serum coming from C57BL/6 and B cell-deficient JHT mice as source of proteins, we observed that natural IgM and complement proteins bind to PapMV (Fig 1A and B). More specifically, we found a strong association between C3/C3b/iC3b/C3dg proteins and PapMV while C1q and C4/C4b/C4d only slightly bind to PapMV in comparison to their association with IgM, an initiator of complement activation (Fig. 1B). In addition, an increased level of the anaphylatoxin C3a, produced after C3

cleavage, is measured shortly after PapMV injection (Fig. 1C). Interestingly, the use of antibody deficient serum as source of complement proteins does not decrease the fixation of C3 on PapMV. In fact, the level of C3 detected on PapMV in absence of NA is significantly higher. On the contrary, consistent to what is known about the mechanism of action of C1q and C4, absence of NA greatly reduced their binding on PapMV (Fig. 1B). Altogether, these results suggest that PapMV surface activates the cleavage of C3 and consequently induces the production of C3b that associates with PapMV and C3a, that is released.

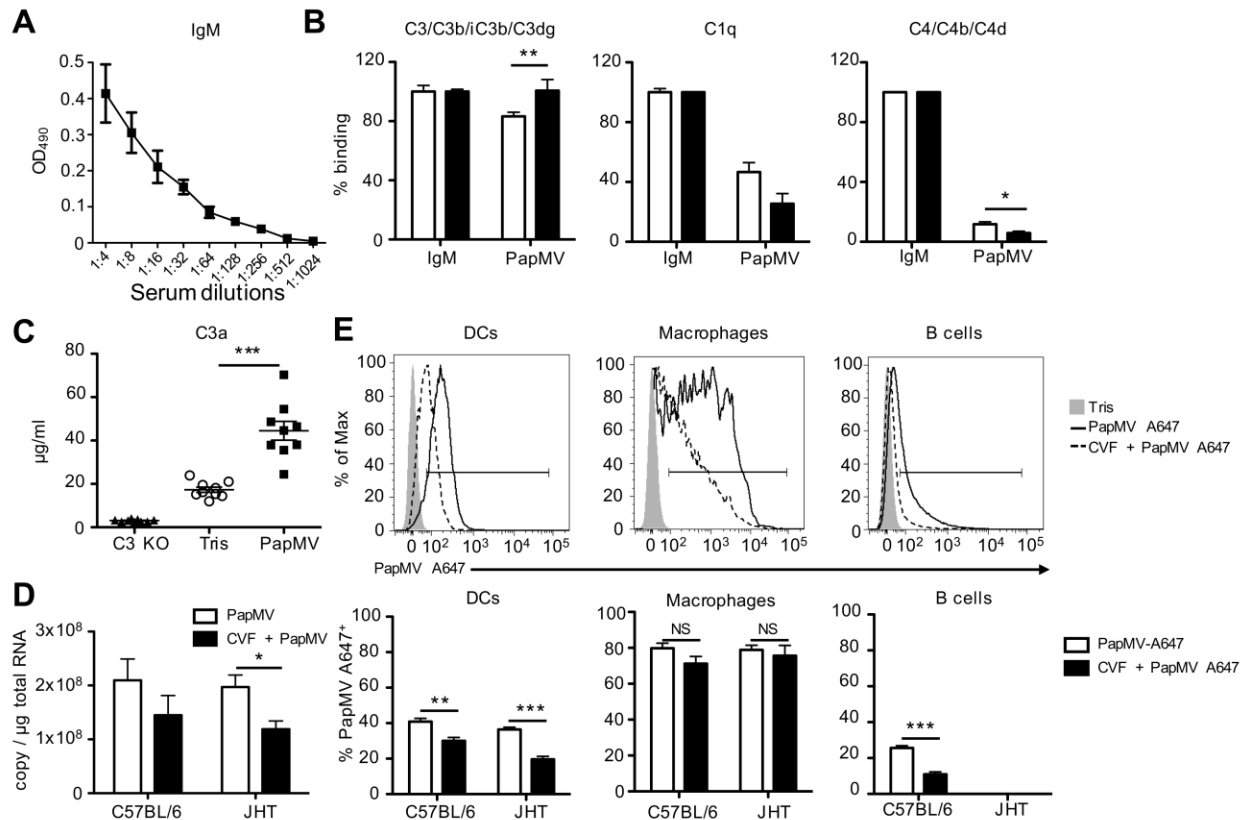


Figure 1. Complement proteins bind to PapMV and are implicated in its phagocytosis.

Evaluation by ELISA of the binding of IgM (A), C3, C1q and C4 (B) to PapMV. (C) Determination of C3a production 30 min after PapMV or Tris injection in C57BL/6 and C3 KO mice. (D) Quantification of PapMV ssRNA copy in the spleen 2 h after injection i.v. in C57BL/6 and JHT mice pre-treated (black bars) or not (white bars) with cobra venom factor (CVF). (E) (upper panels) Representative overlay histograms showing PapMV nanoparticles in DCs, macrophages and B cells after intravenous injection of PapMV-A647 in C57BL/6 mice treated (dash lines) or not (bold lines) with CVF in comparison with Tris-injected mice (filled histograms). (lower panels) Compilation of the proportion of PapMV-A647⁺ DCs, macrophages and B cells in the spleen 2 h after PapMV-A647 i.v. injection. OD: optical density. Results are shown as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS=non significant.

Then, we determine the role of NA and complement proteins on PapMV recognition by immune cells by injecting PapMV in C57BL/6 and JHT mice treated or not with CVF to inactivated the complement system. We observed that in absence of NA, there is no modification in PapMV

recruitment to the spleen (Fig 1D). However, a decrease in the amount of PapMV ssRNA in the spleen was obtained following depletion of the complement system by C566 injection, especially in the absence of NA (Fig. 1D). This effect was confirmed using a fluorescent PapMV. More specifically, the proportion of immune cells from the spleen, the blood and the lymph nodes such as dendritic cells and B lymphocytes interacting with PapMV was significantly decreased in C566-treated mice while the absence of NA has no impact. (Fig. 1E and S1A).

If we compare the results obtained for PapMV with the vesicular stomatitis virus (VSV), a ssRNA virus infecting mammals for which the involvement of NA and complement is well characterized, it is possible to note some differences. For example, the main complement components fixed on VSV are C1q and C4 and their binding are dependent on the presence of NA (Fig. S2A). In addition, VSV recruitment to the spleen is significantly reduced in absence of the complement system, NA or both (Fig. S2C). In conclusion, although the mechanisms are not completely identical to those involved in the recognition of VSV, the complement proteins and NA bind to PapMV, a plant virus, and complement depletion reduces the interaction of PapMV with immune cells.

Complement depletion increases immune cells activation and IFN- α production following PapMV immunization. Since complement depletion decreases the phagocytosis of PapMV and its recruitment to the spleen, we evaluate the impact of this deficiency on immune cells activation following PapMV immunization. Strikingly, the reduced interaction of PapMV with immune cells in absence of complement correlates with a higher immune cells activation in the spleen and the lymph nodes, while the lack of NA has no impact (Fig. 2A and B and Fig. S1B). More specifically, an increased expression of the co-stimulatory molecule CD86 on dendritic cells and the activation marker CD69 on CD8⁺ T cells and B lymphocytes is observed following PapMV immunization in complement-depleted C57BL/6 mice, while C566 injection alone does not affect their expression (Fig. 2A and B and not shown). We have previously demonstrated that activation of immune cells following immunization with PapMV is dependent on the production of IFN- α (Lebel *et al.*, 2014), so we evaluated the production of this cytokine following PapMV injection in absence of complement. Fittingly, the IFN- α production was also drastically increased in the serum, the peripheral lymph nodes and the spleen in absence of complement (Fig. 2C), whereas C566 injection alone does not induce IFN- α production (not shown). In addition, the secretion of cytokines and chemokines produced in response to IFN- α in the context of PapMV immunization, such as IL-6, IP-10 and MCP-1 were significantly higher in

CVF-treated mice (Fig. 2D). Finally, in absence of complement, the IFN- α production is still dependent on MYD88, TLR7 and pDCs, but not on NA (Fig 2E).

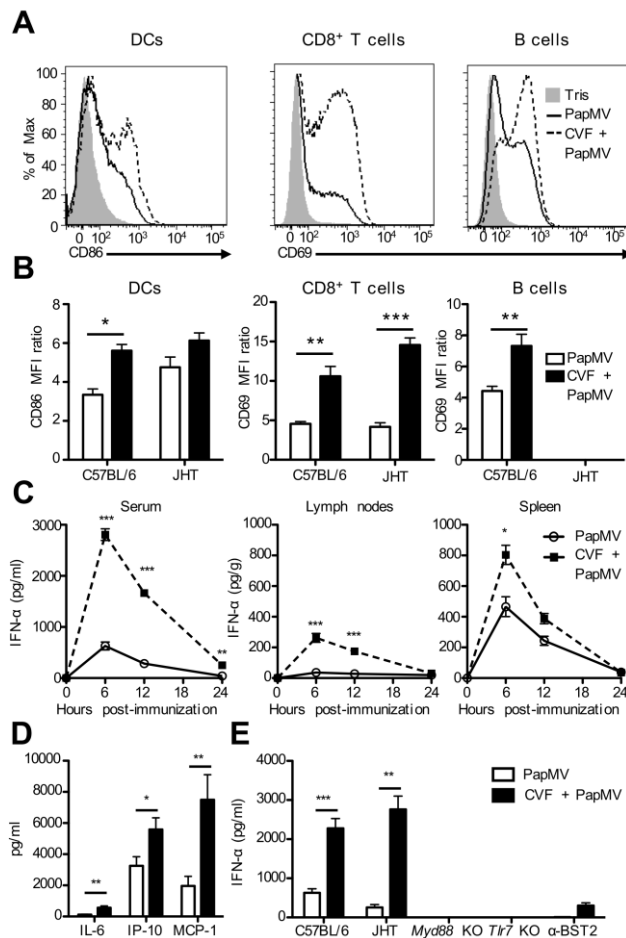


Figure 2. Complement depletion increases immune cells activation and IFN- α production following PapMV immunization.

(A) Representative overlay histograms of CD86 and CD69 expression on splenic DCs, CD8⁺ T cells and B cells 24 h after PapMV injection i.v. in C57BL/6 mice treated (dash lines) or not (bold lines) with CVF in comparison with Tris-treated mice (filled histograms). (B) Compilation of CD86 expression on splenic DCs and CD69 expression on splenic CD8⁺ T cells and B cells 24 h after PapMV immunization in C57BL/6 or JHT mice pre-injected (black bars) or not (white bars) with CVF. Results are presented as a ratio of the mean fluorescence intensity (MFI) of the analyzed sample on the MFI of the Tris sample. (C) ELISA quantification of IFN- α production in the serum, peripheral lymph nodes and spleen homogenates of C57BL/6 mice immunized with PapMV. (D) Evaluation by luminex of serum IL-6, IP-10 and MCP-1 concentration 6 h post PapMV immunization in C57BL/6 mice pre-treated (black bars) or not (white bars) with CVF. (E) Serum IFN- α production 6 h post PapMV immunization. Results are shown as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

In the case of VSV, the reduced recruitment of the virus in the spleen in absence of NA correlates with a decreased expression of CD86 on DC and CD69 on CD8⁺ T cells and a lower IFN- α production (Fig. S2D and S2E). However, absence of complement does not modify the expression of these activation markers but increases the IFN- α secretion. To summarized,

although NA have different impact on VSV infection and PapMV immunization, in both cases CVF administration enhances the production of IFN- α .

Complement inactivation increases the immunomodulatory properties of PapMV.

Considering that the immunomodulatory properties of PapMV are greatly dependent on the production of IFN- α , we evaluate the impact of the complement inactivation on the adjuvant/immunotherapeutic effect of PapMV. We first assess the effector CD8⁺ T cell response following BMDC immunization. We already knew that the use of PapMV as adjuvant for BMDC-OVA immunization increases the proportion of OVA-specific CD8⁺ T cells. In the present experiment, we demonstrated that although administration of CVF alone does not modify de generation of OVA-specific effector CD8⁺ T cells by itself, injection of PapMV in complement-depleted mice significantly enhances the proportion of OVA-specific CD8⁺ T cells in the spleen and the lymph nodes, at day 7 post-immunization, in comparison to PapMV injection in untreated mice (Fig. 3A). In addition, a greater proportion of CD8⁺ T cells producing effector molecules such as IFN- γ and granzyme B was obtained by combining CVF and PapMV treatment in conjunction to BMDC-OVA immunization as compared to PapMV treatment alone. Importantly, the higher IFN- α production and immune cell activation following PapMV immunization in complement-depleted mice also results in a better protection against B16-OVA melanoma cells implantation in the lung (Fig. 3B). Effectively, whereas injection of PapMV 6 h before tumor cells inoculation drastically reduced B16 nodule formation in the lung, perform this experiment in CVF-treated mice result in almost no tumor cells implantation.

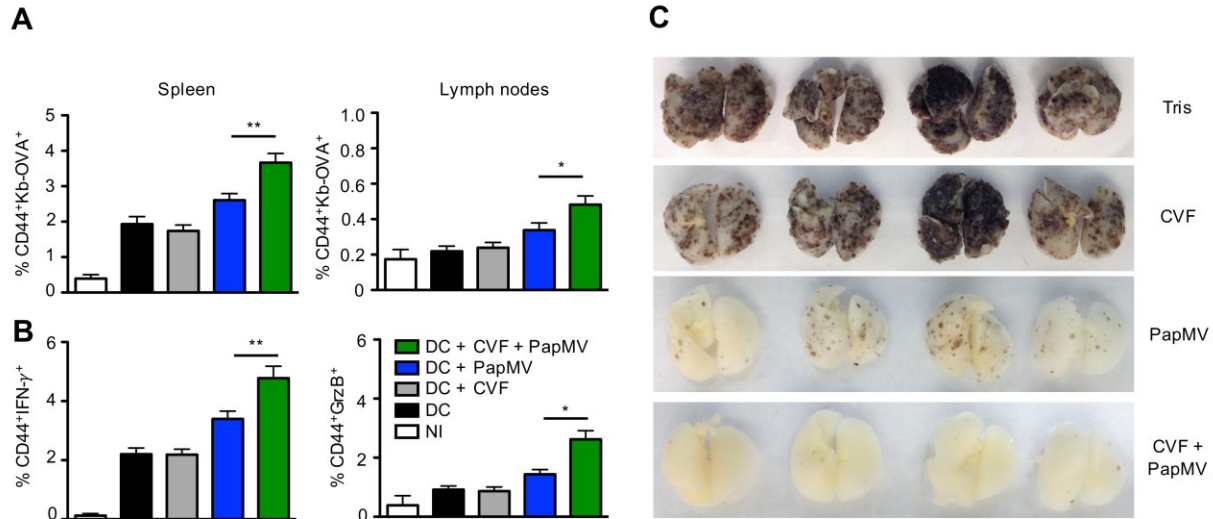


Figure 3. Complement inactivation increases the immunomodulatory properties of PapMV.

(A) Compilation of the proportion of OVA-specific CD8⁺ T cells in the spleen (left panel) and the peripheral lymph nodes (right panel) 7 days after BMDC-OVA immunization. (B) Proportion of IFN- γ (left panel) and granzyme B (GrzB) (right panel) producing CD8⁺ T cells in the spleen 7 days after BMDC-OVA immunization. (C) Pictures of lungs 17 days after B16-OVA injection i.v. Figure A and B were gated on CD8⁺ T cells. Results are shown as the mean \pm SEM *p < 0.05, **p < 0.01

In the case of VSV, the increased IFN- α production in C57BL/6 treated with CVF has no impact on mice survival (Fig. S1F). However, when there is no natural antibody, a higher IFN- α level correlates with a superior survival.

Absence of the complement component 3 is responsible for the increased IFN- α production and immune cell activation following PapMV immunization. CVF administration induces several effects including the depletion of C3 and C5, and the production of anaphylatoxins. In our experiments, we observed that the increased IFN- α production following PapMV injection in CVF-treated mice seems to be inversely correlated with the amount of C3 present in mice serum (Fig. 4A). Thus, in order to confirm the implication of C3 for IFN- α production we immunized C3 KO mice. Fittingly, immunization of these mice with PapMV results in superior IFN- α production and higher expression of CD86 on DC and CD69 on CD8⁺ T cells in comparison to wild type C57BL/6 mice (Fig. 4B and C). In addition, CVF administration in C3 KO mice has no impact on immune cell activation and IFN- α production (Fig. 4B and C). and C3 KO mice does not produce this cytokine at steady state (not shown). Finally, although C3 depletion increases the production of IFN- α after TLR7 activation by PapMV or VSV, the secretion of this cytokine was not affected after TLR3 activation by poly(I:C) (Fig.4D).

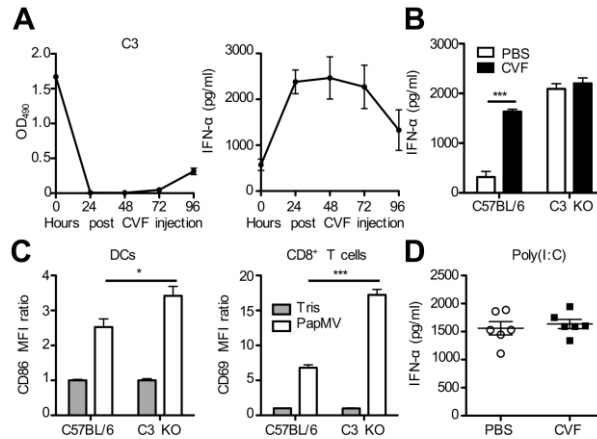


Figure 4: Absence of the complement component 3 is responsible for the increased IFN- α production and immune cell activation observed after CVF injection.

(A) Kinetic of C3 depletion following CVF injection (left panel) and IFN- α production using different time between CVF and PapMV injection (right panel). (B) ELISA quantification of IFN- α production in the serum of C57BL/6 or C3 KO mice injected (black bars) or not (white bars) with CVF, 6 h post PapMV immunization. (C) Compilation of CD86 and CD69 expression on splenic DCs and CD8⁺ T cells respectively 24 h after Tris (grey bars) or PapMV (white bars) injection in C57BL/6 and C3 KO mice. (D) Serum IFN- α production following poly(I:C) immunization in C57BL/6 mice pretreated with PBS or CVF. Results are shown as the mean \pm SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

3.5 Discussion

It has been known for several years that NA and the complement system are implicated in the control of microorganisms infecting mammals and the development of the adaptive immune response (Carroll, 2004, Stoermer *et al.*, 2011). In this study, we further characterized how these elements of the innate immune system impact on immunization with an engineered nanoparticle derived from a plant virus, PapMV, in comparison with VSV, a mammalian virus for which the importance of NA and the complement system is well described. First of all, we discovered that natural IgM and the complement proteins C1q, C4 and C3 bind to PapMV. In addition, we demonstrated that although NA are required for C1q and C4 association to PapMV their absence does not decrease C3 binding to this plant virus. In fact, C3 proteins were detected in a higher level on PapMV in absence of antibody. These results suggest that C3 activation leads to direct C3b fixation on PapMV and deficiency in NA releases space, now available for more C3b binding. Furthermore, a higher level of the anaphylatoxin C3a, produced after C3 cleavage, was found in the serum of mice immunized with PapMV thus confirming the activation of the complement system by the alternative pathway. In the case of VSV, the classical pathway of the complement system was already demonstrated to be implicated in the recognition and the control of this virus (Beebe *et al.*, 1981, Ochsenbein *et al.*, 1999a, Ochsenbein *et al.*, 1999b). In

the first step of this process, NA bind to VSV, C1q is then recruited and activates C1r and C1s thereby cleaving C4 and allowing C4b attachment to the virus. Consistent with these findings, we observed that C3 does not bind directly to VSV while C1q and C4 molecules interact with this virus when NA are present.

Since NA and complement proteins are involved in opsonization and phagocytosis of microorganisms, we subsequently determined the impact of NA deficiency and complement depletion on the recruitment of these viruses to the spleen. Although the absence of NA has no impact on PapMV recruitment to the spleen, this deficiency greatly reduces the presence of VSV in this lymphoid organ. Phagocytes have Fc receptors that allow them to bind antibodies attached to microorganisms, thus leading to their phagocytosis (Daeron, 1997, Uher *et al.*, 1981). The results we obtained suggest that this process is very important for the recognition of VSV, but not for PapMV. Phagocytic cells also have surface receptors that bind to C1q, C4b and C3b, thus promoting uptake and destruction of virus covered with these components (Blue *et al.*, 2004). Accordingly, complement depletion reduces PapMV interaction with immune cells and VSV translocation to the spleen. Moreover, we noticed that complement depletion in JHT mice results in a greater abrogation of VSV recruitment in comparison to undepleted JHT mice or complement depleted WT mice, showing the collaboration between these two components of the innate immune system in VSV control. However, PapMV uptake by immune cells seems to be only dependent on C3b. To our knowledge, this is the first demonstration of the implication of the complement system in the recognition of a plant virus by the mammalian immune system.

VSV and PapMV are two ssRNA virus, but they differ on some points. For example, VSV is surrounded by an envelope while this is not the case for PapMV. This difference could have a significant impact on the interaction of these virus with immune cells. Firstly, enveloped viruses, like VSV, can incorporate host cell membrane proteins, such as the complement regulators CD46, CD55 and CD59, during the budding process, thus limiting virus neutralization by the complement system (J. B. Johnson *et al.*, 2012, Schaubert-Plewa *et al.*, 2005, Vanderplasschen *et al.*, 1998). However, activation of the complement system on enveloped virus can lead to membrane attack complex (MAC) formation and virus lysis (Blue *et al.*, 2004). PapMV has no envelope and therefore there is nothing that prevents binding of C3b to its surface but MAC incorporation and thus virus destruction is not possible. In addition, VSV is an infectious virus whereas PapMV is a non-replicative particle. Consequently, while the action of NA and complement can neutralize VSV and potentially limit its ability to activate the immune system, for PapMV it will favor its phagocytosis, which may be beneficial in order to activate as many cells

as possible. In accordance to virus recruitment to the spleen, activation of immune cells following VSV infection in JHT mice was lower than in immunocompetent C57BL/6 mice. Surprisingly, complement depletion does not reduce immune cell activation following VSV infection and even increases it in PapMV immunized mice. In fact, we discovered that complement depleted mice produced higher amount of IFN- α after TLR7 activation by VSV or PapMV. In the case of VSV, the higher level of IFN- α probably compensate for the lower amount of virus, thus resulting in similar CD86 and CD69 expression on innate and adaptive immune cells. It is tempting to speculate that for this virus, the amount of infectious particles and the level of IFN- α are therefore responsible for immune cell activation. Then, if we look at mice survival in C57BL/6 mice, a similar phenomenon is observed. More precisely, since the complement is important for the control of the virus, depletion of the complement probably reduces the capacity of mice to control the virus. However, since this virus is very sensitive to the effect of type I interferon, it is possible that a higher IFN- α production compensates and results in similar mice survival. When JHT mice are infected with VSV, the absence of NA causes a loss of control of the virus. However, since the complement depends on antibodies to have an effect on VSV infection (Beebe *et al.*, 1981), complement depletion in JHT mice will not further harm the control of the virus, but will induce a stronger IFN- α production which will increase the survival of mice.

On the other hand, the immunomodulatory properties of PapMV are strictly dependent on type I interferon production. As a result, PapMV injection in complement-depleted mice leads to greater activation of immune cells and provides an increased adjuvant effect during an immunization and a superior immunomodulatory effect in context of metastasis prevention. Type I interferon is known to increase MHC-I expression on tumor and immune cells, cross-presentation by APCs and T cell response (Durand *et al.*, 2006, Gallucci *et al.*, 1999, Le Bon *et al.*, 2006) so it is logical that a higher IFN- α production in the context of vaccination and cancer immunotherapy provides superior benefits.

We previously demonstrated that IFN- α production following PapMV injection was performed by pDC after TLR7 and MYD88 activation by PapMV's ssRNA (Lebel *et al.*, 2016, Lebel *et al.*, 2014). In the present study, we observed that IFN- α production in CVF-treated mice immunized with PapMV is still dependant on TLR7, MYD88 and pDC, suggesting that complement inactivation does not modified how PapMV interacts with immune cells. Thus, the increased IFN- α production obtained in CVF-treated mice is not achieved through a modification in PRR or immune cells activation.

Complement depletion using CVF could result in many consequences such as C3 and C5 depletion as well as anaphylatoxins production that could have an impact on cytokine production following TLR activation (Kock *et al.*, 2004, W. C. Song, 2012). Interestingly, we notice that the level of IFN- α after PapMV immunization in CVF-treated mice appeared to be inversely correlated with the amount of C3 in the blood. Correspondingly, injection of PapMV in C3 KO mice recapitulates the effect obtained with CVF. In addition, CVF injection in C3 KO mice has no impact on IFN- α production, indicating a direct effect of C3 or its derivatives in the control of IFN- α production by pDC and no implication of C5 cleavage or CVF in itself. Finally, we demonstrated that C3 depletion does not modify IFN- α production after poly(I:C) injection, indicating that the repercussion of the complement system on TLR-induced cytokine does not affect TRIF-associated TLR.

Crosstalk between the complement system and TLR were highlighted last fifteen years (Hajishengallis *et al.*, 2010, Wittmann *et al.*, 1999). Both can influence each other and have synergistic or antagonist effects in order to regulate inflammatory responses. However, these interactions, which vary depending on cell type, TLR ligand or cytokine studied, are very complex and not yet fully understood. In most of the case, the anaphylatoxins C5a and C3a were reported to be responsible for the impact of the complement system on the response to MYD88 dependant TLR activation, mainly through MAPK phosphorylation (Holst *et al.*, 2012, W. C. Song, 2012). They can either increase or inhibit TLR-induced cytokines (Hawlich *et al.*, 2005, Okazaki *et al.*, 2011, Wittmann *et al.*, 1999, X. Zhang *et al.*, 2007). Nevertheless, other complement proteins, such as C1q, C3b and iC3b, also impact on TLR responses. For example, these proteins were reported to induce PI3K and ERK1/2 signaling, thus suppressing transcription factors IRF1 and IRF8 required for IL-12 production in APC (Hajishengallis *et al.*, 2007, Waggoner *et al.*, 2007). Thus, we could hypothesize that complement proteins such as C3b, iC3b or C3a also suppressed the transcription factor IRF7 in pDC. Then, in the absence of C3 (C3 Ko mice or CVF-treated mice), PapMV will not be opsonized by C3b/iC3b and no C3a will be produced, thus removing the inhibition induced by these proteins and allow for a greater production of IFN- α .

In conclusion, in this study we decipher for the first time the role of NA and the complement system in the recognition and the phagocytosis of a plant virus. More importantly, we discover an unexpected link between C3 and the innate immune response to TLR7 agonists. Since many promising adjuvants and immunotherapy treatments rely on the production of IFN-I following

TLR7 activation, it would be interesting to play on C3 effect on pDC in order to increase the IFN- α production and therefore to enhance their efficacy.

Source of support:

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to A. L. and D. L. (MOP89833). A. L. holds the Jeanne et J.-Louis Lévesque Chair in Immunovirology from the J.-Louis Levesque Foundation. M-È. L. acknowledges studentship support from the Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS).

Abbreviations: PapMV, papaya mosaic virus nanoparticle; BMDC, bone marrow-derived dendritic cells; CP, coat protein; VLP, virus-like particles; WT wild type.

Correspondence address:

Alain Lamarre,

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boulevard des Prairies,

Laval, Quebec, Canada, H7V 1B7

3.6 Supplementary figures

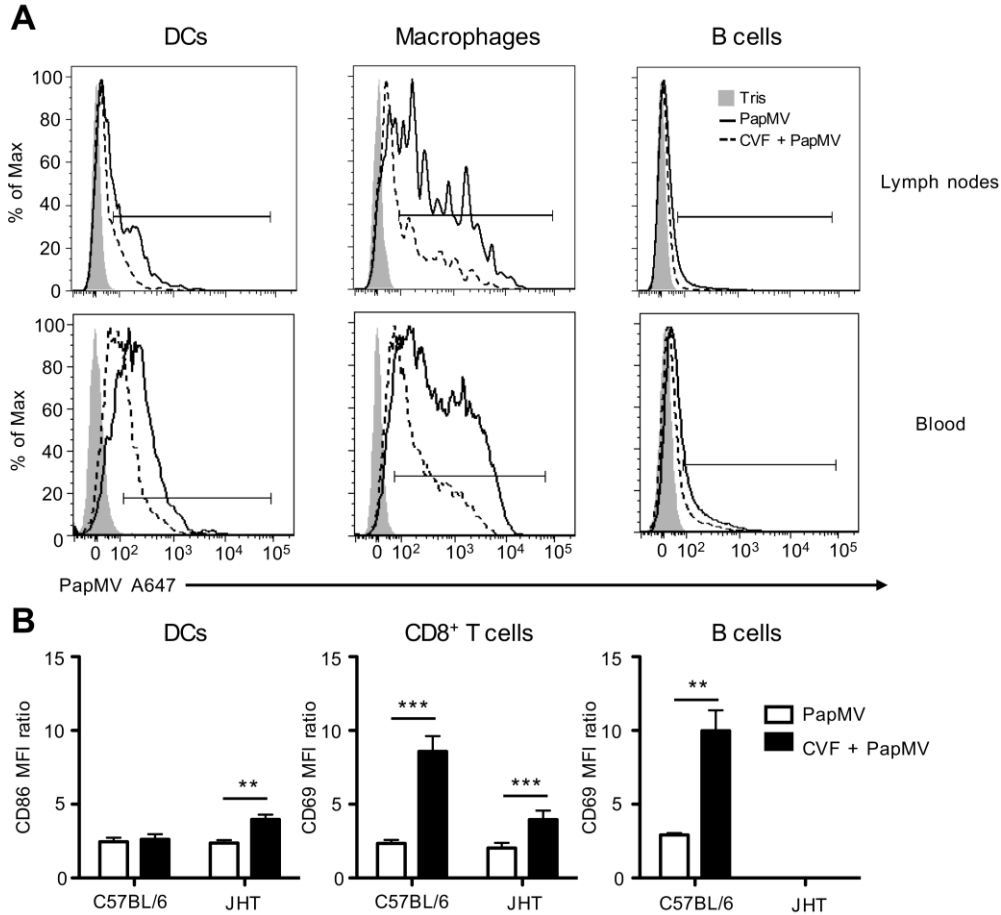


Figure S1.

(A) Representative overlay histograms showing PapMV nanoparticles in DCs, macrophages and B cells from the peripheral lymph nodes (upper panels) and the blood (lower panels) after intravenous injection of PapMV-A647 in C57BL/6 mice pre-treated (dash lines) or not (bold lines) with CVF in comparison with naïve mice (filled histograms). (B) Compilation of CD86 and CD69 expression on DCs, CD8⁺ T cells and B cells from the peripheral lymph nodes 24 h after PapMV immunization in C57BL/6 or JHT mice injected (black bars) or not (white bars) with CVF. Results are presented as a ratio of the mean fluorescence intensity (MFI) of the analyzed sample on the MFI of the Tris sample. Results are shown as the mean ± SEM. **p < 0.01, ***p < 0.001.

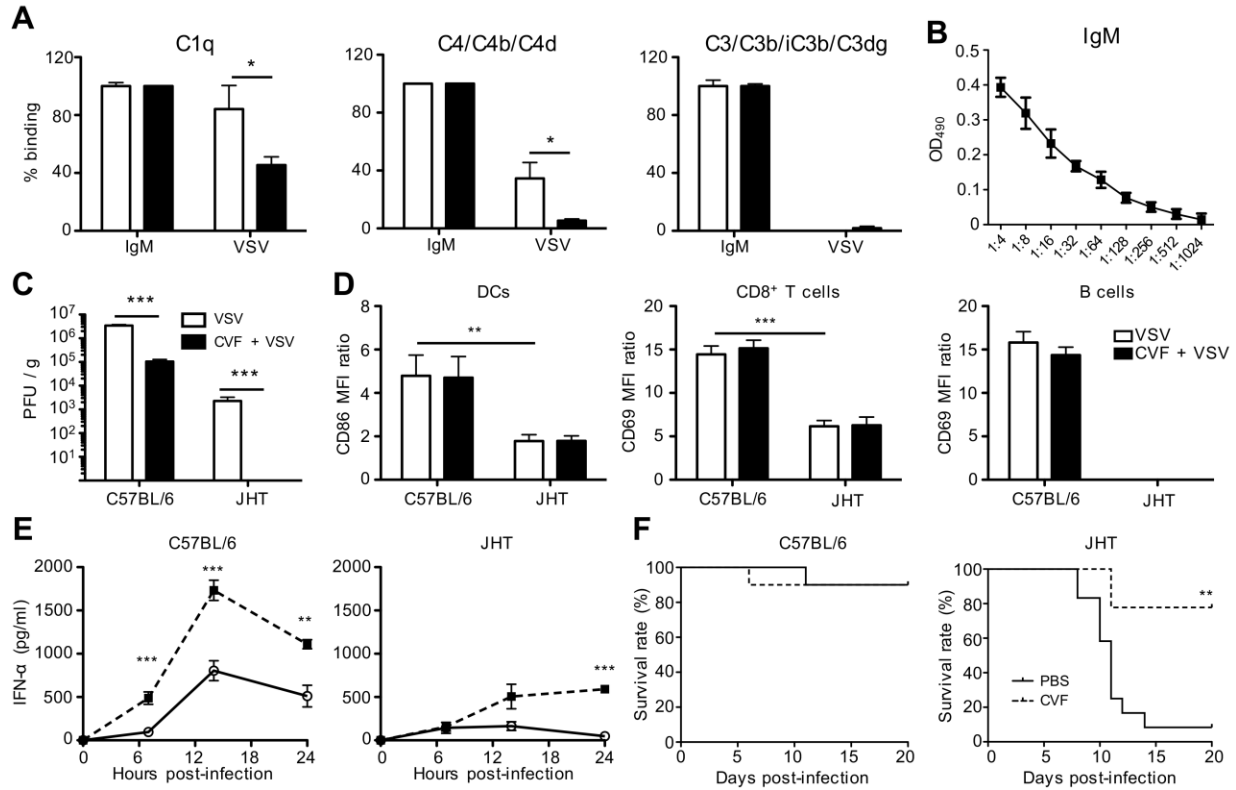


Figure S2.

Evaluation by ELISA of the binding of C1q, C4, C3 (**A**) and IgM (**B**) to VSV. (**C**) Quantification of VSV titer in the spleen 2 h after injection i.v. in C57BL/6 and JHT mice injected (black bars) or not (white bars) with cobra venom factor (CVF). (**D**) Compilation of CD86 and CD69 expression on splenic DCs, CD8⁺ T cells and B cells 24 h after VSV infection of C57BL/6 or JHT mice injected (black bars) or not (white bars) with CVF. Results are presented as a ratio of the mean fluorescence intensity (MFI) of the analyzed sample on the MFI of the Tris sample. (**E**) ELISA quantification of IFN- α production in the serum of C57BL/6 (left panel) or JHT (right panel) mice treated (dash lines) or not (continuous lines) with CVF and infected with VSV. (**F**) Survival rate of C57BL/6 (left panel) of JHT (right panel) mice treated (dash lines) or not (continuous lines) with CVF and infected with VSV. Results are shown as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

CHAPITRE 3 : DISCUSSION

1. LE MÉCANISME D'ACTION DE PPMV ET SA CAPACITÉ À AMÉLIORER L'EFFICACITÉ D'UN VACCIN À MÉDIATION CELLULAIRE

Bien que des adjuvants soient ajoutés dans les vaccins depuis plus de 80 ans, ce n'est que depuis tout récemment que leurs mécanismes d'action sont étudiés. De plus, alors que le but de la majorité des vaccins est d'induire la production d'anticorps spécifiques pouvant neutraliser les agents pathogènes, le développement de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques fonctionnels s'est révélé nécessaire au contrôle de certaines maladies infectieuses et du cancer. Ainsi, les recherches visant à développer de nouveaux adjuvants et à identifier les éléments requis pour favoriser le développement d'une réponse immunitaire cellulaire en contexte de vaccination se sont intensifiées ces dernières années.

Nous avons démontré précédemment que le PPMV, une nanoparticule dérivée d'un virus de plante, est un adjuvant efficace pour augmenter la production d'anticorps par un mécanisme qui n'était pas encore élucidé. Dans cette thèse, nous avons découvert, grâce à l'utilisation de souris déficientes en différents éléments nécessaires à la réponse aux PAMPs, que l'ARNsb synthétique du PPMV est l'élément clé de son pouvoir immunomodulateur sans toutefois être suffisant à lui seul. En effet, l'ARNsb de PPMV est détecté par le TLR7, puis la signalisation à l'aide de la molécule adaptatrice MYD88 et du facteur de transcription IRF7 mène à la production d'IFN- α , alors que les protéines de la capsid à elles seuls n'ont aucun effet immunomodulateur (figure 7). Cependant, l'assemblage en VLP des protéines de la capsid du virus autour de l'ARNsb est nécessaire au pouvoir adjuvant de PPMV. Cela s'explique probablement par le fait que les protéines de la capsid du virus protègent l'ARNsb de la dégradation par les nucléases. En outre, l'assemblage en VLP favorise une phagocytose ciblée du PPMV par les CPA, ce qui limite les effets indésirables d'une entrée non spécifique dans les cellules. À l'opposé, les ligands synthétiques des TLR endosomaux comme le R837, le poly(I:C) et les CpG ODN lorsqu'utilisés sous leurs formes natives, sont rapidement dégradés par les nucléases suite à leur injection *in vivo* (Nordlund *et al.*, 1970). Il faut donc en administrer de grandes quantités pour avoir un effet, mais comme ces ligands peuvent entrer de façon non spécifique dans les cellules, cela résulte en une toxicité importante (Engel *et al.*, 2011). Ainsi, le R837 est seulement autorisé pour une utilisation topique et les autres ligands sont présentement à l'étude en combinaison avec des adjuvants de type système de livraison afin de les protéger

et de favoriser leur phagocytose par les CPA (de Titta *et al.*, 2013, Hafner *et al.*, 2013, Hafner *et al.*, 2011).

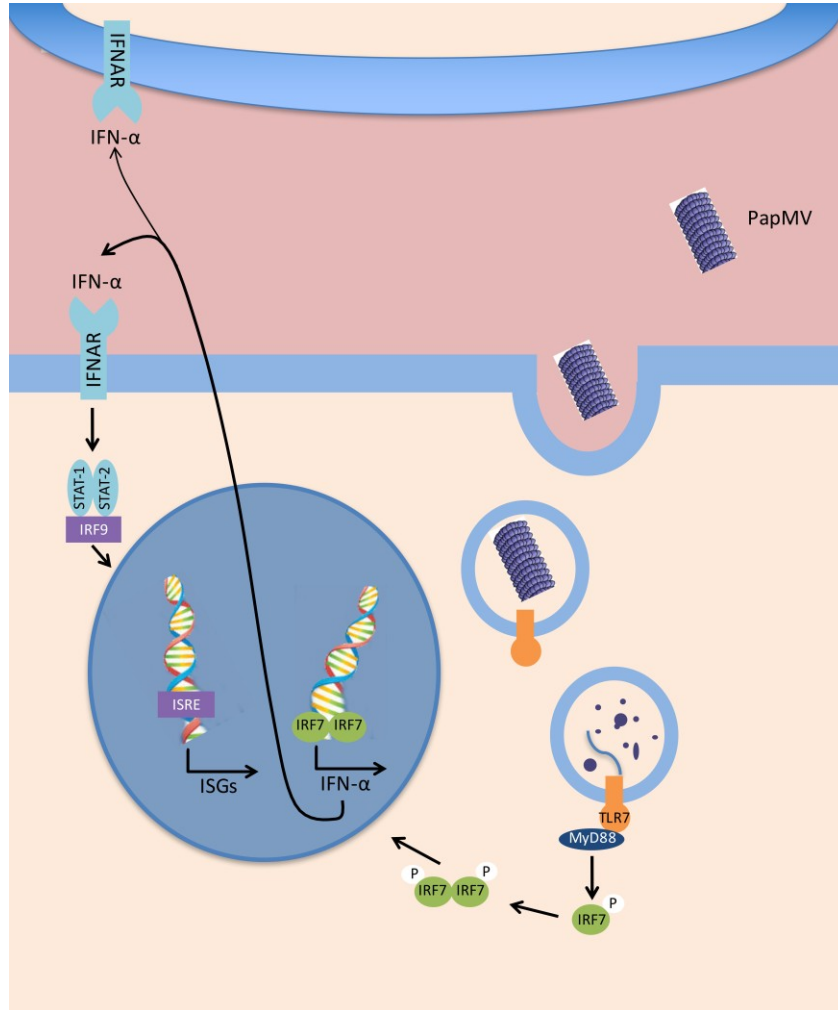


Figure 7. Mécanisme d'action du PapMV.

Lorsque le PapMV est injecté aux souris par la voie intraveineuse, il est phagocyté par les CPA dont les pDC. Suite à sa phagocytose, le PapMV est dégradé ce qui permet à son ARNs de d'activer le TLR7. La détection de cet acide nucléique par le TLR7 mène à une cascade d'activation qui résulte en la phosphorylation et la dimérisation d'IRF7 qui migre au noyau pour engendrer la production d'IFN- α . L'IFN- α est ensuite détecté par son récepteur (au niveau autocrine et paracrine) et résulte en la transcription de gènes stimulés par l'interféron (ISG, *interferon stimulated gene*)

La production d'IFN- α par les pDC induite par l'injection du PapMV engendre subséquemment une augmentation de l'expression des molécules de présentation et de co-stimulation au niveau de plusieurs populations de cellules immunitaires qui est dépendante de la présence du récepteur pour l'IFN-I. D'ailleurs, l'équipe du Dr Polly Matzinger a démontré précédemment que l'IFN- α est un signal danger qui active des DC (Gallucci *et al.*, 1999). Tel que décrit dans les

sections 2.3 et 2.4, l'IFN- α est aussi reconnu pour augmenter la présentation croisée par les DC, en plus d'être important pour le développement de la réponse T CD8⁺ (Le Bon *et al.*, 2006, Le Bon *et al.*, 2003). Cette dernière propriété nous a incité à évaluer la capacité de PapMV à augmenter la réponse immunitaire cellulaire. Pour ce faire, nous avons utilisé l'immunisation à l'aide de BMDC, une méthode de vaccination reconnue pour engendrer le développement de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques aux antigènes chargés sur les BMDC. Lorsque le PapMV est injecté 6 h avant les BMDC chargées avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ cela permet d'obtenir un niveau élevé d'IFN- α dans le sérum et les organes des souris au moment de l'injection des BMDC et résulte en une augmentation de la quantité de lymphocytes T CD8⁺ effecteurs et mémoires spécifiques à OVA. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce résultat. D'une part, l'administration de PapMV engendre une augmentation de l'expression de CCR7 et CD62L sur les BMDC transférées (annexe I). Le CCR7 est un récepteur de chimiokine qui contrôle la migration des cellules immunitaires dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) tels que la rate et les ganglions, alors que CD62L est une molécule d'adhésion qui permet aux cellules immunitaires de rester dans les OLS (Forster *et al.*, 1999, von Andrian *et al.*, 2003). Ainsi, cela suggère que les BMDC transférées dans les souris ayant reçu le PapMV pourraient avoir une meilleure capacité à migrer et à rester dans les OLS ce qui augmenterait leur chance d'interagir avec les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au peptide présenté sur leur CMH-I. Il serait intéressant dans des expériences futures d'évaluer la migration des BMDC transférées dans les OLS ainsi que leur interaction avec les lymphocytes T CD8⁺ afin de valider que le PapMV affecte cet aspect de la réponse immunitaire. En outre, une augmentation de l'expression des molécules nécessaires pour donner les signaux I et II aux lymphocytes T, soit la molécule de présentation CMH-I ainsi que les molécules de co-stimulation CD86 et CD80 est aussi observée chez les souris ayant reçu le PapMV (annexe I). Les BMDC transférées dans les souris pré-traitées avec le PapMV ont aussi une expression plus forte de CD70. Tel que décrit dans la section 2.4, l'interaction entre le CD70, exprimé sur les APC en réponse à l'aide CD4⁺, avec le CD27, présent à la surface des lymphocytes T CD8⁺, est cruciale pour la fonctionnalité de la réponse secondaire (Taraban *et al.*, 2004, Van Deusen *et al.*, 2010). Dans le modèle d'immunisation avec les BMDC, puisque les DC transférées présentent seulement un peptide CD8⁺, les cellules transférées proviennent de souris mâles et sont injectées dans des souris femelles afin d'avoir une aide CD4⁺. Étant donné que le PapMV augmente l'expression du CD70 sur les BMDC transférées et que des ligands de TLR sont déjà connus comme étant suffisants pour substituer l'aide CD4⁺ nécessaire à la fonctionnalité de la réponse secondaire (Bullock *et al.*, 2005), il serait intéressant d'effectuer une immunisation avec des BMDC de souris femelles afin d'évaluer si

l'administration du PapMV peut complètement remplacer l'aide CD4⁺ dans ce modèle d'immunisation. Enfin, puisque l'IFN- α peut agir directement au niveau des lymphocytes T CD8⁺, il est aussi possible que ce phénomène soit en partie responsable de l'augmentation du nombre de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à OVA lors de l'ajout du PapMV à l'immunisation BMDC-OVA.

Par la suite, en réalisant les immunisations dans des souris TLR7 KO, nous avons confirmé que l'activation du TLR7 par l'ARNsb du PapMV et probablement la production subséquente d'IFN- α sont nécessaires à l'effet adjuvant du PapMV dans cette situation. De plus, nous avons observé que lorsque les immunisations étaient effectuées dans des souris déficientes en récepteur de l'IFN-I, PapMV augmente toujours la quantité de lymphocytes T CD8⁺ effecteurs spécifiques à OVA, mais plus faiblement que dans les souris sauvages C57BL/6. Comme le PapMV induit la production d'IFN- α dans les souris IFNAR KO, mais que seules les BMDC transférées peuvent y répondre, cela suggère que l'IFN- α a un effet direct sur les DC transférées, mais aussi sur d'autres cellules immunitaires, potentiellement les lymphocytes T CD8⁺. L'absence d'effet adjuvant en transférant des DC IFNAR KO dans des souris IFNAR KO pourrait appuyer cette hypothèse. D'ailleurs, l'IFN- α est important pour la survie et les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8⁺ entre autres en augmentant l'expression du récepteur de l'IL-2 sur ces cellules. Ainsi, la présence d'inflammation permet d'augmenter la quantité de lymphocytes T CD8⁺ générés, mais augmente aussi la proportion de ces cellules qui ont un phénotype de SLEC, ce qui peut être néfaste dans certains contextes (Badovinac *et al.*, 2005, Cui *et al.*, 2009, Joshi *et al.*, 2007). Dans notre situation, nous avons effectivement observé une augmentation de la proportion de SLEC chez les souris traitées avec le PapMV. Malgré cela, la quantité de lymphocytes T CD8⁺ mémoires reste supérieure en présence de l'adjuvant et l'immunisation avec la combinaison BMDC-OVA + PapMV permet d'avoir une meilleure protection contre une infection par *Listeria monocytogenes*, confirmant l'efficacité de PapMV comme adjuvant pour améliorer la réponse T CD8⁺ (figure 8).

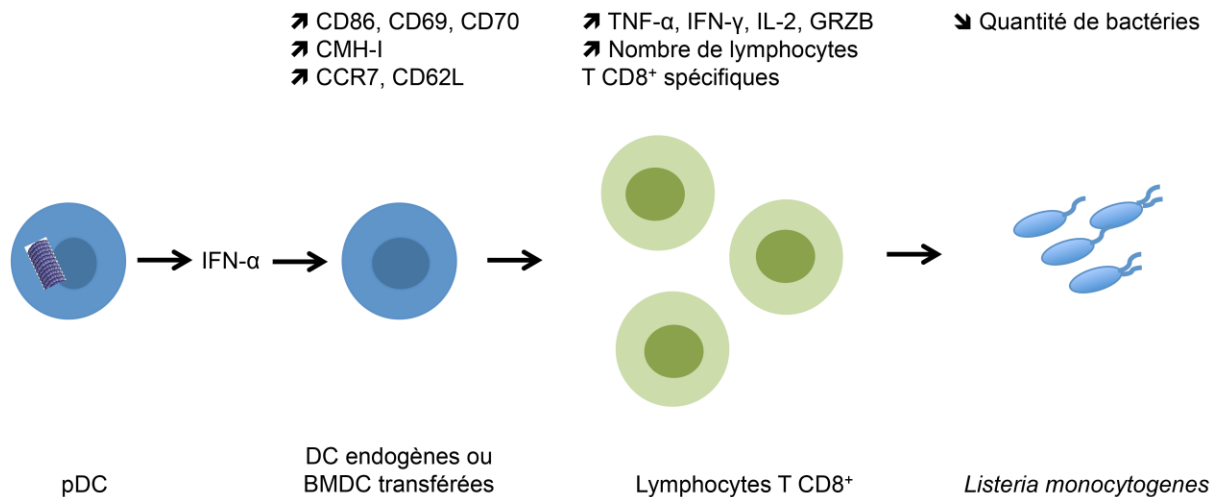


Figure 8. PapMV est un adjuvant efficace pour augmenter la réponse T CD8⁺

L'injection i.v. du PapMV aux souris, induit la production d'IFN- α par les pDC, ce qui mène à une activation des cellules immunitaires. Les DC expriment plus fortement les molécules d'activation et de co-stimulation CD86, CD69 et CD70, la molécule de CMH de classe I, ainsi que des molécules impliquées dans la migration telles que CCR7 et CD62L. Cela permet d'améliorer la présentation antigénique aux lymphocytes T CD8⁺ et d'augmenter le nombre de lymphocytes T CD8⁺ effecteurs et mémoires spécifiques et résulte en un meilleur contrôle d'une infection expérimentale par *Listeria monocytogenes*.

Ainsi, nous avons démontré dans ces expériences que le PapMV améliore plusieurs aspects importants pour le développement d'une réponse T CD8⁺ fonctionnelle. Dans le but de potentialiser encore plus son effet adjuvant, différents éléments pourraient être étudiés. D'une part, puisqu'il a été démontré précédemment que la stimulation de plusieurs TLR avait un effet synergique tant pour augmenter la réponse immunitaire humorale que cellulaire (Kastenmuller *et al.*, 2011, Kasturi *et al.*, 2011), il serait intéressant de générer des molécules de PapMV contenant différents PAMPS et de les combiner afin d'activer plusieurs voies en même temps. Une des possibilités serait d'insérer différents types d'acide nucléique, mais une étude approfondit de l'interaction entre les différents TLR serait nécessaire puisque dans certains cas, l'activation de deux PRR peut avoir un effet antagoniste au lieu d'avoir un effet synergique (Kotaki *et al.*, 2015). D'autre part, étant donné que les anticorps peuvent parfois limiter l'efficacité des vecteurs viraux utilisés pour la vaccination (Fitzgerald *et al.*, 2003, Lindsay *et al.*, 2010, Zak *et al.*, 2012), il serait important de caractériser l'effet des anticorps anti-PapMV développés suite à une première immunisation, selon les voies d'injection utilisées, afin de déterminer si les injections multiples de PapMV sont possibles. Comme le PapMV ne se réplique pas, la présence d'anticorps spécifiques ne va pas le neutraliser, mais possiblement faciliter sa phagocytose par les CPA, ce qui pourrait potentiellement augmenter sa reconnaissance et l'activation des cellules immunitaires. D'un autre côté, l'opsonisation du

PapMV par les anticorps pourrait aussi modifier son tropisme, par exemple en augmentant sa phagocytose par les macrophages, mais en diminuant celle effectuée par les pDC, ce qui pourrait réduire la production d'IFN- α , cruciale à son pouvoir immunomodulateur. Il s'agit donc d'un aspect à ne pas négliger.

En résumé, les recherches effectuées sur le développement de la réponse T CD8⁺ en contexte de vaccination ont permis d'identifier plusieurs des éléments importants pour le développement d'un vaccin à médiation cellulaire sécuritaire et efficace. D'une part, un vaccin qui mime le plus possible l'infection sans toutefois pouvoir induire une maladie est souhaité. Afin d'assurer l'innocuité du vaccin, l'utilisation de vaccins vivants atténués ou inactivés est donc de plus en plus délaissée au dépend des vaccins sous-unitaires. Cependant, dans le but de ressembler le plus possible à un agent pathogène, il est souhaitable que les composantes du vaccin aient une taille similaire à l'agent pathogène, qu'il contient un ou des PAMPS et qu'il exprime des épitopes CD4⁺ et CD8⁺. D'autre part, la production d'IFN-I, qui favorise la présentation croisée des antigènes vaccinaux ainsi que le développement de la réponse T CD8⁺, est aussi requise. En conclusion, les VLP ainsi que les nanoparticules contenant des acides nucléiques, comme le PapMV, sont des plus prometteurs.

2. LE POTENTIEL DE PAMPV DANS UN CONTEXTE D'IMMUNOTHÉRAPIE DU CANCER

Bien que l'ablation des tumeurs par chirurgie, la radiothérapie ainsi que la chimiothérapie aient permis de traiter d'innombrables personnes atteintes de cancer, la thérapie du cancer comporte encore des failles et un trop grand nombre de personnes décèdent quotidiennement de cette maladie. En effet, les rechutes, les effets secondaires majeurs et le développement de cellules tumorales résistantes aux traitements sont encore très présents et soulignent le besoin de développer de nouvelles méthodes de thérapie. Cependant, étant donné que le cancer consiste en plusieurs maladies qui ont des propriétés différentes, il est impossible de développer un traitement universel. Ainsi, une approche personnalisée, incluant une meilleure caractérisation des cellules tumorales ainsi qu'une adaptation des traitements selon le type de cancer dont souffre la personne, est de plus en plus retrouvée en clinique. En outre, l'utilisation de méthodes alternatives comme l'immunothérapie est de plus en plus envisagée et a mené au développement de traitements qui permettent d'augmenter la survie et parfois de complètement guérir des patients atteints d'un stade avancé de cancer et/ou pour lesquels les thérapies traditionnelles ont échouées (Kantoff *et al.*, 2010, Rosenberg *et al.*, 2011, Wolchok *et al.*, 2013b). Parmi les méthodes d'immunothérapies existantes, la vaccination à l'aide de BMDC, le transfert adoptif de lymphocytes T, le blocage de récepteurs inhibiteurs et l'utilisation de molécules immunomodulatrices sont les plus prometteuses, mais nécessitent encore certaines optimisations pour conférer un bénéfice maximal.

Dans cette optique, le potentiel du PapMV a été évalué dans le modèle de mélanome murin B16 exprimant l'antigène modèle OVA afin de faciliter le suivi de la réponse immunitaire anti-tumorale. Il s'agit d'un des modèles de cancer le plus utilisé chez la souris et a permis de grands avancements dans la recherche de traitements efficaces contre le mélanome humain. Le mélanome B16 possède plusieurs caractéristiques similaires aux mélanomes humains, mais reste un modèle qui n'est pas parfait et qui peut réagir différemment (Overwijk *et al.*, 2001). Par exemple, les TAA identifiés dans les tumeurs humaines ont aussi été observés dans les tumeurs murines. De plus, le transfert adoptif de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques pour l'épitope gp100 permet de réduire la croissance des tumeurs autant chez l'humain que chez la souris. Cependant, alors qu'il est possible de récolter des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à la tumeur en mettant en culture des tumeurs humaines en présence d'IL-2, cela est rarement possible

avec les tumeurs murines. Il est à noter que le mélanome B16 est considéré comme un modèle très agressif de cancer qui est faiblement immunogénique (Nanni *et al.*, 1983) et difficile à traiter. En effet, contrairement aux humains affectés par un mélanome, qui peuvent survivre des mois ou des années avec la tumeur, le temps pour intervenir est très court chez la souris. En général, la tumeur prend une semaine pour être visible et mène à l'atteinte de points limites d'euthanasie des souris en 2 à 4 semaines selon les lignées de cellules, ce qui laisse peu de temps pour démontrer une efficacité thérapeutique.

Lors de nos expériences, le PapMV a tout d'abord été injecté directement dans la tumeur à partir de 7 jours après l'injection des cellules tumorales sous-cutanée. Le traitement a ensuite été répété aux 5 jours. En premier lieu, nous avons observé que la croissance des tumeurs dans le groupe de souris recevant le PapMV est ralentie en comparaison aux souris contrôles. De plus, cela résulte en une augmentation du temps de survie des souris. Bien que le PapMV n'ait pas d'effet cytotoxique directe sur les cellules B16, nous avons démontré qu'il y avait une réduction de la proportion de cellules tumorales positives pour le marqueur Ki67, suggérant une diminution de leur prolifération (figure 9). En outre, les cellules tumorales des souris ayant reçu le PapMV expriment plus fortement la molécule de présentation CMH-I. Comme les cellules de mélanome expriment très souvent un faible niveau de CMH-I (Benitez *et al.*, 1998, Z. Wang *et al.*, 1993) cette augmentation d'expression pourrait contribuer à augmenter leur reconnaissance par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques aux TAA et ainsi contribuer à leur élimination (Splotto *et al.*, 2002). L'IFN- α est connu pour augmenter l'expression des molécules de présentation antigénique (Gallucci *et al.*, 1999) et nous avons observé qu'une grande proportion des macrophages de la tumeur et des ganglions drainants produisent de l'IFN- α suite à l'injection intra-tumorale du PapMV. Ainsi, il aurait été intéressant de réaliser les mêmes expériences mais avec des cellules B16 déficientes en récepteur de l'IFN-I afin de confirmer la contribution directe de l'IFN- α dans l'augmentation de l'expression du CMH-I sur les cellules tumorales.

Bien que les pDC aient un rôle crucial dans le pouvoir immunomodulateur du PapMV suite à son injection i.v. en produisant l'IFN- α , aucune production d'IFN- α n'a été détectée dans ces cellules suite à l'injection du PapMV dans la tumeur. D'ailleurs, il a été démontré que les pDC présentes en périphérie, sont de faibles productrices d'IFN- α (Bjorck *et al.*, 2011, Niederquell *et al.*, 2013). Dans le même ordre d'idée, l'équipe du Dr Willem W. Overwijk a démontré que l'effet anti-tumoral du ligand de TLR7/8 3M-052 repose majoritairement sur les macrophages M1 infiltrant la tumeur suite à la production de MCP-1 (Singh *et al.*, 2014). En effet, une forte présence de MCP-1 résulte en une augmentation de la proportion de macrophages M1 qui

contribuent à la destruction des tumeurs (Nesbit *et al.*, 2001). Puisque nous observons une augmentation de la production de MCP-1 dans les tumeurs traitées avec le PapMV, il serait d'un grand intérêt d'évaluer le phénotype des macrophages présents dans la tumeur suite à l'injection de PapMV. En outre, il serait aussi possible de dépléter les macrophages ou encore de bloquer l'action du MCP-1 afin d'évaluer l'importance de ces éléments dans le contexte d'immunothérapie avec le PapMV. Dans l'étude du Dr Overwijk (Singh *et al.*, 2014), la présence d'IFN- α et de pDC a un effet bénéfique dans le contrôle de la tumeur, mais les cellules produisant l'IFN- α ainsi que le rôle exact des pDC n'ont pas été identifiés. Une autre étude a établi que l'utilisation d'un ligand de TLR7 dans un contexte d'immunothérapie du mélanome permet de générer des pDC cytotoxiques capables de tuer les cellules tumorales (Drobits *et al.*, 2012). En fait, la production d'IFN- α augmente l'expression de TRAIL sur les pDC, ce qui engendre l'apoptose des cellules tumorales qui expriment de forts niveaux du récepteur de TRAIL (Drobits *et al.*, 2012, Kalb *et al.*, 2012, Saidi *et al.*, 2016). D'ailleurs, alors que les pDC infiltrant la tumeur nuisent normalement à son contrôle, l'utilisation d'un ligand de TLR7 permet de renverser leur état immunosuppresseur (Le Mercier *et al.*, 2013). Ainsi, une des avenues possibles pour la suite de mon projet pourrait être de mesurer l'expression de TRAIL au niveau des pDC intratumorales suite à l'administration de PapMV et de faire un test de cytotoxicité *in vitro* afin d'évaluer leur capacité à tuer les cellules tumorales.

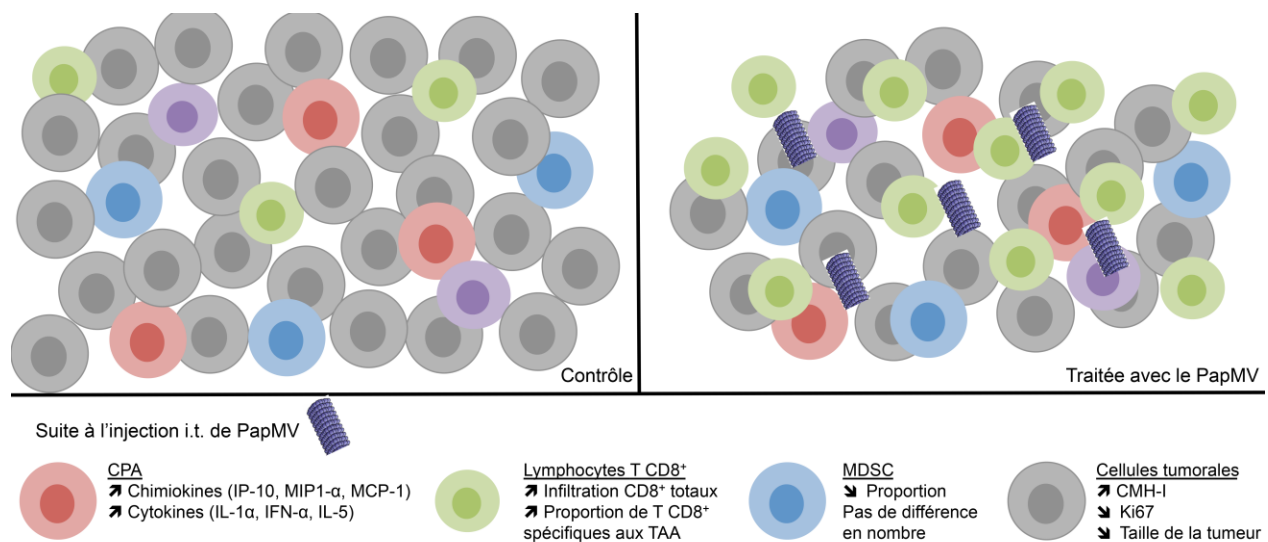


Figure 9. L'administration de PapMV dans la tumeur modifie le microenvironnement tumoral.

L'injection de PapMV engendre la production de chimiokines et de cytokines dans la tumeur par les CPA dont les macrophages. Ces médiateurs augmentent l'infiltration de cellules immunitaires dans la tumeur, particulièrement les lymphocytes T CD8⁺ totaux et TAA spécifiques. Une diminution de la proportion, mais pas dans le nombre de MDSC est également observée. L'injection de PapMV dans la tumeur s'accompagne aussi d'une hausse de l'expression du CMH-I à la surface des cellules tumorales ainsi qu'une diminution de l'expression de Ki67. Le tout résulte en une diminution de la croissance tumorale.

En poursuivant notre analyse du microenvironnement tumoral (figure 9), nous avons observé que l'injection de PapMV induit une augmentation de la production des chimiokines IP-10 et MIG en plus de MCP-1. Ces chimiokines sont induites par l'IFN- γ et ont la propriété commune d'attirer les lymphocytes T (Dufour *et al.*, 2002, Farber, 1997, Romagnani *et al.*, 2001). L'IP-10 est aussi reconnu pour attirer les macrophages, les NK ainsi que les DC en plus d'inhiber l'angiogenèse, ce qui est favorable au contrôle des tumeurs (Angiolillo *et al.*, 1995, Dufour *et al.*, 2002, Pertl *et al.*, 2001). D'ailleurs, nous avons observé que les souris traitées avec le PapMV présentent une plus forte infiltration en cellules immunitaires CD45⁺ dans la tumeur et que cette augmentation représente majoritairement une migration de lymphocytes T CD8⁺ totaux et TAA spécifiques. Plus précisément, nous avons évalué la présence de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques pour OVA, gp100 et TRP-2, mais il est possible que des cellules spécifiques pour d'autres TAA comme MART-1, tyrosinase et TRP-1 soient aussi présentes. En fait, il a été démontré précédemment que les lymphocytes T CD8⁺ arrêtent de migrer lorsqu'ils rencontrent leur antigène et donc que les cellules T CD8⁺ retrouvées dans la tumeur sont majoritairement spécifiques aux TAA (Deguine *et al.*, 2010). Il aurait été intéressant d'évaluer si cette augmentation d'infiltration de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à la tumeur est belle et bien impliquée dans la réduction de la croissance de la tumeur. Ainsi, avec ces résultats nous avons démontré que l'administration de PapMV dans la tumeur modifie le microenvironnement tumoral de façon à limiter la croissance des tumeurs et par le fait même à augmenter la survie des souris.

Sachant que dans 90% des cas de cancer, le décès des patients est attribuée aux métastases (Mehlen *et al.*, 2006), le développement de traitements en mesure de détruire ces cellules est primordial. Cependant, plusieurs thérapies prometteuses ne peuvent être administrées de façon systémique car cela mène à des effets secondaires majeurs. De son côté, l'injection intraveineuse du PapMV n'a jamais engendré de toxicité visible chez les souris. D'ailleurs, suite à l'administration systémique du PapMV, les principales cytokines détectées sont l'IFN- α et l'IL-12, des cytokines favorables au contrôle des cellules tumorales et au développement de la réponse cellulaire. De plus, leur production est transitoire, ce qui limite les risques d'effets secondaires causés par une forte inflammation. En outre, contrairement à d'autres ligands de TLR7 qui peuvent favoriser la prolifération des cellules tumorales suite à une entrée non spécifique dans ces cellules (Chatterjee *et al.*, 2014), le PapMV n'affecte pas directement la croissance des cellules B16 lors de test *in vitro*. En fait, bien que l'activation du TLR7 dans les cellules tumorales puisse les activer et accroître leur prolifération, le PapMV est une particule d'environ 80 nm dont l'entrée dans les cellules est probablement limitée aux cellules

phagocytaires. Ainsi, nous avons évalué la capacité de PapMV à limiter l'établissement dans les poumons de cellules tumorales présentes dans le sang. Pour ce faire, le PapMV a été injecté i.v. 6 h avant l'injection des cellules B16 par la même voie. Dans cette situation, les souris prétraitées avec le PapMV présentent une réduction dans le nombre de nodules présents dans les poumons. De plus, cela corrèle avec une augmentation de la proportion de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à la tumeur dans les ganglions drainants. Il est intéressant de noter que l'administration du PapMV deux jours après l'injection de B16 permet aussi de réduire significativement l'établissement des cellules tumorales dans les poumons et d'augmenter la réponse immunitaire anti-tumorale. Dans cette étude, le mécanisme permettant à PapMV de limiter la quantité de cellules tumorales dans les poumons suite à leur injection i.v. n'a pas été approfondi. Cependant, il est possible d'émettre l'hypothèse que cet effet est dépendant de la production d'IFN- α . En effet, cette cytokine pourrait entre autres 1- augmenter l'expression CMH-I sur cellules tumorales, 2- activer les cellules du système immunitaire innée et adaptatif 3- favoriser la présentation croisée des antigènes tumoraux ainsi que la réponse T CD8⁺, 4- augmenter l'expression de TRAIL sur les pDC, 5- recruter au poumon des populations de cellules immunitaires favorables comme les macrophages M1 et les lymphocytes T CD8⁺. Il serait donc intéressant de tester ces différentes possibilités en utilisant des souris et des cellules tumorales IFNAR KO.

Les recherches effectuées sur l'immunothérapie ont mis en évidence l'importance d'attaquer le cancer sur plusieurs fronts. Ainsi, la combinaison de différents traitements sera vraisemblablement nécessaire à la réussite de l'immunothérapie. Dans cette optique, nous avons ajouté le PapMV à deux traitements prometteurs présentement autorisés pour la thérapie de certains cancers : l'immunisation avec les BMDC et l'administration d'anticorps bloquant anti-PD-1. Dans les deux cas, l'injection du PapMV dans la tumeur permet d'augmenter l'effet thérapeutique de ces traitements ; une différence significative dans la croissance des tumeurs et la survie des souris est observée en comparaison à la monothérapie. De plus, la combinaison de deux traitements a permis à certaines souris d'éliminer complètement la tumeur. Mieux encore, ces souris sont protégées contre une administration subséquente de B16. Ce résultat suggère qu'il y a eu développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale mémoire fonctionnelle pouvant potentiellement empêcher les rechutes. D'autres études utilisant des ligands de TLR dans la lutte contre le cancer ont obtenues des résultats similaires. Par exemple, l'administration conjointe de ligands de TLR avec un vaccin à base de DC améliore l'efficacité de l'immunisation, probablement en augmentant l'activation et le pouvoir cytotoxique des cellules immunitaires (Damo *et al.*, 2015, F. Ma *et al.*, 2010, Vo *et al.*, 2015). Dans le même

ordre d'idées, la combinaison du poly(I:C) avec l'anticorps bloquant anti-PD-1 augmente significativement la survie de souris atteintes d'un mélanome (Bald *et al.*, 2014b). D'autre part, l'injection de toxine tétanique, afin de pré-conditionner le site de vaccination rend l'immunisation avec les DC plus efficace en amplifiant la migration de ces cellules aux ganglions drainants (Mitchell *et al.*, 2015). Bien que nous n'ayons pas évalué la migration des DC dans cette expérience, il est probable que l'administration de PapMV ait un impact à ce niveau puisque, tel que mentionné précédemment, dans le modèle de vaccination systémique, le PapMV augmente l'expression de CCR7 et CD62L à la surface des BMDC transférées.

L'anticorps bloquant anti-PD-1, quant à lui, est reconnu pour rétablir la fonctionnalité des TIL sans toutefois augmenter leur présence dans la tumeur (Kamphorst *et al.*, 2013, Spranger *et al.*, 2015). En accord avec ces études, les souris traitées seulement avec l'anticorps bloquant anti-PD-1 ne présente pas d'augmentation dans la quantité de TIL spécifiques pour gp100 et TRP2 en comparaison aux souris contrôles et celles recevant la combinaison anti-PD-1 + PapMV ont une quantité similaire de TIL que les souris recevant seulement le PapMV. Cependant, l'administration de l'anticorps anti-PD-1 conjointement avec le PapMV engendre une réduction significative de la croissance des tumeurs en comparaison avec le traitement anti-PD-1 seul ou PapMV seul et cela corrèle avec une hausse significative de la proportion de lymphocytes T CD8⁺ produisant les cytokines effectrices granzyme B et IFN- γ . Ainsi, il semble que l'injection du PapMV engendre une augmentation du recrutement de lymphocytes T CD8⁺ TAA spécifiques dans la tumeur, puis que le blocage du récepteur inhibiteur PD-1 permet à ces cellules d'être fonctionnelles, ce qui résulte en un effet synergique au niveau du potentiel thérapeutique.

La majorité des expériences de cette section ont été réalisées avec les cellules B16 qui expriment l'antigène modèle OVA (B16-OVA). La présence de cette protéine étrangère à la souris pourrait potentiellement augmenter l'immunogénicité des cellules tumorales et faciliter le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Ainsi dans le but de valider l'efficacité du PapMV, son effet sur la croissance tumorale ainsi que la survie des souris atteintes de mélanome a été testé en utilisant les cellules B16F10. Dans ce contexte, l'injection du PapMV dans les tumeurs permet d'obtenir un bénéfice similaire ou même plus grand qu'avec les B16-OVA. Les cellules B16F10 étant moins immunogéniques que les B16-OVA, il est possible que l'effet immunomodulateur du PapMV soit d'autant plus bénéfique afin de briser la tolérance et de développer une réponse immunitaire anti-tumorale.

Enfin, quelques études démontrent que l'utilisation de molécules immunomodulatrices telles que les ligands de TLR augmente l'efficacité du transfert adoptif de lymphocytes T (Amos *et al.*, 2011, Ly *et al.*, 2010, Nelson *et al.*, 2016). En effet, l'injection de MPL, de CpG ODN ou d'imiquimod permet d'accroître l'expression du CD25 sur les cellules T CD8⁺ transférées, ce qui augmente leur expansion et prolonge leur survie (Ly *et al.*, 2010, Nelson *et al.*, 2016). De plus, sachant que l'administration de PapMV augmente l'expression du CMH-I sur les cellules tumorales, engendre la production de chimiokines importantes pour le recrutement des lymphocytes T dans la tumeur et induit la production de cytokines importantes pour l'activation des CPA, la présentation croisée des TAA et le développement de la réponse T CD8⁺, il serait pertinent d'évaluer l'impact de l'injection de PapMV sur le potentiel thérapeutique d'un transfert adoptif de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à la tumeur.

En somme, les résultats obtenus démontrent que les signaux induits par l'injection de PapMV sont bénéfiques au développement d'une réponse immunitaire innée et adaptative anti-tumoral, ce qui laisse présager un très bon potentiel anti-cancer du PapMV seul ou en combinaison avec d'autres méthodes d'immunothérapies.

3. L'IMPLICATION DU SYSTÈME DU COMPLÉMENT DANS LA RECONNAISSANCE ET LE POUVOIR IMMUNOGÉNIQUE DE PAPMV

Les mécanismes généraux permettant la détection des microorganismes par le système immunitaire sont assez bien connus. D'une part, lors de leur entrée dans l'organisme, les agents pathogènes sont neutralisés par différentes protéines situées dans les fluides corporels comme les anticorps naturels ainsi que les protéines du système du complément. Celles-ci se lient majoritairement aux épitopes répétés retrouvés à la surface des agents pathogènes, comme les phospholipides, la phosphatidylcholine et les polysaccharides, et permettent l'opsonisation, la phagocytose et la destruction des agents pathogènes, en plus de contribuer au développement de la réponse immunitaire. D'autre part, les cellules du système immunitaire peuvent détecter la présence de microorganismes suite à la reconnaissance de PAMPS par leur PRR, ce qui mène au développement d'une réponse de type inflammatoire comprenant l'activation des cellules immunitaires ainsi que la production de cytokines.

Au cours des dernières années, un intérêt grandissant a vu le jour pour l'utilisation de virus de plante dans le développement de nouveaux vaccins prophylactiques et thérapeutiques (Jobsri *et al.*, 2015, Lebel *et al.*, 2015, Lebel *et al.*, 2016, Lizotte *et al.*, 2015). D'ailleurs, plusieurs résultats prometteurs ont été obtenus et ont même menés à un essai clinique chez l'humain dans le cas du PapMV (Folia Biotech Inc., 2015). Cependant, les mécanismes de reconnaissance des virus de plante par le système immunitaire sont très peu connus. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à évaluer le rôle des anticorps naturels et du système du complément dans la reconnaissance et l'effet immunomodulateur du PapMV. Dans un premier temps, nous avons observé que les IgM naturels, ainsi que la molécule C3 du complément et/ou ses dérivés (C3b/iC3b/C3dg) se lient fortement au PapMV, alors que les composantes du complément C1q et C4/C4b/C4d ne s'y associent que faiblement. De plus, lorsque les anticorps naturels sont absents, il y a une diminution de la détection du C1q et du C4, alors qu'on observe plutôt une augmentation de la liaison du C3 au PapMV. En effet, les anticorps naturels sont importants dans la voie classique du complément pour permettre la liaison du C1q et subséquemment du C4b et du C3b, alors que ce n'est pas le cas lors de la fixation du C3b suite à l'activation de la voie alternative du complément. Il est possible de croire que l'absence des anticorps naturels, tels les IgM pentamériques encombrants, permet de libérer de l'espace, maintenant disponible

pour la fixation de C3b supplémentaire. Enfin, une augmentation de la concentration de C3a sérique est mesurée suite à l'injection du PapMV, confirmant le clivage du C3. À la lumière de ces résultats, il est possible d'affirmer que le PapMV engendre majoritairement l'activation de la voie alternative du complément. Dans cette voie, il y a une hydrolyse spontanée constante du C3 et seules les surfaces présentant des molécules régulatrices, comme le facteur H, vont inhiber son activation (Merle *et al.*, 2015a). Il semble donc que le PapMV, ne possède aucun mécanisme de régulation du complément à sa surface et que le C3 hydrolysé peut s'y fixer et former la convertase C3bBb pour subséquemment amplifier le clivage du C3, la fixation du C3b ainsi que la production de l'anaphylatoxine C3a. D'ailleurs, d'autres virus tels les adénovirus ou le virus de la rougeole, ont aussi été identifiés pour activer la voie alternative du complément (Devaux *et al.*, 2004, H. Jiang *et al.*, 2004).

Par la suite, nous avons évalué l'impact de l'absence d'anticorps et de l'inactivation du système du complément sur l'interaction entre les cellules du système immunitaire et PapMV. En premier lieu, nous avons observé que l'absence d'anticorps naturels n'a pas d'impact sur le recrutement à la rate et la phagocytose du PapMV. Cependant, l'injection de FVC, qui engendre le clivage du C3 et donc son élimination, mène à une diminution de la présence du PapMV à la rate et associé à des cellules immunitaires de la rate, du sang et des ganglions. Ainsi, la fixation du C3b sur le PapMV permet probablement aux cellules immunitaires exprimant le récepteur du C3b (CD35) de lier le PapMV opsonisé, de le phagocyter et de l'apporter aux organes lymphoïdes secondaires. Afin d'approfondir notre compréhension de la reconnaissance initiale du PapMV par les cellules immunitaires, il serait possible de confirmer les résultats de phagocytose et de recrutement à la rate en évaluant ces paramètres dans des souris déficientes en CD35 ou en récepteur Fc- α/μ .

Par la suite, les propriétés immunomodulatrices du PapMV en absence d'anticorps naturels et d'un système du complément fonctionnel ont été évaluées. De façon cohérente, l'activation des cellules immunitaires ainsi que la production d'IFN- α des souris JHT injectées avec le PapMV sont similaires à celles des souris sauvages C57BL/6. Cependant, l'injection du PapMV dans les souris traitées avec le FVC engendre une production d'IFN- α ainsi qu'une activation des cellules immunitaires accrues, malgré la diminution d'interaction entre les cellules immunitaires et le PapMV. De plus, l'absence d'un système du complément fonctionnel permet d'augmenter les propriétés adjuvantes et immunomodulatrices du PapMV en contexte de vaccination avec des BMDC et de prévention d'établissement de métastases pulmonaires, probablement grâce à la plus grande production d'IFN- α .

Puisque le PapMV est un virus non-enveloppé, l'activation du système du complément à sa surface n'est pas en mesure de soutenir la formation du MAC et ne peut pas entraîner sa destruction comme c'est le cas pour certains virus enveloppés ou certaines bactéries (Blue *et al.*, 2004, Merle *et al.*, 2015a). De plus, comme le PapMV ne se réplique pas, son opsonisation et sa capture par les cellules phagocytaires ne devraient pas restreindre sa capacité à activer les cellules immunitaires, comme c'est le cas pour d'autres vecteurs viraux réplicatifs utilisés en vaccination, mais plutôt l'augmenter. Ces propriétés du système du complément ne peuvent donc pas expliquer les résultats obtenus. Enfin, dans toutes les expériences effectuées, l'injection du FVC seul n'a aucun impact sur les paramètres mesurés. Plus spécifiquement, le FVC à lui seul n'engendre pas de production d'IFN- α , d'activation des cellules immunitaires et n'a pas d'effet bénéfique en contexte de vaccination ou d'immunothérapie. Par contre, il est probable que l'administration du FVC modifie la capacité de production d'IFN- α par les cellules immunitaires suite à l'injection du PapMV.

La production d'IFN- α peut être induite par l'activation de différents PRR tels le TLR7, TLR9, TLR3, RIG-I et MDA-5. Nous avons démontré précédemment que le PapMV est un agoniste de TLR7 (Lebel *et al.*, 2014). Cependant, il serait possible qu'en inactivant le système du complément le type de cellule immunitaire qui phagocyte le PapMV ainsi que la voie d'entrée du PapMV dans les CPA puisse être modifiés. Ainsi, des souris déficientes en récepteur TLR7 et en molécule adaptatrice MYD88 ont été traitées avec le FVC puis immunisées avec le PapMV. Tel qu'observé précédemment, la déficience en TLR7 et MYD88 empêche la production d'IFN- α en contexte d'immunisation avec le PapMV et ce, même lorsque le système du complément est inactivé. Cela confirme donc que, dans cette situation, la production d'IFN- α par les souris ayant reçu du FVC dépend seulement de l'activation du TLR7 et n'implique pas d'autres PRR. De plus, en effectuant une déplétion partielle des pDC, nous avons confirmé que ces cellules sont toujours les principales productrices d'IFN- α lors de l'inactivation du système du complément. Il semble donc que l'injection du FVC modifie l'état des pDC, ce qui leur permet de produire plus d'IFN- α suite à l'activation du TLR7 par le PapMV.

Dans le but d'identifier comment les pDC sont affectées par l'inactivation du système du complément, une analyse du transcriptome de pDC provenant de souris traitées avec le FVC, le PapMV ou le FVC combiné au PapMV a été réalisée. Les résultats obtenus démontrent que l'injection du FVC à lui seul ne modifie pas l'expression de gènes reliés à la production d'IFN- α suite à l'activation du TLR7, alors que l'ajout du FVC lors de l'immunisation avec PapMV engendre une signature génique similaire au PapMV seul, mais avec des niveaux d'expression

plus élevés (annexe II). Il serait possible que l'injection du FVC ne modifie pas l'expression de gènes clés dans la production d'IFN- α , mais plutôt l'état des protéines contrôlant ce phénomène. Par exemple, il a été démontré que les anaphylatoxines C3a et C5a induisent la phosphorylation de MAPK importantes dans la signalisation des TLR, ce qui permet d'augmenter ou de diminuer la production de différentes cytokines. Dans la majorité des cas, l'IL-6 et le TNF- α sont augmentés, alors que la production d'IL-12 est inhibée (la Sala *et al.*, 2005, H. Tang *et al.*, 2013, Zaal *et al.*, 2013, X. Zhang *et al.*, 2007). Un phénomène similaire pourrait donc contrôler la production d'IFN- α . De plus, une augmentation de l'expression des gènes reliés à l'inflammasome a été observée chez les pDC provenant de souris traitées avec le FVC. L'activation de l'inflammasome est reconnue pour amplifier la réponse inflammatoire et ainsi augmenter l'effet adjuvant des sels d'aluminium (Baroja-Mazo *et al.*, 2014, Eisenbarth *et al.*, 2008). L'implication de l'inflammasome dans l'augmentation des propriétés immunomodulatrices du PapMV lors de l'inactivation du système du complément pourrait être évaluée à l'aide de souris déficientes en composantes de l'inflammasome.

D'ailleurs, les anaphylatoxines sont reconnues pour induire la production de cytokines proinflammatoires suite à l'activation de l'inflammasome (Asgari *et al.*, 2013, Laudisi *et al.*, 2013). Tel que mentionné précédemment, le FVC est un analogue de C3b qui, lors de son injection *in vivo*, forme une convertase permettant le clivage de C3 et C5 (Krishnan *et al.*, 2009). Ainsi, durant ce processus, il y a production des anaphylatoxines C3a et C5a, qui peuvent avoir différents impacts sur la réponse immunitaire (Merle *et al.*, 2015b, Sayegh *et al.*, 2014, Zhou, 2012). De plus, le FVC pourrait potentiellement se lier au récepteur du C3b et engendrer des signaux qui pourraient affecter la production d'IFN- α . Ainsi, afin de déterminer si l'effet de l'injection du FVC provient de l'absence du C3 ou du C5, de la production d'anaphylatoxines ou encore d'un effet direct du FVC, des souris C3 KO ont été immunisées avec le PapMV. Lors de cette expérience, l'absence de C3 permet d'obtenir les mêmes résultats que ceux obtenus avec l'injection du FVC, soit une augmentation de la production d'IFN- α et de l'activation des cellules immunitaires, alors que l'injection du FVC dans les souris C3 KO n'a aucun effet supplémentaire. Cela confirme donc l'implication du C3 dans la régulation de la production d'IFN- α par les pDC suite à l'activation du TLR7 par PapMV.

Le système du complément et les TLR sont reconnus pour s'influencer mutuellement (Holst *et al.*, 2012, W. C. Song, 2012). Il n'est donc pas surprenant que la déficience en C3 puisse affecter la réponse aux ligands du TLR7. Cependant, les liens entre ces deux systèmes sont encore mal définis et peu compris. Afin de mieux caractériser l'effet du C3 sur les pDC, la

purification de protéines C3 biologiquement active ainsi que de ses dérivées est nécessaire. Ainsi, il serait possible d'ajouter du C3, C3a ou C3b à des pDC en culture, puis d'évaluer la production d'IFN- α suite à la stimulation avec PapMV. Subséquemment, différentes expériences afin d'identifier les voies qui sont régulées par l'ajout de ces différentes molécules pourraient être réalisées. D'autre part, l'immunisation de souris déficientes en récepteur du C3a ou du C3b avec le PapMV permettrait de mieux comprendre le rôle des protéines C3 dans la production d'IFN- α suite à l'activation du TLR7. Par exemple, il a été démontré que la liaison du C3R par le fimbriae d'une bactérie inhibe la production d'IL-12 (Hajishengallis *et al.*, 2007). De plus, l'élimination des cellules apoptotiques opsonisées de C3b est un phénomène non inflammatoire durant lequel une inhibition de la production d'IL-12 a aussi été rapportée (S. Kim *et al.*, 2004, Mevorach *et al.*, 1998). Ainsi, il serait possible que le PapMV opsonisé de C3b engendre lui aussi des signaux anti-inflammatoires qui limitent la production de cytokines et qu'en absence de C3, cette inhibition soit levée, permettant une production accrue d'IFN- α . Dans cette optique, il serait intéressant de produire un PapMV ne permettant pas la liaison du C3b à sa surface afin d'évaluer si cela augmente ces propriétés immunomodulatrices ou de développer des anticorps bloquants ou des antagonistes du C3R qui fonctionnent chez la souris afin de poursuivre notre compréhension de ce phénomène.

Enfin, afin de déterminer si ce phénomène est propre au PapMV ou s'il s'applique à d'autres virus, des souris ont été infectées avec le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), un virus à ARNs_b enveloppé infectant les mammifères pour lequel le rôle des anticorps naturels et du complément a déjà été étudié (Ochsenbein *et al.*, 1999a, Ochsenbein *et al.*, 1999b). Dans cette situation, nous avons pu constater que bien que le rôle des anticorps naturels et du système du complément dans la reconnaissance, la phagocytose et le recrutement de VSV à la rate ne soit pas le même que pour PapMV, la décomplémentation des souris, suite à l'injection du FVC, dans les deux cas, va mener à une augmentation de la production d'IFN- α . Cependant, l'injection d'un ligand du TLR3 dans des souris décomplémentées n'a aucun impact sur la production d'IFN- α . Ces résultats suggèrent que l'impact de la décomplémentation sur la production d'IFN- α n'est pas exclusif à PapMV, mais ne s'applique pas au ligand de TLR3 utilisant la molécule adaptatrice TRIF. Afin de pousser plus loin notre analyse, il serait intéressant de déterminer l'impact de la décomplémentation sur la production d'IFN- α suite à l'administration de d'autres ligands de PRR (TLR9, RIG-I, MDA-5) et de vérifier si l'effet est obtenu seulement lorsque le ligand (d'origine virale ou synthétique) entre par la voie

intraveineuse ou est aussi observé en utilisant d'autres voies d'injection (intramusculaire, intranasale, sous-cutanée...).

En somme, la meilleure compréhension de l'implication des anticorps naturels et du système du complément dans le pouvoir immunomodulateur de PapMV contribuera à optimiser son utilisation afin de maximiser son efficacité en contexte de vaccination et d'immunothérapie.

CONCLUSION

Les travaux rapportés dans cette thèse avaient pour but d'élucider le mécanisme d'action de PapMV et d'évaluer son potentiel en tant qu'adjuvant et molécule immunomodulatrice induisant une augmentation de la réponse T CD8⁺ en contexte de vaccination et d'immunothérapie du cancer. Nous avons démontré que l'activation du TLR7 par l'ARNsb de PapMV, ainsi que la production d'IFN- α par les pDC étaient des éléments cruciaux du pouvoir immunomodulateur de PapMV. De plus, en utilisant le PapMV comme adjuvant à un vaccin à base de BMDC, nous avons prouvé qu'il était en mesure d'augmenter la force et la fonctionnalité de la réponse T CD8⁺. En outre, en activant le système immunitaire, PapMV engendre une modification du microenvironnement tumoral de façon à augmenter la réponse immunitaire spécifique à la tumeur et par le fait même le contrôle des tumeurs. Enfin, le rôle du système du complément dans la reconnaissance du PapMV par les cellules du système immunitaire a été mis en lumière, en plus d'établir un lien entre la protéine C3 du complément et la production d'IFN- α par les pDC suite à l'activation du TLR7.

En intégrant, les résultats obtenues dans les trois différentes parties de mon doctorat avec ceux des études précédemment effectuées par notre équipe de recherche, le modèle suivant a été élaboré. Lors de l'entrée du PapMV dans le système sanguin, ce dernier engendre l'activation de la voie alternative du complément et est opsonisé par la molécule C3b du complément. En effet, le PapMV ne possède pas de molécules régulatrices du système du complément ce qui permet la fixation du C3b à sa surface et la relâche de l'anaphylatoxine C3a qui contribue au développement des réponses immunitaires innées et adaptatives. Par la suite, les cellules immunitaires, exprimant entre autres le récepteur du C3b, captent le PapMV et le phagocytent. Subséquemment, ces cellules dégradent le PapMV, ce qui va exposer son ARNsb au TLR7 de la cellule, situé dans les endosomes. Au niveau des pDC, ce phénomène engendre la production d'IFN- α , la cytokine clé du pouvoir immunomodulateur de PapMV. En effet, suite à la production d'IFN- α par les pDC, les autres cellules du système immunitaire sont activées et augmentent l'expression des molécules de co-stimulation et de présentation antigénique à leur surface. Tout cela permet la présentation des antigènes de PapMV par les cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et le développement d'une réponse immunitaire adaptative (humorale et cellulaire) spécifique. Lorsque le PapMV n'exprime pas d'épitopes vaccinaux, son utilisation permet de générer un environnement propice au développement d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire. Ainsi, il est non seulement efficace comme adjuvant lorsqu'on l'ajoute à un vaccin, mais aussi comme molécule immunomodulatrice favorisant le développement d'une réponse immunitaire antitumorale.

Dans cette étude, l'IFN- α s'est avéré avoir un rôle central. D'une part, en absence de réponse à l'IFN-I (souris *Ifnar* KO), l'activation des cellules immunitaires ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires, normalement observées suite à l'injection du PapMV, sont abolies. De plus, cette cytokine a un impact non seulement sur les cellules immunitaires de l'hôte, mais aussi sur les DC transférées, utilisées pour effectuer l'immunisation. L'IFN- α a donc un impact à plusieurs stades du développement de la réponse immunitaire. Enfin, en absence de C3, l'augmentation de la production d'IFN- α permet d'augmenter l'effet adjuvant et immunomodulateur du PapMV. Ces observations corrént bien avec les propriétés bénéfiques connues de l'IFN- α pour la présentation croisée, l'activation des CPA, le développement la réponse T ainsi que le contrôle des infections virales et des tumeurs (Durand *et al.*, 2006, Hervas-Stubbs *et al.*, 2012, Hervas-Stubbs *et al.*, 2011, Le Bon *et al.*, 2006, Le Bon *et al.*, 2003, Le Bon *et al.*, 2002).

En perspective, il serait intéressant d'approfondir notre compréhension de l'impact du PapMV sur les cellules immunitaires de la tumeur, ainsi que sur les cellules tumorales elles-mêmes. Par exemple, nous pourrions évaluer l'importance de l'IFN- α en utilisant des anticorps bloquant ainsi que des cellules B16 dépourvues du récepteur de l'IFN-I. Par ailleurs, une déplétion de différentes populations de cellules immunitaires comme les lymphocytes T CD8⁺, les macrophages ainsi que les pDC pourrait être réalisée afin d'évaluer l'importance de ces populations dans l'effet immunothérapeutique du PapMV. D'autre part, une meilleure caractérisation des différents sous-types de macrophages présents dans la tumeur (M1/M2) en présence de PapMV serait appropriée. En outre, puisque les pDC ne produisent pas d'IFN- α dans ce modèle, il serait pertinent d'évaluer si ces cellules ont d'autres fonctions importantes dans le contrôle des tumeurs comme l'expression de TRAIL ou encore la production de molécules effectrices (granzyme B, perforine) qui pourraient contribuer à la destruction des cellules tumorales. Enfin, il serait intéressant de voir si PapMV est en mesure d'améliorer d'autres méthodes d'immunothérapies comme le transfert adoptif de lymphocytes T. Tous ces éléments nous permettraient de mieux comprendre les propriétés anti-tumorales du PapMV.

D'un autre côté, l'élucidation de l'impact du C3 sur la capacité des pDC à produire de l'IFN- α serait pertinente. Par exemple, il serait nécessaire d'évaluer quelle composante du C3 est responsable de l'effet en injectant du C3a ou en utilisant des souris déficientes en récepteur pour le C3a et le C3b. Par la suite, nous pourrions déterminer l'effet de cette molécule sur les pDC. Il serait intéressant de s'attarder aux facteurs de transcription ainsi qu'aux molécules nécessaires à la cascade d'activation du TLR7 menant à la production d'IFN- α .

En outre, maintenant que la sécurité du PapMV a été confirmée par un essai clinique de phase I chez l'humain, la validation de sa fonctionnalité ainsi que la détermination de son mécanisme d'action avec des cellules humaines est nécessaire dans l'optique de commercialiser cet outil. Enfin, à la lumière des résultats présentés dans cette thèse, l'expression d'épitopes CD8⁺ à la surface de PapMV semble être prometteur pour le développement de vaccins et d'immunothérapies sécuritaires et efficaces pour générer une réponse T CD8⁺ fonctionnelle.

En conclusion, grâce à leur innocuité, leur facilité de production, leur versatilité ainsi qu'aux résultats encourageants qu'ils ont permis d'obtenir dans le domaine de la vaccination et de l'immunothérapie du cancer, les virus de plante, tels que le PapMV, seront assurément un outil de choix afin de répondre aux besoins non comblés dans le domaine de la vaccination ces prochaines années.

RÉFÉRENCES

- Acosta-Ramirez E, Perez-Flores R, Majeau N, Pastelin-Palacios R, Gil-Cruz C, Ramirez-Saldana M, Manjarrez-Orduno N, Cervantes-Barragan L, Santos-Argumedo L, Flores-Romo L, Becker I, Isibasi A, Leclerc D & Lopez-Macias C (2008) Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of papaya mosaic virus. *Immunology* 124(2):186-197.
- Adam C, King S, Allgeier T, Braumuller H, Luking C, Mysliwicz J, Kriegeskorte A, Busch DH, Rocken M & Mocikat R (2005) DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* 106(1):338-344.
- Agence de la santé publique du Canada (2013) *Immunisation des sujets immunodéprimés.*, <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/cig-gci/p03-07-fra.php>
- Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T & Pulendran B (2003) Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* 171(10):4984-4989.
- Ahearn JM, Fischer MB, Croix D, Goerg S, Ma M, Xia J, Zhou X, Howard RG, Rothstein TL & Carroll MC (1996) Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity* 4(3):251-262.
- Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE & Rosenberg SA (2009) Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114(8):1537-1544.
- Akira S, Uematsu S & Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4):783-801.
- Aladin F, Lautscham G, Humphries E, Coulson J & Blake N (2007) Targeting tumour cells with defects in the MHC Class I antigen processing pathway with CD8+ T cells specific for hydrophobic TAP- and Tapasin-independent peptides: the requirement for directed access into the ER. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 56(8):1143-1152.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R & Flavell RA (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413(6857):732-738.
- Algarra I, Garcia-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F & Garrido F (2004) The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 53(10):904-910.
- Alper CA & Balavitch D (1976) Cobra venom factor: evidence for its being altered cobra C3 (the third component of complement). *Science* 191(4233):1275-1276.
- Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ & Davis MM (1996) Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274(5284):94-96.
- Amos SM, Pegram HJ, Westwood JA, John LB, Devaud C, Clarke CJ, Restifo NP, Smyth MJ, Darcy PK & Kershaw MH (2011) Adoptive immunotherapy combined with intratumoral TLR agonist delivery eradicates established melanoma in mice. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 60(5):671-683.
- Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH & Tosato G (1995) Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *The Journal of experimental medicine* 182(1):155-162.
- Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarli A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, Palmer DC, Chan CC, Klebanoff CA, Overwijk WW, Rosenberg SA & Restifo NP (2005) CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 174(5):2591-2601.

- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, Andre F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G & Zitvogel L (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature medicine* 13(9):1050-1059.
- Apetoh L, Ladoire S, Coukos G & Ghiringhelli F (2015) Combining immunotherapy and anticancer agents: the right path to achieve cancer cure? *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 10.1093/annonc/mdv209.
- Arakawa T, Chong DK & Langridge WH (1998) Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nature biotechnology* 16(3):292-297.
- Arina A & Bronte V (2015) Myeloid-derived suppressor cell impact on endogenous and adoptively transferred T cells. *Current opinion in immunology* 33:120-125.
- Arkhipenko MV, Petrova EK, Nikitin NA, Protopopova AD, Dubrovin EV, Yaminskii IV, Rodionova NP, Karpova OV & Atabekov JG (2011) Characteristics of Artificial Virus-like Particles Assembled in vitro from Potato Virus X Coat Protein and Foreign Viral RNAs. *Acta naturae* 3(3):40-46.
- Asgari E, Le Friec G, Yamamoto H, Perucha E, Sacks SS, Kohl J, Cook HT & Kemper C (2013) C3a modulates IL-1beta secretion in human monocytes by regulating ATP efflux and subsequent NLRP3 inflammasome activation. *Blood* 122(20):3473-3481.
- Aspord C, Charles J, Leccia MT, Laurin D, Richard MJ, Chaperot L & Plumas J (2010) A novel cancer vaccine strategy based on HLA-A*0201 matched allogeneic plasmacytoid dendritic cells. *PloS one* 5(5):e10458.
- Atabekov J, Nikitin N, Arkhipenko M, Chirkov S & Karpova O (2011) Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles. *The Journal of general virology* 92(Pt 2):453-456.
- Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, Abrams J, Sznol M, Parkinson D, Hawkins M, Paradise C, Kunkel L & Rosenberg SA (1999) High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 17(7):2105-2116.
- Aydar Y, Sukumar S, Szakal AK & Tew JG (2005) The influence of immune complex-bearing follicular dendritic cells on the IgM response, Ig class switching, and production of high affinity IgG. *J Immunol* 174(9):5358-5366.
- Azuma K, Ota K, Kawahara A, Hattori S, Iwama E, Harada T, Matsumoto K, Takayama K, Takamori S, Kage M, Hoshino T, Nakanishi Y & Okamoto I (2014) Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 25(10):1935-1940.
- Babin C, Majeau N & Leclerc D (2013) Engineering of papaya mosaic virus (PapMV) nanoparticles with a CTL epitope derived from influenza NP. *Journal of nanobiotechnology* 11(1):10.
- Bachmann MF, Barner M, Viola A & Kopf M (1999) Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *European journal of immunology* 29(1):291-299.
- Bachmann MF & Jennings GT (2010) Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature reviews. Immunology* 10(11):787-796.
- Badillo-Godinez O, Gutierrez-Xicotencatl L, Plett-Torres T, Pedroza-Saavedra A, Gonzalez-Jaimes A, Chihu-Amparan L, Maldonado-Gama M, Espino-Solis G, Bonifaz LC & Esquivel-Guadarrama F (2015) Targeting of rotavirus VP6 to DEC-205 induces protection against the infection in mice. *Vaccine* 33(35):4228-4237.
- Badovinac VP, Messingham KA, Jabbari A, Haring JS & Harty JT (2005) Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nature medicine* 11(7):748-756.

- Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC, Jr., Morton DL, Ross MI, Sober AJ & Sondak VK (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27(36):6199-6206.
- Bald T, Landsberg J, Lopez-Ramos D, Renn M, Glodde N, Jansen P, Gaffal E, Steitz J, Tolba R, Kalinke U, Limmer A, Jonsson G, Holzel M & Tuting T (2014a) Immune cell-poor melanomas benefit from PD-1 blockade after targeted type I IFN activation. *Cancer Discov* 4:674-687.
- Bald T, Landsberg J, Lopez-Ramos D, Renn M, Glodde N, Jansen P, Gaffal E, Steitz J, Tolba R, Kalinke U, Limmer A, Jonsson G, Holzel M & Tuting T (2014b) Immune cell-poor melanomas benefit from PD-1 blockade after targeted type I IFN activation. *Cancer discovery* 4(6):674-687.
- Balique F, Colson P & Raoult D (2012) Tobacco mosaic virus in cigarettes and saliva of smokers. *J Clin Virol* 55(4):374-376.
- Baroja-Mazo A, Martin-Sanchez F, Gomez AI, Martinez CM, Amores-Iniesta J, Compan V, Barbera-Cremades M, Yague J, Ruiz-Ortiz E, Anton J, Bujan S, Couillin I, Brough D, Arostegui JI & Pelegrin P (2014) The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nature immunology* 15(8):738-748.
- Barth H, Rybczynska J, Patient R, Choi Y, Sapp RK, Baumert TF, Krawczynski K & Liang TJ (2011) Both innate and adaptive immunity mediate protective immunity against hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Hepatology* 54(4):1135-1148.
- Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL & Banham AH (2006) Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24(34):5373-5380.
- Batista FD & Harwood NE (2009) The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature reviews. Immunology* 9(1):15-27.
- Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H & Lipford GB (2001) Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(16):9237-9242.
- Baumgaertner P, Jandus C, Rivals JP, Derre L, Lovgren T, Baitsch L, Guillaume P, Luescher IF, Berthod G, Matter M, Rufer N, Michielin O & Speiser DE (2012) Vaccination-induced functional competence of circulating human tumor-specific CD8 T-cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 130(11):2607-2617.
- Baumgarth N, Tung JW & Herzenberg LA (2005) Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol* 26(4):347-362.
- Becker TC, Wherry EJ, Boone D, Murali-Krishna K, Antia R, Ma A & Ahmed R (2002) Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *The Journal of experimental medicine* 195(12):1541-1548.
- Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, Allan RS, Wojtasiak M, Shortman K, Carbone FR, Brooks AG & Heath WR (2009) Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nature immunology* 10(5):488-495.
- Beebe DP & Cooper NR (1981) Neutralization of vesicular stomatitis virus (VSV) by human complement requires a natural IgM antibody present in human serum. *J Immunol* 126(4):1562-1568.
- Bekeredjian-Ding I, Schafer M, Hartmann E, Pries R, Parcina M, Schneider P, Giese T, Endres S, Wollenberg B & Hartmann G (2009) Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha. *Immunology* 128(3):439-450.

- Beljanski V, Chiang C, Kirchenbaum GA, Olaghier D, Bloom CE, Wong T, Haddad EK, Trautmann L, Ross TM & Hiscott J (2015) Enhanced Influenza Virus-Like Particle Vaccination with a Structurally Optimized RIG-I Agonist as Adjuvant. *Journal of virology* 89(20):10612-10624.
- Belshe RB, Nichol KL, Black SB, Shinefield H, Cordova J, Walker R, Hessel C, Cho I & Mendelman PM (2004) Safety, efficacy, and effectiveness of live, attenuated, cold-adapted influenza vaccine in an indicated population aged 5-49 years. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 39(7):920-927.
- Bendahmane M, Koo M, Karrer E & Beachy RN (1999) Display of epitopes on the surface of tobacco mosaic virus: impact of charge and isoelectric point of the epitope on virus-host interactions. *Journal of molecular biology* 290(1):9-20.
- Benitez R, Godelaine D, Lopez-Nevot MA, Brasseur F, Jimenez P, Marchand M, Oliva MR, van Baren N, Cabrera T, Andry G, Landry C, Ruiz-Cabello F, Boon T & Garrido F (1998) Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 52(6):520-529.
- BenMohamed L, Gras-Masse H, Tartar A, Daubersies P, Brahimi K, Bossus M, Thomas A & Druilhe P (1997) Lipopeptide immunization without adjuvant induces potent and long-lasting B, T helper, and cytotoxic T lymphocyte responses against a malaria liver stage antigen in mice and chimpanzees. *European journal of immunology* 27(5):1242-1253.
- Benoit ME, Clarke EV, Morgado P, Fraser DA & Tenner AJ (2012) Complement protein C1q directs macrophage polarization and limits inflammasome activity during the uptake of apoptotic cells. *J Immunol* 188(11):5682-5693.
- Bershteyn A, Hanson MC, Crespo MP, Moon JJ, Li AV, Suh H & Irvine DJ (2012) Robust IgG responses to nanograms of antigen using a biomimetic lipid-coated particle vaccine. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 157(3):354-365.
- Bhagawati-Prasad VN, De Leenheer E, Keefe NP, Ryan LA, Carling J & Heath AW (2010) CD40mAb adjuvant induces a rapid antibody response that may be beneficial in post-exposure prophylaxis. *Journal of immune based therapies and vaccines* 8:1.
- Bierman HR, Crile DM, Dod KS, Kelly KH, Petrakis NL, White LP & Shimkin MB (1953) Remissions in leukemia of childhood following acute infectious disease: staphylococcus and streptococcus, varicella, and feline panleukopenia. *Cancer* 6(3):591-605.
- Birkholz K, Schwenkert M, Kellner C, Gross S, Fey G, Schuler-Thurner B, Schuler G, Schaft N & Dorrie J (2010) Targeting of DEC-205 on human dendritic cells results in efficient MHC class II-restricted antigen presentation. *Blood* 116(13):2277-2285.
- Bjorck P, Leong HX & Engleman EG (2011) Plasmacytoid dendritic cell dichotomy: identification of IFN-alpha producing cells as a phenotypically and functionally distinct subset. *J Immunol* 186(3):1477-1485.
- Blank C, Gajewski TF & Mackensen A (2005) Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 54(4):307-314.
- Blasius AL, Giurisato E, Cella M, Schreiber RD, Shaw AS & Colonna M (2006) Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *J Immunol* 177(5):3260-3265.
- Blue CE, Spiller OB & Blackbourn DJ (2004) The relevance of complement to virus biology. *Virology* 319(2):176-184.
- Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T & Thompson CB (1995) CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3(1):87-98.

- Boks MA, Bruijns SC, Ambrosini M, Kalay H, van Bloois L, Storm G, Gruijl T & van Kooyk Y (2015) In situ Delivery of Tumor Antigen- and Adjuvant-Loaded Liposomes Boosts Antigen-Specific T-Cell Responses by Human Dermal Dendritic Cells. *The Journal of investigative dermatology* 10.1038/jid.2015.226.
- Bonehill A, Van Nuffel AM, Corthals J, Tuyaeerts S, Heirman C, Francois V, Colau D, van der Bruggen P, Neyns B & Thielemans K (2009) Single-step antigen loading and activation of dendritic cells by mRNA electroporation for the purpose of therapeutic vaccination in melanoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15(10):3366-3375.
- Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC & Steinman RM (2002) Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *The Journal of experimental medicine* 196(12):1627-1638.
- Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, Brimnes MK, Moltedo B, Moran TM & Steinman RM (2004) In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *The Journal of experimental medicine* 199(6):815-824.
- Bos R & Sherman LA (2010) CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer research* 70(21):8368-8377.
- Boscardin SB, Hafalla JC, Masilamani RF, Kamphorst AO, Zebroski HA, Rai U, Morrot A, Zavala F, Steinman RM, Nussenzweig RS & Nussenzweig MC (2006) Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *The Journal of experimental medicine* 203(3):599-606.
- Bosio CM, Moore BD, Warfield KL, Ruthel G, Mohamadzadeh M, Aman MJ & Bavari S (2004) Ebola and Marburg virus-like particles activate human myeloid dendritic cells. *Virology* 326(2):280-287.
- Bourquin C, Hotz C, Noerenberg D, Voelkl A, Heidegger S, Roetzer LC, Storch B, Sandholzer N, Wurzenberger C, Anz D & Endres S (2011) Systemic cancer therapy with a small molecule agonist of toll-like receptor 7 can be improved by circumventing TLR tolerance. *Cancer research* 71(15):5123-5133.
- Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay TM, Alaparthi S, Grosso JF, Korman AJ, Parker SM, Agrawal S, Goldberg SM, Pardoll DM, Gupta A & Wigginton JM (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *The New England journal of medicine* 366(26):2455-2465.
- Bramhall RJ, Mahady K & Peach AH (2014) Spontaneous regression of metastatic melanoma - clinical evidence of the abscopal effect. *Eur J Surg Oncol* 40(1):34-41.
- Brennan FR, Bellaby T, Helliwell SM, Jones TD, Kamstrup S, Dalsgaard K, Flock JI & Hamilton WD (1999a) Chimeric plant virus particles administered nasally or orally induce systemic and mucosal immune responses in mice. *Journal of virology* 73(2):930-938.
- Brennan FR, Gilleland LB, Staczek J, Bendig MM, Hamilton WD & Gilleland HE, Jr. (1999b) A chimaeric plant virus vaccine protects mice against a bacterial infection. *Microbiology* 145 (Pt 8):2061-2067.
- Brennan FR, Jones TD, Gilleland LB, Bellaby T, Xu F, North PC, Thompson A, Staczek J, Lin T, Johnson JE, Hamilton WD & Gilleland HE, Jr. (1999c) Pseudomonas aeruginosa outer-membrane protein F epitopes are highly immunogenic in mice when expressed on a plant virus. *Microbiology* 145 (Pt 1):211-220.
- Brennan FR, Jones TD, Longstaff M, Chapman S, Bellaby T, Smith H, Xu F, Hamilton WD & Flock JI (1999d) Immunogenicity of peptides derived from a fibronectin-binding protein of S. aureus expressed on two different plant viruses. *Vaccine* 17(15-16):1846-1857.

- Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F & Alexander J (1999) Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol* 163(12):6448-6454.
- Briesemeister D, Sommermeyer D, Loddenkemper C, Loew R, Uckert W, Blankenstein T & Kammertoens T (2011) Tumor rejection by local interferon gamma induction in established tumors is associated with blood vessel destruction and necrosis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 128(2):371-378.
- Bright RA, Carter DM, Daniluk S, Toapanta FR, Ahmad A, Gavrilov V, Massare M, Pushko P, Mytle N, Rowe T, Smith G & Ross TM (2007) Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. *Vaccine* 25(19):3871-3878.
- Brockman MA, Verschoor A, Zhu J, Carroll MC & Knipe DM (2006) Optimal long-term humoral responses to replication-defective herpes simplex virus require CD21/CD35 complement receptor expression on stromal cells. *Journal of virology* 80(14):7111-7117.
- Broderson JR (1989) A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. *Lab Anim Sci* 39(5):400-405.
- Broomfield SA, van der Most RG, Prosser AC, Mahendran S, Tovey MG, Smyth MJ, Robinson BW & Currie AJ (2009) Locally administered TLR7 agonists drive systemic antitumor immune responses that are enhanced by anti-CD40 immunotherapy. *J Immunol* 182(9):5217-5224.
- Brumfield S, Willits D, Tang L, Johnson JE, Douglas T & Young M (2004) Heterologous expression of the modified coat protein of Cowpea chlorotic mottle bromovirus results in the assembly of protein cages with altered architectures and function. *The Journal of general virology* 85(Pt 4):1049-1053.
- Bullock TN & Yagita H (2005) Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8+ T cell responses in the absence of CD4+ T cells. *J Immunol* 174(2):710-717.
- Bumcrot D, Manoharan M, Kotliansky V & Sah DW (2006) RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol* 2:711-719.
- Butts C, Maksymiuk A, Goss G, Soulieres D, Marshall E, Cormier Y, Ellis PM, Price A, Sawhney R, Beier F, Falk M & Murray N (2011) Updated survival analysis in patients with stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer receiving BLP25 liposome vaccine (L-BLP25): phase IIB randomized, multicenter, open-label trial. *J Cancer Res Clin Oncol* 137(9):1337-1342.
- Byrne SN & Halliday GM (2003) High levels of Fas ligand and MHC class II in the absence of CD80 or CD86 expression and a decreased CD4+ T cell infiltration, enables murine skin tumours to progress. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 52(6):396-402.
- Calabro S, Tortoli M, Baudner BC, Pacitto A, Cortese M, O'Hagan DT, De Gregorio E, Seubert A & Wack A (2011) Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* 29(9):1812-1823.
- Callan MF (2003) The evolution of antigen-specific CD8+ T cell responses after natural primary infection of humans with Epstein-Barr virus. *Viral immunology* 16(1):3-16.
- Carignan D, Therien A, Rioux G, Paquet G, Gagne ML, Bolduc M, Savard P & Leclerc D (2015) Engineering of the PapMV vaccine platform with a shortened M2e peptide leads to an effective one dose influenza vaccine. *Vaccine* 10.1016/j.vaccine.2015.10.123.
- Carlsson F, Getahun A, Rutemark C & Heyman B (2009) Impaired antibody responses but normal proliferation of specific CD4+ T cells in mice lacking complement receptors 1 and 2. *Scandinavian journal of immunology* 70(2):77-84.
- Carrillo-Infante C, Abbadessa G, Bagella L & Giordano A (2007) Viral infections as a cause of cancer (review). *International journal of oncology* 30(6):1521-1528.

- Carrio R, Rolle CE & Malek TR (2007) Non-redundant role for IL-7R signaling for the survival of CD8+ memory T cells. *European journal of immunology* 37(11):3078-3088.
- Carroll MC (2004) The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature immunology* 5(10):981-986.
- Carroll MC & Iseman DE (2012) Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity* 37(2):199-207.
- Carter RH, Spycher MO, Ng YC, Hoffman R & Fearon DT (1988) Synergistic interaction between complement receptor type 2 and membrane IgM on B lymphocytes. *J Immunol* 141(2):457-463.
- Castellino F, Huang AY, Altan-Bonnet G, Stoll S, Scheinecker C & Germain RN (2006) Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* 440(7086):890-895.
- Cedzynski M, Szymraj J, Swierczko AS, Bak-Romaniszyn L, Banasik M, Zeman K & Kilpatrick DC (2004) Mannan-binding lectin insufficiency in children with recurrent infections of the respiratory system. *Clinical and experimental immunology* 136(2):304-311.
- Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT & Falo LD, Jr. (1996) Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *The Journal of experimental medicine* 183(1):283-287.
- Chakraborty S, Rahman T & Chakravorty R (2014) Characterization of the Protective HIV-1 CTL Epitopes and the Corresponding HLA Class I Alleles: A Step towards Designing CTL Based HIV-1 Vaccine. *Advances in virology* 2014:321974.
- Chan CJ, Smyth MJ & Martinet L (2014) Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell death and differentiation* 21(1):5-14.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA & Group B-S (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England journal of medicine* 364(26):2507-2516.
- Chatterjee S, Crozet L, Damotte D, Iribarren K, Schramm C, Alifano M, Lupo A, Cherfils-Vicini J, Goc J, Katsahian S, Younes M, Dieu-Nosjean MC, Fridman WH, Sautes-Fridman C & Cremer I (2014) TLR7 Promotes Tumor Progression, Chemotherapy Resistance, and Poor Clinical Outcomes in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer research* 10.1158/0008-5472.CAN-13-2698.
- Chen L, Xu M, Wang ZY, Chen BW, Du WX, Su C, Shen XB, Zhao AH, Dong N, Wang YJ & Wang GZ (2010) The development and preliminary evaluation of a new Mycobacterium tuberculosis vaccine comprising Ag85b, HspX and CFP-10:ESAT-6 fusion protein with CpG DNA and aluminum hydroxide adjuvants. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59(1):42-52.
- Chen S, Zheng D, Li C, Zhang W, Xu W, Liu X, Fang F & Chen Z (2015) Protection against multiple subtypes of influenza viruses by virus-like particle vaccines based on a hemagglutinin conserved epitope. *BioMed research international* 2015:901817.
- Chen TH, Chen TH, Hu CC, Liao JT, Lee CW, Liao JW, Lin MY, Liu HJ, Wang MY, Lin NS & Hsu YH (2012) Induction of protective immunity in chickens immunized with plant-made chimeric Bamboo mosaic virus particles expressing very virulent Infectious bursal disease virus antigen. *Virus research* 166(1-2):109-115.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G & Wahl SM (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 198(12):1875-1886.
- Cheng C, Gall JG, Nason M, King CR, Koup RA, Roederer M, McElrath MJ, Morgan CA, Churchyard G, Baden LR, Duerr AC, Keefer MC, Graham BS & Nabel GJ (2010) Differential specificity and

- immunogenicity of adenovirus type 5 neutralizing antibodies elicited by natural infection or immunization. *Journal of virology* 84(1):630-638.
- Cheng X, Zengel JR, Suguitan AL, Jr., Xu Q, Wang W, Lin J & Jin H (2013) Evaluation of the humoral and cellular immune responses elicited by the live attenuated and inactivated influenza vaccines and their roles in heterologous protection in ferrets. *The Journal of infectious diseases* 208(4):594-602.
- Cherukuri A, Cheng PC & Pierce SK (2001a) The role of the CD19/CD21 complex in B cell processing and presentation of complement-tagged antigens. *J Immunol* 167(1):163-172.
- Cherukuri A, Cheng PC, Sohn HW & Pierce SK (2001b) The CD19/CD21 complex functions to prolong B cell antigen receptor signaling from lipid rafts. *Immunity* 14(2):169-179.
- Cho Y, Miyamoto M, Kato K, Fukunaga A, Shichinohe T, Kawarada Y, Hida Y, Oshikiri T, Kurokawa T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Murakami S, Shinohara T, Itoh T, Okushiba S, Kondo S & Katoh H (2003) CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer research* 63(7):1555-1559.
- Christensen D, Korsholm KS, Andersen P & Agger EM (2011) Cationic liposomes as vaccine adjuvants. *Expert review of vaccines* 10(4):513-521.
- Church SE, Jensen SM, Antony PA, Restifo NP & Fox BA (2013) Tumor-specific CD4 T cells maintain effector and memory tumor-specific CD8 T cells. *European journal of immunology* 10.1002/eji.201343718.
- Clausi A, Cumiskey J, Merkley S, Carpenter JF, Braun LJ & Randolph TW (2008) Influence of particle size and antigen binding on effectiveness of aluminum salt adjuvants in a model lysozyme vaccine. *Journal of pharmaceutical sciences* 97(12):5252-5262.
- Clifford GM, Polesel J, Rickenbach M, Dal Maso L, Keiser O, Kofler A, Rapiti E, Levi F, Jundt G, Fisch T, Bordoni A, De Weck D, Franceschi S & Swiss HIVC (2005) Cancer risk in the Swiss HIV Cohort Study: associations with immunodeficiency, smoking, and highly active antiretroviral therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 97(6):425-432.
- Co MD, Terajima M, Cruz J, Ennis FA & Rothman AL (2002) Human cytotoxic T lymphocyte responses to live attenuated 17D yellow fever vaccine: identification of HLA-B35-restricted CTL epitopes on nonstructural proteins NS1, NS2b, NS3, and the structural protein E. *Virology* 293(1):151-163.
- Colson P, Richet H, Desnues C, Balique F, Moal V, Grob JJ, Berbis P, Lecoq H, Harle JR, Berland Y & Raoult D (2010) Pepper mild mottle virus, a plant virus associated with specific immune responses, Fever, abdominal pains, and pruritus in humans. *PloS one* 5(4):e10041.
- Condotta SA, Richer MJ, Badovinac VP & Harty JT (2012) Probing CD8 T cell responses with *Listeria monocytogenes* infection. *Advances in immunology* 113:51-80.
- Conlon KC, Lugli E, Welles HC, Rosenberg SA, Fojo AT, Morris JC, Fleisher TA, Dubois SP, Perera LP, Stewart DM, Goldman CK, Bryant BR, Decker JM, Chen J, Worthy TA, Figg WD, Sr., Peer CJ, Sneller MC, Lane HC, Yovandich JL, Creekmore SP, Roederer M & Waldmann TA (2015) Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33(1):74-82.
- Conrad C, Gregorio J, Wang YH, Ito T, Meller S, Hanabuchi S, Anderson S, Atkinson N, Ramirez PT, Liu YJ, Freedman R & Gilliet M (2012) Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells. *Cancer research* 72(20):5240-5249.
- Coulthard LG & Woodruff TM (2015) Is the complement activation product C3a a proinflammatory molecule? Re-evaluating the evidence and the myth. *J Immunol* 194(8):3542-3548.

- Crane CA, Han SJ, Barry JJ, Ahn BJ, Lanier LL & Parsa AT (2010) TGF-beta downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8+ T cells in glioma patients. *Neuro Oncol* 12(1):7-13.
- Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z & Zou W (2013) T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Current opinion in immunology* 25(2):214-221.
- Croix DA, Ahearn JM, Rosengard AM, Han S, Kelsoe G, Ma M & Carroll MC (1996) Antibody response to a T-dependent antigen requires B cell expression of complement receptors. *The Journal of experimental medicine* 183(4):1857-1864.
- Cruz LJ, Rosalia RA, Kleinovink JW, Rueda F, Lowik CW & Ossendorp F (2014) Targeting nanoparticles to CD40, DEC-205 or CD11c molecules on dendritic cells for efficient CD8(+) T cell response: a comparative study. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 192:209-218.
- Csomor E, Bajtay Z, Sandor N, Kristof K, Arlaud GJ, Thiel S & Erdei A (2007) Complement protein C1q induces maturation of human dendritic cells. *Molecular immunology* 44(13):3389-3397.
- Cubas R, Zhang S, Kwon S, Sevick-Muraca EM, Li M, Chen C & Yao Q (2009) Virus-like particle (VLP) lymphatic trafficking and immune response generation after immunization by different routes. *J Immunother* 32(2):118-128.
- Cubas R, Zhang S, Li M, Chen C & Yao Q (2011) Chimeric Trop2 virus-like particles: a potential immunotherapeutic approach against pancreatic cancer. *J Immunother* 34(3):251-263.
- Cucak H, Yrlid U, Reizis B, Kalinke U & Johansson-Lindbom B (2009) Type I interferon signaling in dendritic cells stimulates the development of lymph-node-resident T follicular helper cells. *Immunity* 31(3):491-501.
- Cui W, Joshi NS, Jiang A & Kaech SM (2009) Effects of Signal 3 during CD8 T cell priming: Bystander production of IL-12 enhances effector T cell expansion but promotes terminal differentiation. *Vaccine* 27(15):2177-2187.
- Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK & Mescher MF (1999) Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 162(6):3256-3262.
- Curtsinger JM, Valenzuela JO, Agarwal P, Lins D & Mescher MF (2005) Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* 174(8):4465-4469.
- D'Aoust MA, Couture MM, Charland N, Trepanier S, Landry N, Ors F & Vezina LP (2010) The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant biotechnology journal* 8(5):607-619.
- D'Apice L, Costa V, Sartorius R, Trovato M, Aprile M & De Berardinis P (2015) Stimulation of Innate and Adaptive Immunity by Using Filamentous Bacteriophage fd Targeted to DEC-205. *J Immunol Res* 2015:585078.
- D'Souza WN & Lefrancois L (2003) IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J Immunol* 171(11):5727-5735.
- Daeron M (1997) Fc receptor biology. *Annual review of immunology* 15:203-234.
- Dalsgaard K, Uttenthal A, Jones TD, Xu F, Merryweather A, Hamilton WD, Langeveld JP, Boshuizen RS, Kamstrup S, Lomonosoff GP, Porta C, Vela C, Casal JI, Meloen RH & Rodgers PB (1997) Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nature biotechnology* 15(3):248-252.
- Damo M, Wilson DS, Simeoni E & Hubbell JA (2015) TLR-3 stimulation improves anti-tumor immunity elicited by dendritic cell exosome-based vaccines in a murine model of melanoma. *Sci Rep* 5:17622.

- Dar P, Kalaivanan R, Sied N, Mamo B, Kishore S, Suryanarayana VV & Kondabattula G (2013) Montanide ISA 201 adjuvanted FMD vaccine induces improved immune responses and protection in cattle. *Vaccine* 31(33):3327-3332.
- de Souza JB (2014) Protective immunity against malaria after vaccination. *Parasite immunology* 36(3):131-139.
- de Titta A, Ballester M, Julier Z, Nembrini C, Jeanbart L, van der Vlies AJ, Swartz MA & Hubbell JA (2013) Nanoparticle conjugation of CpG enhances adjuvancy for cellular immunity and memory recall at low dose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(49):19902-19907.
- de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Scharenborg NM, Engelen LP, Ruiter DJ, Gerritsen MJ, Croockewit S, Britten CM, Torensma R, Adema GJ, Figdor CG & Punt CJ (2003) Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9(14):5091-5100.
- de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H & de Vries JE (1991) Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *The Journal of experimental medicine* 174(4):915-924.
- Deguine J, Breart B, Lemaitre F, Di Santo JP & Bousso P (2010) Intravital imaging reveals distinct dynamics for natural killer and CD8(+) T cells during tumor regression. *Immunity* 33(4):632-644.
- Della Cioppa G, Vesikari T, Sokal E, Lindert K & Nicolay U (2011) Trivalent and quadrivalent MF59((R))-adjuvanted influenza vaccine in young children: a dose- and schedule-finding study. *Vaccine* 29(47):8696-8704.
- Demaria S, Ng B, Devitt ML, Babb JS, Kawashima N, Liebes L & Formenti SC (2004) Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 58(3):862-870.
- Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC & Fearon DT (1996) C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 271(5247):348-350.
- den Haan JM, Lehar SM & Bevan MJ (2000) CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 192(12):1685-1696.
- Dendouga N, Fochesato M, Lockman L, Mossman S & Giannini SL (2012) Cell-mediated immune responses to a varicella-zoster virus glycoprotein E vaccine using both a TLR agonist and QS21 in mice. *Vaccine* 30(20):3126-3135.
- Denis J, Acosta-Ramirez E, Zhao Y, Hamelin ME, Koukavica I, Baz M, Abed Y, Savard C, Pare C, Lopez Macias C, Boivin G & Leclerc D (2008) Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform. *Vaccine* 26(27-28):3395-3403.
- Denis J, Majeau N, Acosta-Ramirez E, Savard C, Bedard MC, Simard S, Lecours K, Bolduc M, Pare C, Willems B, Shoukry N, Tessier P, Lacasse P, Lamarre A, Lapointe R, Lopez Macias C & Leclerc D (2007) Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: evidence for the critical function of multimerization. *Virology* 363(1):59-68.
- Derre L, Corvaisier M, Charreau B, Moreau A, Godefroy E, Moreau-Aubry A, Jotereau F & Gervois N (2006) Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. *J Immunol* 177(5):3100-3107.
- Devaux P, Christiansen D, Plumet S & Gerlier D (2004) Cell surface activation of the alternative complement pathway by the fusion protein of measles virus. *The Journal of general virology* 85(Pt 6):1665-1673.

- Dhodapkar MV, Sznol M, Zhao B, Wang D, Carvajal RD, Keohan ML, Chuang E, Sanborn RE, Lutzky J, Powderly J, Kluger H, Tejwani S, Green J, Ramakrishna V, Crocker A, Vitale L, Yellin M, Davis T & Keler T (2014) Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. *Science translational medicine* 6(232):232ra251.
- Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, Straathof K, Liu E, Durett AG, Grilley B, Liu H, Cruz CR, Savoldo B, Gee AP, Schindler J, Krance RA, Heslop HE, Spencer DM, Rooney CM & Brenner MK (2011) Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *The New England journal of medicine* 365(18):1673-1683.
- Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, Kielland A, Vosters O, Vanderheyde N, Schiavetti F, Larocque D, Van Mechelen M & Garcon N (2009) AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol* 183(10):6186-6197.
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S & Reis e Sousa C (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303(5663):1529-1531.
- Diefenbach CS, Gnjatich S, Sabbatini P, Aghajanian C, Hensley ML, Spriggs DR, Iasonos A, Lee H, Dupont B, Pezzulli S, Jungbluth AA, Old LJ & Dupont J (2008) Safety and immunogenicity study of NY-ESO-1b peptide and montanide ISA-51 vaccination of patients with epithelial ovarian cancer in high-risk first remission. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14(9):2740-2748.
- Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, Koh A, Maliszewski C, Akira S & Pulendran B (2004) A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol* 172(8):4733-4743.
- Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN & Shevach EM (1993) IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 151(3):1224-1234.
- Diwan M, Elamanchili P, Cao M & Samuel J (2004) Dose sparing of CpG oligodeoxynucleotide vaccine adjuvants by nanoparticle delivery. *Current drug delivery* 1(4):405-412.
- Doherty PC, Christensen JP, Belz GT, Stevenson PG & Sangster MY (2001) Dissecting the host response to a gamma-herpesvirus. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 356(1408):581-593.
- Dolan BP, Gibbs KD, Jr. & Ostrand-Rosenberg S (2006) Dendritic cells cross-dressed with peptide MHC class I complexes prime CD8+ T cells. *J Immunol* 177(9):6018-6024.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS & Bradley A (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356(6366):215-221.
- Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E & Chen L (2002) Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine* 8(8):793-800.
- Donius LR, Handy JM, Weis JJ & Weis JH (2013) Optimal germinal center B cell activation and T-dependent antibody responses require expression of the mouse complement receptor Cr1. *J Immunol* 191(1):434-447.
- Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B & Brenner MK (2014) Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunological reviews* 257(1):107-126.
- Dovedi SJ, Adlard AL, Lipowska-Bhalla G, McKenna C, Jones S, Cheadle EJ, Stratford IJ, Poon E, Morrow M, Stewart R, Jones H, Wilkinson RW, Honeychurch J & Illidge TM (2014) Acquired resistance to fractionated radiotherapy can be overcome by concurrent PD-L1 blockade. *Cancer research* 74(19):5458-5468.

- Drobits B, Holcman M, Amberg N, Swiecki M, Grundtner R, Hammer M, Colonna M & Sibilio M (2012) Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *The Journal of clinical investigation* 122(2):575-585.
- Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U, Robbins PF, Huang J, Citrin DE, Leitman SF, Wunderlich J, Restifo NP, Thomasian A, Downey SG, Smith FO, Klapper J, Morton K, Laurencot C, White DE & Rosenberg SA (2008) Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26(32):5233-5239.
- Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE & Luster AD (2002) IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol* 168(7):3195-3204.
- Dummer R, Hauschild A, Becker JC, Grob JJ, Schadendorf D, Tebbs V, Skalsky J, Kaehler KC, Moosbauer S, Clark R, Meng TC & Urosevic M (2008) An exploratory study of systemic administration of the toll-like receptor-7 agonist 852A in patients with refractory metastatic melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14(3):856-864.
- Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, van Nest G, Ott G & McDonald DM (1998) Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. *Cellular immunology* 186(1):18-27.
- Duraisingham SS, Roupheal N, Cavanagh MM, Nakaya HI, Goronzy JJ & Pulendran B (2013) Systems biology of vaccination in the elderly. *Current topics in microbiology and immunology* 363:117-142.
- Duraiswamy J, Kaluza KM, Freeman GJ & Coukos G (2013) Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer research* 73(12):3591-3603.
- Durand V, Wong SY, Tough DF & Le Bon A (2006) IFN-alpha/beta-dependent cross-priming induced by specific toll-like receptor agonists. *Vaccine* 24 Suppl 2:S2-22-23.
- Durrani Z, McInerney TL, McLain L, Jones T, Bellaby T, Brennan FR & Dimmock NJ (1998) Intranasal immunization with a plant virus expressing a peptide from HIV-1 gp41 stimulates better mucosal and systemic HIV-1-specific IgA and IgG than oral immunization. *Journal of immunological methods* 220(1-2):93-103.
- Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS & Flavell RA (2008) Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453(7198):1122-1126.
- el-Lati SG, Dahinden CA & Church MK (1994) Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. *The Journal of investigative dermatology* 102(5):803-806.
- Ellebedy AH, Lupfer C, Ghoneim HE, DeBeauchamp J, Kanneganti TD & Webby RJ (2011) Inflammasome-independent role of the apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) in the adjuvant effect of MF59. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(7):2927-2932.
- Engel AL, Holt GE & Lu H (2011) The pharmacokinetics of Toll-like receptor agonists and the impact on the immune system. *Expert review of clinical pharmacology* 4(2):275-289.
- Engels EA, Pfeiffer RM, Fraumeni JF, Jr., Kasiske BL, Israni AK, Snyder JJ, Wolfe RA, Goodrich NP, Bayakly AR, Clarke CA, Copeland G, Finch JL, Fleissner ML, Goodman MT, Kahn A, Koch L, Lynch CF, Madeleine MM, Pawlish K, Rao C, Williams MA, Castenson D, Curry M, Parsons R, Fant G & Lin M (2011) Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA* 306(17):1891-1901.
- Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demareux N, Lanzavecchia A, Fransen J, Figdor CG, Piguet V & van Kooyk Y (2002) The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* 168(5):2118-2126.

- Enjji M, Yamaguchi K, Nakashima M, Ohta S, Kotoh K, Fukushima M, Kuniyoshi M, Tanaka M, Nakamuta M, Watanabe T & Nawata H (2004) Serum levels of soluble molecules associated with evasion of immune surveillance: a study in biliary disease. *Liver Int* 24(4):330-334.
- Erickson JW, Bancroft JB & Horne RW (1976) The assembly of papaya mosaic virus protein. *Virology* 72(2):514-517.
- Evans JT, Cluff CW, Johnson DA, Lacy MJ, Persing DH & Baldrige JR (2003) Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. *Expert review of vaccines* 2(2):219-229.
- Falkson CI, Ibrahim J, Kirkwood JM, Coates AS, Atkins MB & Blum RH (1998) Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 16(5):1743-1751.
- Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC & Puccetti P (2002) T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell death and differentiation* 9(10):1069-1077.
- Fang C, Miwa T, Shen H & Song WC (2007) Complement-dependent enhancement of CD8+ T cell immunity to lymphocytic choriomeningitis virus infection in decay-accelerating factor-deficient mice. *J Immunol* 179(5):3178-3186.
- Fang C, Zhang X, Miwa T & Song WC (2009) Complement promotes the development of inflammatory T-helper 17 cells through synergistic interaction with Toll-like receptor signaling and interleukin-6 production. *Blood* 114(5):1005-1015.
- Fang Y, Xu C, Fu YX, Holers VM & Molina H (1998) Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. *J Immunol* 160(11):5273-5279.
- Farber JM (1997) Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *Journal of leukocyte biology* 61(3):246-257.
- Fausther-Bovendo H & Kobinger GP (2014) Pre-existing immunity against Ad vectors: humoral, cellular, and innate response, what's important? *Human vaccines & immunotherapeutics* 10(10):2875-2884.
- Fearon DT & Carroll MC (2000) Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annual review of immunology* 18:393-422.
- Feau S, Garcia Z, Arens R, Yagita H, Borst J & Schoenberger SP (2012) The CD4(+) T-cell help signal is transmitted from APC to CD8(+) T-cells via CD27-CD70 interactions. *Nature communications* 3:948.
- Fenner F (1977) The eradication of smallpox. *Progress in medical virology. Fortschritte der medizinischen Virusforschung. Progres en virologie medicale* 23:1-21.
- Fernandez Gonzalez S, Jayasekera JP & Carroll MC (2008) Complement and natural antibody are required in the long-term memory response to influenza virus. *Vaccine* 26 Suppl 8:186-93.
- Fernandez-Fernandez MR, Martinez-Torrecuadrada JL, Casal JI & Garcia JA (1998) Development of an antigen presentation system based on plum pox potyvirus. *FEBS letters* 427(2):229-235.
- Fernandez-Fernandez MR, Martinez-Torrecuadrada JL, Roncal F, Dominguez E & Garcia JA (2002) Identification of immunogenic hot spots within plum pox potyvirus capsid protein for efficient antigen presentation. *Journal of virology* 76(24):12646-12653.
- Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, McKenzie IF & Plebanski M (2004) Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol* 173(5):3148-3154.

- Figuroa JE & Densen P (1991) Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clinical microbiology reviews* 4(3):359-395.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW & O'Garra A (1991) IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146(10):3444-3451.
- Fischer MB, Ma M, Goerg S, Zhou X, Xia J, Finco O, Han S, Kelsoe G, Howard RG, Rothstein TL, Kremmer E, Rosen FS & Carroll MC (1996) Regulation of the B cell response to T-dependent antigens by classical pathway complement. *J Immunol* 157(2):549-556.
- Fischer WH & Hugli TE (1997) Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF-alpha, IL-6, and the polyclonal immune response. *J Immunol* 159(9):4279-4286.
- Fitzgerald JC, Gao GP, Reyes-Sandoval A, Pavlakis GN, Xiang ZQ, Wlazlo AP, Giles-Davis W, Wilson JM & Ertl HC (2003) A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 gag. *J Immunol* 170(3):1416-1422.
- Florindo MI, de Aragao ME, da Silva AC, Otoch ML, Melo DF, Lima JA & Lima MG (2002) Immune response induced in mice oral immunization with cowpea severe mosaic virus. *Braz J Med Biol Res* 35(7):827-835.
- Folia Biotech Inc. (2015) Safety and Reactogenicity of a PAL Combined With Seasonal Flu Vaccine in Healthy Adults. in *ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). (NLM Identifier: NCT02188810, <https://clinicaltrials.gov/>).*
- Forghani P & Waller EK (2015) Poly (I: C) modulates the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells in a murine model of breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 10.1007/s10549-015-3508-y.
- Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E & Lipp M (1999) CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99(1):23-33.
- Fortier ME, Kent S, Ashdown H, Poole S, Boksa P & Luheshi GN (2004) The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287(4):R759-766.
- Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, Guillaume P, Luescher IF, Sander C, Kirkwood JM, Kuchroo V & Zarour HM (2010) Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *The Journal of experimental medicine* 207(10):2175-2186.
- Fox CB, Moutaftsi M, Vergara J, Desbien AL, Nana GI, Vedvick TS, Coler RN & Reed SG (2013) TLR4 ligand formulation causes distinct effects on antigen-specific cell-mediated and humoral immune responses. *Vaccine* 31(49):5848-5855.
- Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR & Weiss A (1991) Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 251(4991):313-316.
- Fraunhofer Center for Molecular Biotechnology (2000- [cited 2015 jul 21]) Safety and Immunogenicity of Plant-Derived Pfs25 VLP-FhCMB Malaria Transmission Blocking Vaccine in Healthy Adults. . in *ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). (NLM Identifier: NCT02013687, <https://clinicaltrials.gov/>).*
- Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR & Honjo T (2000) Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine* 192(7):1027-1034.
- French LE & Tschopp J (2002) Defective death receptor signaling as a cause of tumor immune escape. *Semin Cancer Biol* 12(1):51-55.

- Friede M, Muller S, Briand JP, Van Regenmortel MH & Schuber F (1993) Induction of immune response against a short synthetic peptide antigen coupled to small neutral liposomes containing monophosphoryl lipid A. *Molecular immunology* 30(6):539-547.
- Frosig TM, Lyngaa R, Met O, Larsen SK, Donia M, Svane IM, Thor Straten P & Hadrup SR (2015) Broadening the repertoire of melanoma-associated T-cell epitopes. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 64(5):609-620.
- Gallucci S, Lolkema M & Matzinger P (1999) Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nature medicine* 5(11):1249-1255.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH & Pages F (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313(5795):1960-1964.
- Gao Q, Wang XY, Qiu SJ, Yamato I, Sho M, Nakajima Y, Zhou J, Li BZ, Shi YH, Xiao YS, Xu Y & Fan J (2009) Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15(3):971-979.
- Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, Grob JJ, Malvey J, Newton-Bishop J, Stratigos A, Pehamberger H, Eggermont AM, European Dermatology F, European Association of D-O, European Organization of R & Treatment of C (2012) Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline--Update 2012. *Eur J Cancer* 48(15):2375-2390.
- Gasparini R, Amicizia D, Lai PL, Rossi S & Panatto D (2013) Effectiveness of adjuvanted seasonal influenza vaccines (Inflexal V (R) and Fluad (R)) in preventing hospitalization for influenza and pneumonia in the elderly: a matched case-control study. *Human vaccines & immunotherapeutics* 9(1):144-152.
- Gasser S, Orsulic S, Brown EJ & Raulet DH (2005) The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436(7054):1186-1190.
- Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, Wrzesinski C, Kerstann K, Yu Z, Finkelstein SE, Theoret MR, Rosenberg SA & Restifo NP (2005) Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *The Journal of clinical investigation* 115(6):1616-1626.
- Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, Almeida JR, Gostick E, Yu Z, Carpenito C, Wang E, Douek DC, Price DA, June CH, Marincola FM, Roederer M & Restifo NP (2011) A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature medicine* 17(10):1290-1297.
- Gattinoni L, Zhong XS, Palmer DC, Ji Y, Hinrichs CS, Yu Z, Wrzesinski C, Boni A, Cassard L, Garvin LM, Paulos CM, Muranski P & Restifo NP (2009) Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. *Nature medicine* 15(7):808-813.
- Ge Y, Xi H, Ju S & Zhang X (2013) Blockade of PD-1/PD-L1 immune checkpoint during DC vaccination induces potent protective immunity against breast cancer in hu-SCID mice. *Cancer letters* 336(2):253-259.
- Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y & Figdor CG (2000) Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100(5):575-585.
- Germanier R & Furer E (1983) Characteristics of the attenuated oral vaccine strain "S. typhi" Ty 21a. *Dev Biol Stand* 53:3-7.
- Ghiorzo P (2014) Genetic predisposition to pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology : WJG* 20(31):10778-10789.

- Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, Vermaelen K, Panaretakis T, Mignot G, Ullrich E, Perfettini JL, Schlemmer F, Tasdemir E, Uhl M, Genin P, Civas A, Ryffel B, Kanellopoulos J, Tschopp J, Andre F, Lidereau R, McLaughlin NM, Haynes NM, Smyth MJ, Kroemer G & Zitvogel L (2009) Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nature medicine* 15(10):1170-1178.
- Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, Solary E, Le Cesne A, Zitvogel L & Chauffert B (2007) Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 56(5):641-648.
- Giannini SL, Hanon E, Moris P, Van Mechelen M, Morel S, Dessy F, Fourneau MA, Colau B, Suzich J, Losonksy G, Martin MT, Dubin G & Wettendorff MA (2006) Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine* 24(33-34):5937-5949.
- Giraldo NA, Becht E, Remark R, Damotte D, Sautes-Fridman C & Fridman WH (2014) The immune contexture of primary and metastatic human tumours. *Current opinion in immunology* 27:8-15.
- GlaxoSmithKline (2015) *PRODUCT MONOGRAPH: FLUVIRAL.*, <http://www.gsk.ca/english/docs-pdf/product-monographs/Fluviral.pdf>
- Glenny A BG, Stevens M (1931) Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea-pigs: toxoid precipitated with alum. *J pathol Bacteriol* 34:267-275.
- Glenny A PC, Waddington H, Wallace U (1926) The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J pathol Bacteriol* 29:38-45.
- Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, Biota C, Doffin AC, Durand I, Olive D, Perez S, Pasqual N, Faure C, Ray-Coquard I, Puisieux A, Caux C, Blay JY & Menetrier-Caux C (2009) Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer research* 69(5):2000-2009.
- Gonzalez MJ, Plummer EM, Rae CS & Manchester M (2009) Interaction of Cowpea mosaic virus (CPMV) nanoparticles with antigen presenting cells in vitro and in vivo. *PLoS one* 4(11):e7981.
- Goto N & Akama K (1982) Histopathological studies of reactions in mice injected with aluminum-adsorbed tetanus toxoid. *Microbiology and immunology* 26(12):1121-1132.
- Goto N, Kato H, Maeyama J, Shibano M, Saito T, Yamaguchi J & Yoshihara S (1997) Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine* 15(12-13):1364-1371.
- Greentree LB (1983) Hodgkin's disease: therapeutic role of measles vaccine. *Am J Med* 75(6):928.
- Griffith JW, Sokol CL & Luster AD (2014) Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology* 32:659-702.
- Grimaldi AM, Simeone E, Giannarelli D, Muto P, Falivene S, Borzillo V, Giugliano FM, Sandomenico F, Petrillo A, Curvietto M, Esposito A, Paone M, Palla M, Palmieri G, Caraco C, Ciliberto G, Mozzillo N & Ascierto PA (2014) Abscopal effects of radiotherapy on advanced melanoma patients who progressed after ipilimumab immunotherapy. *Oncoimmunology* 3:e28780.
- Gross S (1971) Measles and leukaemia. *Lancet* 1(7695):397-398.
- Grun JL & Maurer PH (1989) Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: the role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses. *Cellular immunology* 121(1):134-145.
- Gueler F, Rong S, Gwinner W, Mengel M, Brocker V, Schon S, Greten TF, Hawlisch H, Polakowski T, Schnatbaum K, Menne J, Haller H & Shushakova N (2008) Complement 5a receptor inhibition improves renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol* 19(12):2302-2312.

- Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, Knoblaugh S, Cado D, Greenberg NM & Raulet DH (2008) NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 28(4):571-580.
- Guo RF & Ward PA (2005) Role of C5a in inflammatory responses. *Annual review of immunology* 23:821-852.
- Gupta A, Probst HC, Vuong V, Landshammer A, Muth S, Yagita H, Schwendener R, Pruschy M, Knuth A & van den Broek M (2012) Radiotherapy promotes tumor-specific effector CD8⁺ T cells via dendritic cell activation. *J Immunol* 189(2):558-566.
- Hafalla JC, Bauza K, Friesen J, Gonzalez-Aseguinolaza G, Hill AV & Matuschewski K (2013) Identification of targets of CD8(+) T cell responses to malaria liver stages by genome-wide epitope profiling. *PLoS pathogens* 9(5):e1003303.
- Hafner AM, Corthesy B & Merkle HP (2013) Particulate formulations for the delivery of poly(I:C) as vaccine adjuvant. *Advanced drug delivery reviews* 65(10):1386-1399.
- Hafner AM, Corthesy B, Textor M & Merkle HP (2011) Tuning the immune response of dendritic cells to surface-assembled poly(I:C) on microspheres through synergistic interactions between phagocytic and TLR3 signaling. *Biomaterials* 32(10):2651-2661.
- Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J & Tschopp J (1996) Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274(5291):1363-1366.
- Hajishengallis G & Lambris JD (2010) Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system. *Trends in immunology* 31(4):154-163.
- Hajishengallis G & Lambris JD (2011) Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 11(3):187-200.
- Hajishengallis G, Shakhathreh MA, Wang M & Liang S (2007) Complement receptor 3 blockade promotes IL-12-mediated clearance of Porphyromonas gingivalis and negates its virulence in vivo. *J Immunol* 179(4):2359-2367.
- Hallermalm K, De Geer A, Kiessling R, Levitsky V & Levitskaya J (2004) Autocrine secretion of Fas ligand shields tumor cells from Fas-mediated killing by cytotoxic lymphocytes. *Cancer research* 64(18):6775-6782.
- Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, Wolchok JD, Hersey P, Joseph RW, Weber JS, Dronca R, Gangadhar TC, Patnaik A, Zarour H, Joshua AM, Gergich K, Elassaiss-Schaap J, Algazi A, Mateus C, Boasberg P, Tumeh PC, Chmielowski B, Ebbinghaus SW, Li XN, Kang SP & Ribas A (2013) Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *The New England journal of medicine* 369(2):134-144.
- Hanafi LA, Bolduc M, Gagne ME, Dufour F, Langelier Y, Boulassel MR, Routy JP, Leclerc D & Lapointe R (2010) Two distinct chimeric potexviruses share antigenic cross-presentation properties of MHC class I epitopes. *Vaccine* 28(34):5617-5626.
- Hansen B, Belfast M, Soung G, Song L, Egan PM, Capen R, Hogenesch H, Mancinelli R & Hem SL (2009) Effect of the strength of adsorption of hepatitis B surface antigen to aluminum hydroxide adjuvant on the immune response. *Vaccine* 27(6):888-892.
- Hansen B, Sokolovska A, Hogenesch H & Hem SL (2007) Relationship between the strength of antigen adsorption to an aluminum-containing adjuvant and the immune response. *Vaccine* 25(36):6618-6624.
- Hansen RM & Libnoch JA (1978) Remission of chronic lymphocytic leukemia after smallpox vaccination. *Arch Intern Med* 138(7):1137-1138.
- Hanson MC, Abraham W, Crespo MP, Chen SH, Liu H, Szeto GL, Kim M, Reinherz EL & Irvine DJ (2015) Liposomal vaccines incorporating molecular adjuvants and intrastuctural T-cell help promote the immunogenicity of HIV membrane-proximal external region peptides. *Vaccine* 33(7):861-868.

- Harding CV & Song R (1994) Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol* 153(11):4925-4933.
- Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH & Allison JP (1992) CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356(6370):607-609.
- Harlin H, Kuna TV, Peterson AC, Meng Y & Gajewski TF (2006) Tumor progression despite massive influx of activated CD8(+) T cells in a patient with malignant melanoma ascites. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 55(10):1185-1197.
- Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingluff C, McKee M & Gajewski TF (2009) Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer research* 69(7):3077-3085.
- Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, Zahaf T, Innis B, Naud P, De Carvalho NS, Roteli-Martins CM, Teixeira J, Blatter MM, Korn AP, Quint W & Dubin G (2004) Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 364(9447):1757-1765.
- Harty JT, Lenz LL & Bevan MJ (1996) Primary and secondary immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Current opinion in immunology* 8(4):526-530.
- Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM & Nussenzweig MC (2001) Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *The Journal of experimental medicine* 194(6):769-779.
- Hawlich H, Belkaid Y, Baelder R, Hildeman D, Gerard C & Kohl J (2005) C5a negatively regulates toll-like receptor 4-induced immune responses. *Immunity* 22(4):415-426.
- He XS, Holmes TH, Zhang C, Mahmood K, Kemble GW, Lewis DB, Dekker CL, Greenberg HB & Arvin AM (2006) Cellular immune responses in children and adults receiving inactivated or live attenuated influenza vaccines. *Journal of virology* 80(23):11756-11766.
- Heeger PS, Lalli PN, Lin F, Valujskikh A, Liu J, Muqim N, Xu Y & Medof ME (2005) Decay-accelerating factor modulates induction of T cell immunity. *The Journal of experimental medicine* 201(10):1523-1530.
- Hem SL & Hogenesch H (2007) Relationship between physical and chemical properties of aluminum-containing adjuvants and immunopotentiality. *Expert review of vaccines* 6(5):685-698.
- Herrin DM, Coates EE, Costner PJ, Kemp TJ, Nason MC, Saharia KK, Pan Y, Sarwar UN, Holman L, Yamshchikov G, Koup RA, Pang YY, Seder RA, Schiller JT, Graham BS, Pinto LA & Ledgerwood JE (2014) Comparison of adaptive and innate immune responses induced by licensed vaccines for Human Papillomavirus. *Human vaccines & immunotherapeutics* 10(12):3446-3454.
- Hertz CJ, Kiertscher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV, Roth MD & Modlin RL (2001) Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 166(4):2444-2450.
- Hervas-Stubbs S, Mancheno U, Riezu-Boj JI, Larraga A, Ochoa MC, Alignani D, Alfaro C, Morales-Kastresana A, Gonzalez I, Larrea E, Pircher H, Le Bon A, Lopez-Picazo JM, Martin-Algarra S, Prieto J & Melero I (2012) CD8 T cell priming in the presence of IFN-alpha renders CTLs with improved responsiveness to homeostatic cytokines and recall antigens: important traits for adoptive T cell therapy. *J Immunol* 189(7):3299-3310.
- Hervas-Stubbs S, Olivier A, Boisgerault F, Thieblemont N & Leclerc C (2007) TLR3 ligand stimulates fully functional memory CD8+ T cells in the absence of CD4+ T-cell help. *Blood* 109(12):5318-5326.
- Hervas-Stubbs S, Perez-Gracia JL, Rouzaut A, Sanmamed MF, Le Bon A & Melero I (2011) Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(9):2619-2627.

- Herzog C, Hartmann K, Kunzi V, Kursteiner O, Mischler R, Lazar H & Gluck R (2009) Eleven years of Inflexal V-a virosomal adjuvanted influenza vaccine. *Vaccine* 27(33):4381-4387.
- Hinrichs CS, Borman ZA, Cassard L, Gattinoni L, Spolski R, Yu Z, Sanchez-Perez L, Muranski P, Kern SJ, Logun C, Palmer DC, Ji Y, Reger RN, Leonard WJ, Danner RL, Rosenberg SA & Restifo NP (2009) Adoptively transferred effector cells derived from naive rather than central memory CD8+ T cells mediate superior antitumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(41):17469-17474.
- Hinrichs CS, Borman ZA, Gattinoni L, Yu Z, Burns WR, Huang J, Klebanoff CA, Johnson LA, Kerkar SP, Yang S, Muranski P, Palmer DC, Scott CD, Morgan RA, Robbins PF, Rosenberg SA & Restifo NP (2011) Human effector CD8+ T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood* 117(3):808-814.
- Hiraoka K, Miyamoto M, Cho Y, Suzuoki M, Oshikiri T, Nakakubo Y, Itoh T, Ohbuchi T, Kondo S & Katoh H (2006) Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *British journal of cancer* 94(2):275-280.
- Hobo W, Novobrantseva TI, Fredrix H, Wong J, Milstein S, Epstein-Barash H, Liu J, Schaap N, van der Voort R & Dolstra H (2013) Improving dendritic cell vaccine immunogenicity by silencing PD-1 ligands using siRNA-lipid nanoparticles combined with antigen mRNA electroporation. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 62(2):285-297.
- Hodge JW, Garnett CT, Farsaci B, Palena C, Tsang KY, Ferrone S & Gameiro SR (2013) Chemotherapy-induced immunogenic modulation of tumor cells enhances killing by cytotoxic T lymphocytes and is distinct from immunogenic cell death. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 133(3):624-636.
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebba C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A & Urba WJ (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 363(8):711-723.
- Hojo S, Koizumi K, Tsuneyama K, Arita Y, Cui Z, Shinohara K, Minami T, Hashimoto I, Nakayama T, Sakurai H, Takano Y, Yoshie O, Tsukada K & Saiki I (2007) High-level expression of chemokine CXCL16 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Cancer research* 67(10):4725-4731.
- Holst B, Raby AC, Hall JE & Labeta MO (2012) Complement takes its Toll: an inflammatory crosstalk between Toll-like receptors and the receptors for the complement anaphylatoxin C5a. *Anaesthesia* 67(1):60-64.
- Holz L & Rehermann B (2015) T cell responses in hepatitis C virus infection: historical overview and goals for future research. *Antiviral research* 114:96-105.
- Hong M, Puaux AL, Huang C, Loumagne L, Tow C, Mackay C, Kato M, Prevost-Blondel A, Avril MF, Nardin A & Abastado JP (2011) Chemotherapy induces intratumoral expression of chemokines in cutaneous melanoma, favoring T-cell infiltration and tumor control. *Cancer research* 71(22):6997-7009.
- Honko AN, Sriranganathan N, Lees CJ & Mizel SB (2006) Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infection and immunity* 74(2):1113-1120.
- Hoover R & Fraumeni JF, Jr. (1973) Risk of cancer in renal-transplant recipients. *Lancet* 2(7820):55-57.
- Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA & Latz E (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology* 9(8):847-856.

- Hou B, Saudan P, Ott G, Wheeler ML, Ji M, Kuzmich L, Lee LM, Coffman RL, Bachmann MF & DeFranco AL (2011) Selective utilization of Toll-like receptor and MyD88 signaling in B cells for enhancement of the antiviral germinal center response. *Immunity* 34(3):375-384.
- Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, Mahendravada A, Zhang M, Vera J, Heslop HE, Rooney CM, Brenner MK & Dotti G (2010) Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia* 24(6):1160-1170.
- Hu X, Liu R & Zhu N (2013) Enhancement of humoral and cellular immune responses by monophosphoryl lipid A (MPLA) as an adjuvant to the rabies vaccine in BALB/c mice. *Immunobiology* 218(12):1524-1528.
- Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D & Levitsky H (1994) Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264(5161):961-965.
- Huarte E, Cubillos-Ruiz JR, Nesbeth YC, Scarlett UK, Martinez DG, Buckanovich RJ, Benencia F, Stan RV, Keler T, Sarobe P, Sentman CL & Conejo-Garcia JR (2008) Depletion of dendritic cells delays ovarian cancer progression by boosting antitumor immunity. *Cancer research* 68(18):7684-7691.
- Hugli TE (1990) Structure and function of C3a anaphylatoxin. *Current topics in microbiology and immunology* 153:181-208.
- Huysamen C, Willment JA, Dennehy KM & Brown GD (2008) CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes. *The Journal of biological chemistry* 283(24):16693-16701.
- Idorn M, Kollgaard T, Kongsted P, Sengelov L & Thor Straten P (2014) Correlation between frequencies of blood monocytic myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and negative prognostic markers in patients with castration-resistant metastatic prostate cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 63(11):1177-1187.
- Illidge T (2015) Turning Radiotherapy into an Effective Systemic Anti-cancer Treatment in Combination with Immunotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 27:696-699.
- Imai T, Ishida H, Suzue K, Taniguchi T, Okada H, Shimokawa C & Hisaeda H (2015) Cytotoxic activities of CD8(+) T cells collaborate with macrophages to protect against blood-stage murine malaria. *eLife* 4.
- InvivoGen (2013) *Multi-TLR Agonists: Potential for Therapeutic Success.*, <http://www.invivogen.com/review-multi-prr-ligands>
- Ito M, Minamiya Y, Kawai H, Saito S, Saito H, Nakagawa T, Imai K, Hirokawa M & Ogawa J (2006) Tumor-derived TGFbeta-1 induces dendritic cell apoptosis in the sentinel lymph node. *J Immunol* 176(9):5637-5643.
- Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T & Minato N (2002) Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(19):12293-12297.
- Iyer S, HogenEsch H & Hem SL (2003) Relationship between the degree of antigen adsorption to aluminum hydroxide adjuvant in interstitial fluid and antibody production. *Vaccine* 21(11-12):1219-1223.
- Jaafar F, Righi E, Lindstrom V, Linton C, Nohadani M, Van Noorden S, Lloyd T, Poznansky J, Stamp G, Dina R, Coleman DV & Poznansky MC (2009) Correlation of CXCL12 expression and FoxP3+ cell infiltration with human papillomavirus infection and clinicopathological progression of cervical cancer. *The American journal of pathology* 175(4):1525-1535.
- Jabbari A & Harty JT (2006) Secondary memory CD8+ T cells are more protective but slower to acquire a central-memory phenotype. *The Journal of experimental medicine* 203(4):919-932.

- Jackson CG, Ochs HD & Wedgwood RJ (1979) Immune response of a patient with deficiency of the fourth component of complement and systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine* 300(20):1124-1129.
- Jackson DC, Lau YF, Le T, Suhrbier A, Deliyannis G, Cheers C, Smith C, Zeng W & Brown LE (2004) A totally synthetic vaccine of generic structure that targets Toll-like receptor 2 on dendritic cells and promotes antibody or cytotoxic T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(43):15440-15445.
- Jager E, Ringhoffer M, Altmannsberger M, Arand M, Karbach J, Jager D, Oesch F & Knuth A (1997) Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 71(2):142-147.
- Janelle V, Carli C, Taillefer J, Orio J & Delisle JS (2015) Defining novel parameters for the optimal priming and expansion of minor histocompatibility antigen-specific T cells in culture. *Journal of translational medicine* 13:123.
- Jang SI, Lillehoj HS, Lee SH, Lee KW, Lillehoj EP, Bertrand F, Dupuis L & Deville S (2011) Montanide ISA 71 VG adjuvant enhances antibody and cell-mediated immune responses to profilin subunit antigen vaccination and promotes protection against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. *Exp Parasitol* 127(1):178-183.
- Janssen EM, Droin NM, Lemmens EE, Pinkoski MJ, Bensinger SJ, Ehst BD, Griffith TS, Green DR & Schoenberger SP (2005) CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434(7029):88-93.
- Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG & Schoenberger SP (2003) CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421(6925):852-856.
- Jennings GT & Bachmann MF (2008) The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biological chemistry* 389(5):521-536.
- Jensen FC, Savary JR, Diveley JP & Chang JC (1998) Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. *Advanced drug delivery reviews* 32(3):173-186.
- Jiang H, Wang Z, Serra D, Frank MM & Amalfitano A (2004) Recombinant adenovirus vectors activate the alternative complement pathway, leading to the binding of human complement protein C3 independent of anti-ad antibodies. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 10(6):1140-1142.
- Jiang L, Li Q, Li M, Zhou Z, Wu L, Fan J, Zhang Q, Zhu H & Xu Z (2006) A modified TMV-based vector facilitates the expression of longer foreign epitopes in tobacco. *Vaccine* 24(2):109-115.
- Jobsri J, Allen A, Rajagopal D, Shipton M, Kanyuka K, Lomonosoff GP, Ottensmeier C, Diebold SS, Stevenson FK & Savelyeva N (2015) Plant Virus Particles Carrying Tumour Antigen Activate TLR7 and Induce High Levels of Protective Antibody. *PloS one* 10(2):e0118096.
- Joelson T, Akerblom L, Oxelfelt P, Strandberg B, Tomenius K & Morris TJ (1997) Presentation of a foreign peptide on the surface of tomato bushy stunt virus. *The Journal of general virology* 78 (Pt 6):1213-1217.
- Joffre OP, Segura E, Savina A & Amigorena S (2012) Cross-presentation by dendritic cells. *Nature reviews. Immunology* 12(8):557-569.
- Johnson JB, Lyles DS, Alexander-Miller MA & Parks GD (2012) Virion-associated complement regulator CD55 is more potent than CD46 in mediating resistance of mumps virus and vesicular stomatitis virus to neutralization. *Journal of virology* 86(18):9929-9940.
- Johnson S, Zhan Y, Sutherland RM, Mount AM, Bedoui S, Brady JL, Carrington EM, Brown LE, Belz GT, Heath WR & Lew AM (2009) Selected Toll-like receptor ligands and viruses promote helper-

- independent cytotoxic T cell priming by upregulating CD40L on dendritic cells. *Immunity* 30(2):218-227.
- Jonasch E, Kumar UN, Linette GP, Hodi FS, Soiffer RJ, Ryan BF, Sober AJ, Mihm MC, Tsao H, Langley RG, Cosimi BA, Gadd MA, Tanabe KK, Souba W, Haynes HA, Barnhill R, Osteen R & Haluska FG (2000) Adjuvant high-dose interferon alfa-2b in patients with high-risk melanoma. *Cancer J* 6(3):139-145.
- Jones RM, Chichester JA, Mett V, Jaje J, Tottey S, Manceva S, Casta LJ, Gibbs SK, Musiychuk K, Shamloul M, Norikane J, Mett V, Streatfield SJ, van de Vegte-Bolmer M, Roeffen W, Sauerwein RW & Yusibov V (2013) A plant-produced Pfs25 VLP malaria vaccine candidate induces persistent transmission blocking antibodies against Plasmodium falciparum in immunized mice. *PLoS one* 8(11):e79538.
- Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tuting T, Thurner-Schuler B, Stuge TB, Paragnik L, Kandemir A, Lee PP, Schuler G, Knop J & Enk AH (2001) A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 93(2):243-251.
- Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J & Enk AH (1997) Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *European journal of immunology* 27(12):3135-3142.
- Joseph C & Gattineni J (2013) Complement disorders and hemolytic uremic syndrome. *Curr Opin Pediatr* 25(2):209-215.
- Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, Hagman J, Gapin L & Kaech SM (2007) Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* 27(2):281-295.
- Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer EG, Littman DR & Lang RA (2002) In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17(2):211-220.
- Kaczorowski DJ, Afrazi A, Scott MJ, Kwak JH, Gill R, Edmonds RD, Liu Y, Fan J & Billiar TR (2010) Pivotal advance: The pattern recognition receptor ligands lipopolysaccharide and polyinosine-polycytidylic acid stimulate factor B synthesis by the macrophage through distinct but overlapping mechanisms. *Journal of leukocyte biology* 88(4):609-618.
- Kadri A, Wege C & Jeske H (2013) In vivo self-assembly of TMV-like particles in yeast and bacteria for nanotechnological applications. *Journal of virological methods* 189(2):328-340.
- Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD & Ahmed R (2003) Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nature immunology* 4(12):1191-1198.
- Kalb ML, Glaser A, Sary G, Koszik F & Stingl G (2012) TRAIL(+) human plasmacytoid dendritic cells kill tumor cells in vitro: mechanisms of imiquimod- and IFN-alpha-mediated antitumor reactivity. *J Immunol* 188(4):1583-1591.
- Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Wierenga EA & Kapsenberg ML (1999) Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol* 162(6):3231-3236.
- Kaltgrad E, Sen Gupta S, Punna S, Huang CY, Chang A, Wong CH, Finn MG & Blixt O (2007) Anti-carbohydrate antibodies elicited by polyvalent display on a viral scaffold. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* 8(12):1455-1462.
- Kammer AR, Amacker M, Rasi S, Westerfeld N, Gremion C, Neuhaus D & Zurbriggen R (2007) A new and versatile virosomal antigen delivery system to induce cellular and humoral immune responses. *Vaccine* 25(41):7065-7074.

- Kamphorst AO & Ahmed R (2013) Manipulating the PD-1 pathway to improve immunity. *Current opinion in immunology* 25(3):381-388.
- Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, Xu Y, Frohlich MW, Schellhammer PF & Investigators IS (2010) Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The New England journal of medicine* 363(5):411-422.
- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ & Schreiber RD (1998) Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(13):7556-7561.
- Karpova O, Nikitin N, Chirkov S, Trifonova E, Sheveleva A, Lazareva E & Atabekov J (2012) Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens. *The Journal of general virology* 93(Pt 2):400-407.
- Kastenmuller K, Wille-Reece U, Lindsay RW, Trager LR, Darrah PA, Flynn BJ, Becker MR, Udey MC, Clausen BE, Igyarto BZ, Kaplan DH, Kastenmuller W, Germain RN & Seder RA (2011) Protective T cell immunity in mice following protein-TLR7/8 agonist-conjugate immunization requires aggregation, type I IFN, and multiple DC subsets. *The Journal of clinical investigation* 121(5):1782-1796.
- Kasturi SP, Skountzou I, Albrecht RA, Koutsouanos D, Hua T, Nakaya HI, Ravindran R, Stewart S, Alam M, Kwissa M, Villinger F, Murthy N, Steel J, Jacob J, Hogan RJ, Garcia-Sastre A, Compans R & Pulendran B (2011) Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* 470(7335):543-547.
- Kato M, McDonald KJ, Khan S, Ross IL, Vuckovic S, Chen K, Munster D, MacDonald KP & Hart DN (2006) Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. *International immunology* 18(6):857-869.
- Kazaks A, Balmaks R, Voronkova T, Ose V & Pumpens P (2008) Melanoma vaccine candidates from chimeric hepatitis B core virus-like particles carrying a tumor-associated MAGE-3 epitope. *Biotechnology journal* 3(11):1429-1436.
- Ke Y & Kapp JA (1996) Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake. *The Journal of experimental medicine* 184(3):1179-1184.
- Kemnade JO, Seethammagari M, Collinson-Pautz M, Kaur H, Spencer DM & McCormick AA (2014) Tobacco mosaic virus efficiently targets DC uptake, activation and antigen-specific T cell responses in vivo. *Vaccine* 32(33):4228-4233.
- Kershaw MH, Westwood JA, Slaney CY & Darcy PK (2014) Clinical application of genetically modified T cells in cancer therapy. *Clin Transl Immunology* 3(5):e16.
- Khaled YS, Ammori BJ & Elkord E (2014) Increased levels of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood and tumour tissue of pancreatic cancer patients. *J Immunol Res* 2014:879897.
- Khor IW, Lin T, Langedijk JP, Johnson JE & Manchester M (2002) Novel strategy for inhibiting viral entry by use of a cellular receptor-plant virus chimera. *Journal of virology* 76(9):4412-4419.
- Khurana S, Chearwae W, Castellino F, Manischewitz J, King LR, Honorkiewicz A, Rock MT, Edwards KM, Del Giudice G, Rappuoli R & Golding H (2010) Vaccines with MF59 adjuvant expand the antibody repertoire to target protective sites of pandemic avian H5N1 influenza virus. *Science translational medicine* 2(15):15ra15.
- Kikuchi T, Moore MA & Crystal RG (2000) Dendritic cells modified to express CD40 ligand elicit therapeutic immunity against preexisting murine tumors. *Blood* 96(1):91-99.

- Kim MC, Song JM, O E, Kwon YM, Lee YJ, Compans RW & Kang SM (2013) Virus-like particles containing multiple M2 extracellular domains confer improved cross-protection against various subtypes of influenza virus. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 21(2):485-492.
- Kim R, Emi M & Tanabe K (2007) Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121(1):1-14.
- Kim S, Elkouss KB & Ma X (2004) Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity* 21(5):643-653.
- Kim SH, Chen S, Jiang X, Green KY & Samal SK (2015) Immunogenicity of Newcastle disease virus vectors expressing Norwalk virus capsid protein in the presence or absence of VP2 protein. *Virology* 484:163-169.
- Kinlen LJ, Webster AD, Bird AG, Haile R, Peto J, Soothill JF & Thompson RA (1985) Prospective study of cancer in patients with hypogammaglobulinaemia. *Lancet* 1(8423):263-266.
- Klaus GG & Humphrey JH (1977) The generation of memory cells. I. The role of C3 in the generation of B memory cells. *Immunology* 33(1):31-40.
- Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, Kerstann K, Cardones AR, Finkelstein SE, Palmer DC, Antony PA, Hwang ST, Rosenberg SA, Waldmann TA & Restifo NP (2005) Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(27):9571-9576.
- Klimek L & Pfaar O (2013a) A comparison of immunotherapy delivery methods for allergen immunotherapy. *Expert review of clinical immunology* 9(5):465-474; quiz 475.
- Klimek L, Schendzielorz P, Mueller P, Saudan P & Willers J (2013b) Immunotherapy of allergic rhinitis: new therapeutic opportunities with virus-like particles filled with CpG motifs. *American journal of rhinology & allergy* 27(3):206-212.
- Kloss CC, Condomines M, Cartellieri M, Bachmann M & Sadelain M (2013) Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nature biotechnology* 31(1):71-75.
- Kock MA, Hew BE, Bammert H, Fritzing DC & Vogel CW (2004) Structure and function of recombinant cobra venom factor. *The Journal of biological chemistry* 279(29):30836-30843.
- Kodama T, Takeda K, Shimoizato O, Hayakawa Y, Atsuta M, Kobayashi K, Ito M, Yagita H & Okumura K (1999) Perforin-dependent NK cell cytotoxicity is sufficient for anti-metastatic effect of IL-12. *European journal of immunology* 29(4):1390-1396.
- Kohl J (2006) The role of complement in danger sensing and transmission. *Immunologic research* 34(2):157-176.
- Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J & Murali-Krishna K (2005) Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *The Journal of experimental medicine* 202(5):637-650.
- Kondera-Anasz Z, Mielczarek-Palacz A & Sikora J (2005) Soluble Fas receptor and soluble Fas ligand in the serum of women with uterine tumors. *Apoptosis* 10(5):1143-1149.
- Koo M, Bendahmane M, Lettieri GA, Paoletti AD, Lane TE, Fitch JH, Buchmeier MJ & Beachy RN (1999) Protective immunity against murine hepatitis virus (MHV) induced by intranasal or subcutaneous administration of hybrids of tobacco mosaic virus that carries an MHV epitope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(14):7774-7779.
- Kool M, Soullie T, van Nimwegen M, Willart MA, Muskens F, Jung S, Hoogsteden HC, Hammad H & Lambrecht BN (2008) Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 205(4):869-882.

- Kopf M, Abel B, Gallimore A, Carroll M & Bachmann MF (2002) Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. *Nature medicine* 8(4):373-378.
- Kotaki R, Wajima S, Shiokawa A & Hachimura S (2015) Toll-like receptor 2 suppresses Toll-like receptor 9 responses in Peyer's patch dendritic cells. *Immunobiology* 220(6):734-743.
- Kozono Y, Abe R, Kozono H, Kelly RG, Azuma T & Holers VM (1998) Cross-linking CD21/CD35 or CD19 increases both B7-1 and B7-2 expression on murine splenic B cells. *J Immunol* 160(4):1565-1572.
- Krieg AM (2007) Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *The Journal of clinical investigation* 117(5):1184-1194.
- Krishnan V, Ponnuraj K, Xu Y, Macon K, Volanakis JE & Narayana SV (2009) The crystal structure of cobra venom factor, a cofactor for C3- and C5-convertase CVFBb. *Structure* 17(4):611-619.
- Krummel MF & Allison JP (1995) CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The Journal of experimental medicine* 182(2):459-465.
- Kumar S, Ochoa W, Singh P, Hsu C, Schneemann A, Manchester M, Olson M & Reddy V (2009) Tomato bushy stunt virus (TBSV), a versatile platform for polyvalent display of antigenic epitopes and vaccine design. *Virology* 388(1):185-190.
- Kundi M (2007) New hepatitis B vaccine formulated with an improved adjuvant system. *Expert review of vaccines* 6(2):133-140.
- Kuroda E, Ishii KJ, Uematsu S, Ohata K, Coban C, Akira S, Aritake K, Urade Y & Morimoto Y (2011) Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms. *Immunity* 34(4):514-526.
- Kutzler MA, Robinson TM, Chattergoon MA, Choo DK, Choo AY, Choe PY, Ramanathan MP, Parkinson R, Kudchodkar S, Tamura Y, Sidhu M, Roopchand V, Kim JJ, Pavlakis GN, Felber BK, Waldmann TA, Boyer JD & Weiner DB (2005) Coimmunization with an optimized IL-15 plasmid results in enhanced function and longevity of CD8 T cells that are partially independent of CD4 T cell help. *J Immunol* 175(1):112-123.
- Kwissa M, Nakaya HI, Oluoch H & Pulendran B (2012) Distinct TLR adjuvants differentially stimulate systemic and local innate immune responses in nonhuman primates. *Blood* 119(9):2044-2055.
- Kwong B, Liu H & Irvine DJ (2011) Induction of potent anti-tumor responses while eliminating systemic side effects via liposome-anchored combinatorial immunotherapy. *Biomaterials* 32(22):5134-5147.
- Kyte JA & Gaudernack G (2006) Immuno-gene therapy of cancer with tumour-mRNA transfected dendritic cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 55(11):1432-1442.
- Ia Sala A, Gadina M & Kelsall BL (2005) G(i)-protein-dependent inhibition of IL-12 production is mediated by activation of the phosphatidylinositol 3-kinase-protein 3 kinase B/Akt pathway and JNK. *J Immunol* 175(5):2994-2999.
- Lacasse P, Denis J, Lapointe R, Leclerc D & Lamarre A (2008) Novel plant virus-based vaccine induces protective cytotoxic T-lymphocyte-mediated antiviral immunity through dendritic cell maturation. *Journal of virology* 82(2):785-794.
- Lachmann PJ & Halbwachs L (1975) The influence of C3b inactivator (KAF) concentration on the ability of serum to support complement activation. *Clinical and experimental immunology* 21(1):109-114.
- Lacombe MH, Hardy MP, Rooney J & Labrecque N (2005) IL-7 receptor expression levels do not identify CD8+ memory T lymphocyte precursors following peptide immunization. *J Immunol* 175(7):4400-4407.
- Ladel CH, Flesch IE, Arnoldi J & Kaufmann SH (1994) Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both MHC I- and MHC II-dependent T cell responses on *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 153(7):3116-3122.

- Lalli PN, Strainic MG, Lin F, Medof ME & Heeger PS (2007) Decay accelerating factor can control T cell differentiation into IFN-gamma-producing effector cells via regulating local C5a-induced IL-12 production. *J Immunol* 179(9):5793-5802.
- Lalli PN, Strainic MG, Yang M, Lin F, Medof ME & Heeger PS (2008) Locally produced C5a binds to T cell-expressed C5aR to enhance effector T-cell expansion by limiting antigen-induced apoptosis. *Blood* 112(5):1759-1766.
- Lan T, Kandimalla ER, Yu D, Bhagat L, Li Y, Wang D, Zhu F, Tang JX, Putta MR, Cong Y, Trombino AF, Sullivan T & Agrawal S (2007) Stabilized immune modulatory RNA compounds as agonists of Toll-like receptors 7 and 8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(34):13750-13755.
- Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A & Sallusto F (2000) Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nature immunology* 1(4):311-316.
- Langeveld JP, Brennan FR, Martinez-Torrecuadrada JL, Jones TD, Boshuizen RS, Vela C, Casal JI, Kamstrup S, Dalsgaard K, Meloen RH, Bendig MM & Hamilton WD (2001) Inactivated recombinant plant virus protects dogs from a lethal challenge with canine parvovirus. *Vaccine* 19(27):3661-3670.
- Lanitis E, Poussin M, Klattenhoff AW, Song D, Sandaltzopoulos R, June CH & Powell DJ, Jr. (2013) Chimeric antigen receptor T Cells with dissociated signaling domains exhibit focused antitumor activity with reduced potential for toxicity in vivo. *Cancer immunology research* 1(1):43-53.
- Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH & Freeman GJ (2001) PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology* 2(3):261-268.
- Laudisi F, Spreafico R, Evrard M, Hughes TR, Mandriani B, Kandasamy M, Morgan BP, Sivasankar B & Mortellaro A (2013) Cutting edge: the NLRP3 inflammasome links complement-mediated inflammation and IL-1beta release. *J Immunol* 191(3):1006-1010.
- Laufer J, Katz Y & Passwell JH (2001) Extrahepatic synthesis of complement proteins in inflammation. *Molecular immunology* 38(2-3):221-229.
- Le Bon A, Durand V, Kamphuis E, Thompson C, Bulfone-Paus S, Rossmann C, Kalinke U & Tough DF (2006) Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming. *J Immunol* 176(8):4682-4689.
- Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, Gewert D, Borrow P & Tough DF (2003) Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nature immunology* 4(10):1009-1015.
- Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F & Tough DF (2001) Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14(4):461-470.
- Le Bon A & Tough DF (2002) Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Current opinion in immunology* 14(4):432-436.
- Le Bon A & Tough DF (2008) Type I interferon as a stimulus for cross-priming. *Cytokine & growth factor reviews* 19(1):33-40.
- Le Mercier I, Poujol D, Sanlaville A, Sisirak V, Gobert M, Durand I, Dubois B, Treilleux I, Marvel J, Vlach J, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Caux C, Puisieux I & Goutagny N (2013) Tumor promotion by intratumoral plasmacytoid dendritic cells is reversed by TLR7 ligand treatment. *Cancer research* 73(11):3058-3068.
- Lebel ME, Chartrand K, Leclerc D & Lamarre A (2015) Plant Viruses as Nanoparticle-Based Vaccines and Adjuvants. *Vaccines (Basel)* 3(3):620-637.

- Lebel ME, Chartrand K, Tarrab E, Savard P, Leclerc D & Lamarre A (2016) Potentiating Cancer Immunotherapy Using Papaya Mosaic Virus-Derived Nanoparticles. *Nano letters* 10.1021/acs.nanolett.5b04877.
- Lebel ME, Daudelin JF, Chartrand K, Tarrab E, Kalinke U, Savard P, Labrecque N, Leclerc D & Lamarre A (2014) Nanoparticle adjuvant sensing by TLR7 enhances CD8+ T cell-mediated protection from *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 192(3):1071-1078.
- Leclerc D, Beauseigle D, Denis J, Morin H, Pare C, Lamarre A & Lapointe R (2007) Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells. *J Virol* 81(3):1319-1326.
- Leclerc D, Rivest M, Babin C, Lopez-Macias C & Savard P (2013) A novel M2e based flu vaccine formulation for dogs. *PLoS one* 8(10):e77084.
- Lee TJ, Utsinger PD, Snyderman R, Yount WJ & Sparling PF (1978) Familial deficiency of the seventh component of complement associated with recurrent bacteremic infections due to *Neisseria*. *The Journal of infectious diseases* 138(3):359-368.
- Legha SS (1997) The role of interferon alfa in the treatment of metastatic melanoma. *Seminars in oncology* 24(1 Suppl 4):S24-31.
- Lenz P, Day PM, Pang YY, Frye SA, Jensen PN, Lowy DR & Schiller JT (2001) Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J Immunol* 166(9):5346-5355.
- Leroux-Roels I, Borkowski A, Vanwolleghem T, Drame M, Clement F, Hons E, Devaster JM & Leroux-Roels G (2007) Antigen sparing and cross-reactive immunity with an adjuvanted rH5N1 prototype pandemic influenza vaccine: a randomised controlled trial. *Lancet* 370(9587):580-589.
- Leroux-Roels I, Roman F, Forgius S, Maes C, De Boever F, Drame M, Gillard P, van der Most R, Van Mechelen M, Hanon E & Leroux-Roels G (2010) Priming with AS03 A-adjuvanted H5N1 influenza vaccine improves the kinetics, magnitude and durability of the immune response after a heterologous booster vaccination: an open non-randomised extension of a double-blind randomised primary study. *Vaccine* 28(3):849-857.
- Lesterhuis WJ, Punt CJ, Hato SV, Eleveld-Trancikova D, Jansen BJ, Nierkens S, Schreiber G, de Boer A, Van Herpen CM, Kaanders JH, van Krieken JH, Adema GJ, Figdor CG & de Vries IJ (2011) Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice. *The Journal of clinical investigation* 121(8):3100-3108.
- Levesque PM, Foster K & de Alwis U (2006) Association between immunogenicity and adsorption of a recombinant *Streptococcus pneumoniae* vaccine antigen by an aluminum adjuvant. *Human vaccines* 2(2):74-77.
- Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M & Cao X (2009a) Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* 182(1):240-249.
- Li H, Nookala S & Re F (2007) Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release. *J Immunol* 178(8):5271-5276.
- Li H, Willingham SB, Ting JP & Re F (2008) Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol* 181(1):17-21.
- Li L, Kim S, Herndon JM, Goedegebuure P, Belt BA, Satpathy AT, Fleming TP, Hansen TH, Murphy KM & Gillanders WE (2012) Cross-dressed CD8alpha+/CD103+ dendritic cells prime CD8+ T cells following vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(31):12716-12721.
- Li L, Victoria JG, Wang C, Jones M, Fellers GM, Kunz TH & Delwart E (2010) Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *Journal of virology* 84(14):6955-6965.

- Li X, Aldayel AM & Cui Z (2014) Aluminum hydroxide nanoparticles show a stronger vaccine adjuvant activity than traditional aluminum hydroxide microparticles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 173:148-157.
- Li X, Sloat BR, Yanasarn N & Cui Z (2011) Relationship between the size of nanoparticles and their adjuvant activity: data from a study with an improved experimental design. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 78(1):107-116.
- Li XL, Zhang D, Knight D, Odaka Y, Glass J, Mathis JM & Zhang QJ (2009b) Priming of immune responses against transporter associated with antigen processing (TAP)-deficient tumours: tumour direct priming. *Immunology* 128(3):420-428.
- Liao JB (2006) Viruses and human cancer. *The Yale journal of biology and medicine* 79(3-4):115-122.
- Lico C, Mancini C, Italiani P, Betti C, Boraschi D, Benvenuto E & Baschieri S (2009) Plant-produced potato virus X chimeric particles displaying an influenza virus-derived peptide activate specific CD8+ T cells in mice. *Vaccine* 27(37):5069-5076.
- Lindblad EB (2006) Are mineral adjuvants triggering TLR2/TLR4 on dendritic cells by a secondary cascade reaction in vivo through the action of heat shock proteins and danger signals? *Vaccine* 24(6):697-698.
- Lindblad EB, Elhay MJ, Silva R, Appelberg R & Andersen P (1997) Adjuvant modulation of immune responses to tuberculosis subunit vaccines. *Infection and immunity* 65(2):623-629.
- Lindsay RW, Darrah PA, Quinn KM, Wille-Reece U, Mattei LM, Iwasaki A, Kasturi SP, Pulendran B, Gall JG, Spies AG & Seder RA (2010) CD8+ T cell responses following replication-defective adenovirus serotype 5 immunization are dependent on CD11c+ dendritic cells but show redundancy in their requirement of TLR and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor signaling. *J Immunol* 185(3):1513-1521.
- Linnemann C, van Buuren MM, Bies L, Verdegaal EM, Schotte R, Calis JJ, Behjati S, Velds A, Hilkmann H, Atmioui DE, Visser M, Stratton MR, Haanen JB, Spits H, van der Burg SH & Schumacher TN (2015) High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nature medicine* 21(1):81-85.
- Linsley PS & Ledbetter JA (1993) The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annual review of immunology* 11:191-212.
- Lipson EJ, Vincent JG, Loyo M, Kagohara LT, Lubber BS, Wang H, Xu H, Nayar SK, Wang TS, Sidransky D, Anders RA, Topalian SL & Taube JM (2013) PD-L1 expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, Merkel cell polyomavirus and overall survival. *Cancer immunology research* 1(1):54-63.
- Liu C, Lou Y, Lizée G, Qin H, Liu S, Rabinovich B, Kim GJ, Wang YH, Ye Y, Sikora AG, Overwijk WW, Liu YJ, Wang G & Hwu P (2008) Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *The Journal of clinical investigation* 118(3):1165-1175.
- Liu R, Vaishnav RA, Roberts AM & Friedland RP (2013) Humans have antibodies against a plant virus: evidence from tobacco mosaic virus. *PLoS one* 8(4):e60621.
- Livingstone AM & Kuhn M (1999) Dendritic cells need T cell help to prime cytotoxic T cell responses to strong antigens. *European journal of immunology* 29(9):2826-2834.
- Lizotte PH, Wen AM, Sheen MR, Fields J, Rojanasopondist P, Steinmetz NF & Fiering S (2015) In situ vaccination with cowpea mosaic virus nanoparticles suppresses metastatic cancer. *Nature nanotechnology* 10.1038/nnano.2015.292.
- Loirat C & Fremeaux-Bacchi V (2011) Atypical hemolytic uremic syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 6:60.

- Lorimore SA, Coates PJ, Scobie GE, Milne G & Wright EG (2001) Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects? *Oncogene* 20(48):7085-7095.
- Lozupone F, Rivoltini L, Luciani F, Venditti M, Lugini L, Cova A, Squarcina P, Parmiani G, Belardelli F & Fais S (2003) Adoptive transfer of an anti-MART-1(27-35)-specific CD8+ T cell clone leads to immunoselection of human melanoma antigen-loss variants in SCID mice. *European journal of immunology* 33(2):556-566.
- Lublin DM & Atkinson JP (1989) Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annual review of immunology* 7:35-58.
- Luft T, Pang KC, Thomas E, Hertzog P, Hart DN, Trapani J & Cebon J (1998) Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J Immunol* 161(4):1947-1953.
- Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A & Flavell RA (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(15):5598-5603.
- Ly LV, Sluijter M, Versluis M, Luyten GP, van Stipdonk MJ, van der Burg SH, Melief CJ, Jager MJ & van Hall T (2010) Peptide vaccination after T-cell transfer causes massive clonal expansion, tumor eradication, and manageable cytokine storm. *Cancer research* 70(21):8339-8346.
- Lynch H, Synder C & Wang SM (2015) Considerations for comprehensive assessment of genetic predisposition in familial breast cancer. *Breast J* 21(1):67-75.
- Ma F, Zhang J, Zhang J & Zhang C (2010) The TLR7 agonists imiquimod and gardiquimod improve DC-based immunotherapy for melanoma in mice. *Cellular & molecular immunology* 7(5):381-388.
- Ma R, Du JL, Huang J & Wu CY (2007) Additive effects of CpG ODN and R-848 as adjuvants on augmenting immune responses to HBsAg vaccination. *Biochemical and biophysical research communications* 361(2):537-542.
- Ma Y & Li J (2011) Vesicular stomatitis virus as a vector to deliver virus-like particles of human norovirus: a new vaccine candidate against an important noncultivable virus. *Journal of virology* 85(6):2942-2952.
- Maeurer MJ, Gollin SM, Martin D, Swaney W, Bryant J, Castelli C, Robbins P, Parmiani G, Storkus WJ & Lotze MT (1996) Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *The Journal of clinical investigation* 98(7):1633-1641.
- Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, Ellis IO & Green AR (2011) Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29(15):1949-1955.
- Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M & Steinman RM (2000) The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 151(3):673-684.
- Mahnke K, Qian Y, Fondel S, Brueck J, Becker C & Enk AH (2005) Targeting of antigens to activated dendritic cells in vivo cures metastatic melanoma in mice. *Cancer research* 65(15):7007-7012.
- Mahoney KM, Rennert PD & Freeman GJ (2015) Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nature reviews. Drug discovery* 14(8):561-584.
- Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilkens CM, Kapsenberg ML, Kirkwood JM, Storkus WJ & Kalinski P (2004) alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer research* 64(17):5934-5937.
- Maleno I, Cabrera CM, Cabrera T, Paco L, Lopez-Nevot MA, Collado A, Ferron A & Garrido F (2004) Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA

- haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Immunogenetics* 56(4):244-253.
- Mallajosyula JK, Hiatt E, Hume S, Johnson A, Jeevan T, Chikwamba R, Pogue GP, Bratcher B, Haydon H, Webby RJ & McCormick AA (2014) Single-dose monomeric HA subunit vaccine generates full protection from influenza challenge. *Human vaccines & immunotherapeutics* 10(3):586-595.
- Malyala P, Chesko J, Ugozzoli M, Goodsell A, Zhou F, Vajdy M, O'Hagan DT & Singh M (2008) The potency of the adjuvant, CpG oligos, is enhanced by encapsulation in PLG microparticles. *Journal of pharmaceutical sciences* 97(3):1155-1164.
- Mangsbo SM, Sanchez J, Anger K, Lambris JD, Ekdahl KN, Loskog AS, Nilsson B & Totterman TH (2009) Complement activation by CpG in a human whole blood loop system: mechanisms and immunomodulatory effects. *J Immunol* 183(10):6724-6732.
- Mannhalter JW, Neychev HO, Zlabinger GJ, Ahmad R & Eibl MM (1985) Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. *Clinical and experimental immunology* 61(1):143-151.
- Manolova V, Flace A, Bauer M, Schwarz K, Saudan P & Bachmann MF (2008) Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European journal of immunology* 38(5):1404-1413.
- Mant A, Chinnery F, Elliott T & Williams AP (2012) The pathway of cross-presentation is influenced by the particle size of phagocytosed antigen. *Immunology* 136(2):163-175.
- Marconi G, Albertini E, Barone P, De Marchis F, Lico C, Marusic C, Rutili D, Veronesi F & Porceddu A (2006) In planta production of two peptides of the Classical Swine Fever Virus (CSFV) E2 glycoprotein fused to the coat protein of potato virus X. *BMC biotechnology* 6:29.
- Marusic C, Rizza P, Lattanzi L, Mancini C, Spada M, Belardelli F, Benvenuto E & Capone I (2001) Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 75(18):8434-8439.
- Masopust D, Ha SJ, Vezys V & Ahmed R (2006) Stimulation history dictates memory CD8 T cell phenotype: implications for prime-boost vaccination. *J Immunol* 177(2):831-839.
- Masopust D, Vezys V, Marzo AL & Lefrancois L (2001) Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 291(5512):2413-2417.
- Massa C, Thomas C, Wang E, Marincola F & Seliger B (2015) Different maturation cocktails provide dendritic cells with different chemoattractive properties. *Journal of translational medicine* 13(1):175.
- Massa S, Simeone P, Muller A, Benvenuto E, Venuti A & Franconi R (2008) Antitumor activity of DNA vaccines based on the human papillomavirus-16 E7 protein genetically fused to a plant virus coat protein. *Human gene therapy* 19(4):354-364.
- Matassov D, Cupo A & Galarza JM (2007) A novel intranasal virus-like particle (VLP) vaccine designed to protect against the pandemic 1918 influenza A virus (H1N1). *Viral immunology* 20(3):441-452.
- Matheoud D, Baey C, Vimeux L, Tempez A, Valente M, Louche P, Le Bon A, Hosmalin A & Feuillet V (2011) Dendritic cells crosspresent antigens from live B16 cells more efficiently than from apoptotic cells and protect from melanoma in a therapeutic model. *PLoS one* 6(4):e19104.
- Mathieu C, Rioux G, Dumas MC & Leclerc D (2013) Induction of innate immunity in lungs with virus-like nanoparticles leads to protection against influenza and Streptococcus pneumoniae challenge. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 9:839-848.
- Mathieu MC, Sawyer N, Greig GM, Hamel M, Kargman S, Ducharme Y, Lau CK, Friesen RW, O'Neill GP, Gervais FG & Therien AG (2005) The C3a receptor antagonist SB 290157 has agonist activity. *Immunology letters* 100(2):139-145.

- Matsuzaki J, Gnjatic S, Mhaweche-Fauceglia P, Beck A, Miller A, Tsuji T, Eppolito C, Qian F, Lele S, Shrikant P, Old LJ & Odunsi K (2010) Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(17):7875-7880.
- Matthews N, Stark JM, Harper PS, Doran J & Jones DM (1980) Recurrent meningococcal infections associated with a functional deficiency of the C8 component of human complement. *Clinical and experimental immunology* 39(1):53-59.
- Maugh TH (1981) FDA approves hepatitis B vaccine. *Science* 214(4525):1113.
- McBride SJ, McCluskey DR & Jackson PT (1991) Selective C7 complement deficiency causing recurrent meningococcal infection. *J Infect* 22(3):273-276.
- McCormick AA, Corbo TA, Wykoff-Clary S, Nguyen LV, Smith ML, Palmer KE & Pogue GP (2006a) TMV-peptide fusion vaccines induce cell-mediated immune responses and tumor protection in two murine models. *Vaccine* 24(40-41):6414-6423.
- McCormick AA, Corbo TA, Wykoff-Clary S, Palmer KE & Pogue GP (2006b) Chemical conjugate TMV-peptide bivalent fusion vaccines improve cellular immunity and tumor protection. *Bioconjugate chemistry* 17(5):1330-1338.
- McInerney TL, Brennan FR, Jones TD & Dimmock NJ (1999) Analysis of the ability of five adjuvants to enhance immune responses to a chimeric plant virus displaying an HIV-1 peptide. *Vaccine* 17(11-12):1359-1368.
- McKeage K & Romanowski B (2011) AS04-adjuvanted human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 vaccine (Cervarix(R)): a review of its use in the prevention of premalignant cervical lesions and cervical cancer causally related to certain oncogenic HPV types. *Drugs* 71(4):465-488.
- Medicago (2000- [cited 2015 jul 21]) Immunogenicity, Safety and Tolerability of a Plant-Derived Seasonal Virus-Like-Particle Quadrivalent Influenza Vaccine in Adults. in *ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). (NLM Identifier: NCT02188810, <https://clinicaltrials.gov/>).*
- Mehlen P & Puisieux A (2006) Metastasis: a question of life or death. *Nature reviews. Cancer* 6(6):449-458.
- Meraz IM, Savage DJ, Segura-Ibarra V, Li J, Rhudy J, Gu J & Serda RE (2014) Adjuvant cationic liposomes presenting MPL and IL-12 induce cell death, suppress tumor growth, and alter the cellular phenotype of tumors in a murine model of breast cancer. *Molecular pharmaceuticals* 11(10):3484-3491.
- Meri S, Morgan BP, Davies A, Daniels RH, Olavesen MG, Waldmann H & Lachmann PJ (1990) Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology* 71(1):1-9.
- Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V & Roumenina LT (2015a) Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Frontiers in immunology* 6:262.
- Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V & Roumenina LT (2015b) Complement System Part II: Role in Immunity. *Frontiers in immunology* 6:257.
- Mettens P, Dubois PM, Demoitie MA, Bayat B, Donner MN, Bourguignon P, Stewart VA, Heppner DG, Jr., Garcon N & Cohen J (2008) Improved T cell responses to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein in mice and monkeys induced by a novel formulation of RTS,S vaccine antigen. *Vaccine* 26(8):1072-1082.
- Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D & Elkon KB (1998) Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *The Journal of experimental medicine* 188(12):2313-2320.
- Meyer-Wentrup F, Benitez-Ribas D, Tacke PJ, Punt CJ, Figdor CG, de Vries IJ & Adema GJ (2008) Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN-alpha production. *Blood* 111(8):4245-4253.

- Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierbeck G, Tilgen W, Seiter S, Gore M, Aamdal S, Cebon J, Coates A, Dreno B, Henz M, Schadendorf D, Kapp A, Weiss J, Fraass U, Statkevich P, Muller M & Thatcher N (2000) Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18(1):158-166.
- Miermont A, Barnhill H, Strable E, Lu X, Wall KA, Wang Q, Finn MG & Huang X (2008) Cowpea mosaic virus capsid: a promising carrier for the development of carbohydrate based antitumor vaccines. *Chemistry* 14(16):4939-4947.
- Mitchell DA, Batich KA, Gunn MD, Huang MN, Sanchez-Perez L, Nair SK, Congdon KL, Reap EA, Archer GE, Desjardins A, Friedman AH, Friedman HS, Herndon JE, 2nd, Coan A, McLendon RE, Reardon DA, Vredenburgh JJ, Bigner DD & Sampson JH (2015) Tetanus toxoid and CCL3 improve dendritic cell vaccines in mice and glioblastoma patients. *Nature* 519(7543):366-369.
- Mitsushashi M, Liu J, Cao S, Shi X & Ma X (2004) Regulation of interleukin-12 gene expression and its anti-tumor activities by prostaglandin E2 derived from mammary carcinomas. *Journal of leukocyte biology* 76(2):322-332.
- Mocikat R, Braumuller H, Gumy A, Egeter O, Ziegler H, Reusch U, Bubeck A, Louis J, Mailhammer R, Riethmuller G, Koszinowski U & Rocken M (2003) Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 19(4):561-569.
- Molenkamp BG, van Leeuwen PA, Meijer S, Sluijter BJ, Wijnands PG, Baars A, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ & de Grujil TD (2007) Intradermal CpG-B activates both plasmacytoid and myeloid dendritic cells in the sentinel lymph node of melanoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13(10):2961-2969.
- Molina H, Holers VM, Li B, Fung Y, Mariathasan S, Goellner J, Strauss-Schoenberger J, Karr RW & Chaplin DD (1996) Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(8):3357-3361.
- Monteagudo C, Martin JM, Jorda E & Llombart-Bosch A (2007) CXCR3 chemokine receptor immunoreactivity in primary cutaneous malignant melanoma: correlation with clinicopathological prognostic factors. *J Clin Pathol* 60(6):596-599.
- Moorthy V & Hill AV (2002) Malaria vaccines. *British medical bulletin* 62:59-72.
- Morefield GL, Sokolovska A, Jiang D, HogenEsch H, Robinson JP & Hem SL (2005) Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. *Vaccine* 23(13):1588-1595.
- Morgan BP & Gasque P (1997) Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? *Clinical and experimental immunology* 107(1):1-7.
- Morgan EL, Thoman ML, Weigle WO & Hugli TE (1983) Anaphylatoxin-mediated regulation of the immune response. II. C5a-mediated enhancement of human humoral and T cell-mediated immune responses. *J Immunol* 130(3):1257-1261.
- Morgan EL, Weigle WO & Hugli TE (1982) Anaphylatoxin-mediated regulation of the immune response. I. C3a-mediated suppression of human and murine humoral immune responses. *The Journal of experimental medicine* 155(5):1412-1426.
- Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM & Rosenberg SA (2010) Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18(4):843-851.
- Morris JT & Kelly WJ (1992) Recurrence of neisserial meningococemia due to deficiency of terminal complement component. *South Med J* 85(10):1030-1031.

- Mosca F, Tritto E, Muzzi A, Monaci E, Bagnoli F, Iavarone C, O'Hagan D, Rappuoli R & De Gregorio E (2008) Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(30):10501-10506.
- Mossad SB (2003) Demystifying FluMist, a new intranasal, live influenza vaccine. *Cleve Clin J Med* 70(9):801-806.
- Moulton RA, Mashruwala MA, Smith AK, Lindsey DR, Wetsel RA, Haviland DL, Hunter RL & Jagannath C (2007) Complement C5a anaphylatoxin is an innate determinant of dendritic cell-induced Th1 immunity to Mycobacterium bovis BCG infection in mice. *Journal of leukocyte biology* 82(4):956-967.
- Mueller A, Kadri A, Jeske H & Wege C (2010) In vitro assembly of Tobacco mosaic virus coat protein variants derived from fission yeast expression clones or plants. *Journal of virological methods* 166(1-2):77-85.
- Mueller BU & Pizzo PA (1995) Cancer in children with primary or secondary immunodeficiencies. *J Pediatr* 126(1):1-10.
- Mumberg D, Monach PA, Wanderling S, Philip M, Toledano AY, Schreiber RD & Schreiber H (1999) CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(15):8633-8638.
- Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D & Mellor AL (2005) GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* 22(5):633-642.
- Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, Antonia SJ, Messina JL, Chandler P, Koni PA & Mellor AL (2004) Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *The Journal of clinical investigation* 114(2):280-290.
- Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaveri KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, Slingluff CL, Jr. & Mellor AL (2002) Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 297(5588):1867-1870.
- Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, Slansky J & Ahmed R (1998) Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 8(2):177-187.
- Muthamilselvan T, Lee CW, Cho YH, Wu FC, Hu CC, Liang YC, Lin NS & Hsu YH (2015) A transgenic plant cell-suspension system for expression of epitopes on chimeric Bamboo mosaic virus particles. *Plant biotechnology journal* 10.1111/pbi.12377.
- Myklebust JH, Irish JM, Brody J, Czerwinski DK, Houot R, Kohrt HE, Timmerman J, Said J, Green MR, Delabie J, Kolstad A, Alizadeh AA & Levy R (2013) High PD-1 expression and suppressed cytokine signaling distinguish T cells infiltrating follicular lymphoma tumors from peripheral T cells. *Blood* 121(8):1367-1376.
- Nair-Gupta P, Baccarini A, Tung N, Seyffer F, Florey O, Huang Y, Banerjee M, Overholtzer M, Roche PA, Tampe R, Brown BD, Amsen D, Whiteheart SW & Blander JM (2014) TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation. *Cell* 158(3):506-521.
- Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H & Ohtani H (1998) CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer research* 58(16):3491-3494.
- Nakamura S, Yang CS, Sakon N, Ueda M, Tougan T, Yamashita A, Goto N, Takahashi K, Yasunaga T, Ikuta K, Mizutani T, Okamoto Y, Tagami M, Morita R, Maeda N, Kawai J, Hayashizaki Y, Nagai Y, Horii T, Iida T & Nakaya T (2009) Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach. *PloS one* 4(1):e4219.

- Nanni P, Colombo MP, De Giovanni C, Lollini PL, Nicoletti G, Parmiani G & Prodi G (1983) Impaired H-2 expression in B16 melanoma variants. *J Immunogenet* 10(5):361-370.
- Natilla A, Piazzolla G, Nuzzaci M, Saldarelli P, Tortorella C, Antonaci S & Piazzolla P (2004) Cucumber mosaic virus as carrier of a hepatitis C virus-derived epitope. *Archives of virology* 149(1):137-154.
- Navratil JS & Ahearn JM (2000) Apoptosis and autoimmunity: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *Curr Rheumatol Rep* 2(1):32-38.
- Nazareth MR, Broderick L, Simpson-Abelson MR, Kelleher RJ, Jr., Yokota SJ & Bankert RB (2007) Characterization of human lung tumor-associated fibroblasts and their ability to modulate the activation of tumor-associated T cells. *J Immunol* 178(9):5552-5562.
- Nelson MH, Bowers JS, Bailey SR, Diven MA, Fugle CW, Kaiser AD, Wrzesinski C, Liu B, Restifo NP & Paulos CM (2016) Toll-like receptor agonist therapy can profoundly augment the antitumor activity of adoptively transferred CD8(+) T cells without host preconditioning. *Journal for immunotherapy of cancer* 4:6.
- Nesbit M, Schaidt H, Miller TH & Herlyn M (2001) Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells. *J Immunol* 166(11):6483-6490.
- Nevens F, Zuckerman JN, Burroughs AK, Jung MC, Bayas JM, Kallinowski B, Rivas EF, Duvoux C, Neuhaus P, Saliba F, Buti M, Zarski JP, Pons F, Vanlemmens C, Hamtiaux V & Stoffel M (2006) Immunogenicity and safety of an experimental adjuvanted hepatitis B candidate vaccine in liver transplant patients. *Liver Transpl* 12(10):1489-1495.
- Nicholas BL, Brennan FR, Hamilton WD & Wakelin D (2003) Effect of priming/booster immunisation protocols on immune response to canine parvovirus peptide induced by vaccination with a chimaeric plant virus construct. *Vaccine* 21(19-20):2441-2447.
- Nicholas BL, Brennan FR, Martinez-Torrecuadrada JL, Casal JI, Hamilton WD & Wakelin D (2002) Characterization of the immune response to canine parvovirus induced by vaccination with chimaeric plant viruses. *Vaccine* 20(21-22):2727-2734.
- Nicholson A & Lepow IH (1979) Host defense against *Neisseria meningitidis* requires a complement-dependent bactericidal activity. *Science* 205(4403):298-299.
- Niederquell M, Kurig S, Fischer JA, Tomiuk S, Swiecki M, Colonna M, Johnston IC & Dzionek A (2013) Sca-1 expression defines developmental stages of mouse pDCs that show functional heterogeneity in the endosomal but not lysosomal TLR9 response. *European journal of immunology* 43(11):2993-3005.
- Nierkens S, den Brok MH, Roelofsen T, Wagenaars JA, Figdor CG, Ruers TJ & Adema GJ (2009) Route of administration of the TLR9 agonist CpG critically determines the efficacy of cancer immunotherapy in mice. *PLoS one* 4(12):e8368.
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P & et al. (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342(6250):705-708.
- Noa-Carrazana JC, González-de-León D, Ruiz-Castro BS, Piñero D & Silva-Rosales L (2006) Distribution of Papaya ringspot virus and Papaya mosaic virus in Papaya Plants (*Carica papaya*) in Mexico. *Plant Dis.* 90:1004–1011.
- Noad R & Roy P (2003) Virus-like particles as immunogens. *Trends in microbiology* 11(9):438-444.
- Nolz JC & Harty JT (2011) Protective capacity of memory CD8+ T cells is dictated by antigen exposure history and nature of the infection. *Immunity* 34(5):781-793.
- Nolz JC & Harty JT (2014) IL-15 regulates memory CD8+ T cell O-glycan synthesis and affects trafficking. *The Journal of clinical investigation* 10.1172/JCI172039.

- Norbury CC, Hewlett LJ, Prescott AR, Shastri N & Watts C (1995) Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* 3(6):783-791.
- Nordlund JJ, Wolff SM & Levy HB (1970) Inhibition of biologic activity of poly I: poly C by human plasma. *Proc Soc Exp Biol Med* 133(2):439-444.
- Novavax (2000- [cited 2015 jul 21]) Trial to Evaluate Safety and Immunogenicity of Trivalent Seasonal Influenza Virus-Like Particle (VLP) Vaccine (Recombinant). in *ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). (NLM Identifier: NCT00903552, <https://clinicaltrials.gov/>)*.
- Nuzzaci M, Piazzolla G, Vitti A, Lapelosa M, Tortorella C, Stella I, Natilla A, Antonaci S & Piazzolla P (2007) Cucumber mosaic virus as a presentation system for a double hepatitis C virus-derived epitope. *Archives of virology* 152(5):915-928.
- Nuzzaci M, Vitti A, Condelli V, Lanorte MT, Tortorella C, Boscia D, Piazzolla P & Piazzolla G (2010) In vitro stability of Cucumber mosaic virus nanoparticles carrying a Hepatitis C virus-derived epitope under simulated gastrointestinal conditions and in vivo efficacy of an edible vaccine. *Journal of virological methods* 165(2):211-215.
- O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK & Shanahan F (1996) The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *The Journal of experimental medicine* 184(3):1075-1082.
- O'Neill LA, Golenbock D & Bowie AG (2013) The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 13(6):453-460.
- Obeid M, Panaretakis T, Joza N, Tufi R, Tesniere A, van Endert P, Zitvogel L & Kroemer G (2007) Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell death and differentiation* 14(10):1848-1850.
- Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H & Zinkernagel RM (1999a) Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286(5447):2156-2159.
- Ochsenbein AF, Pinschewer DD, Odermatt B, Carroll MC, Hengartner H & Zinkernagel RM (1999b) Protective T cell-independent antiviral antibody responses are dependent on complement. *The Journal of experimental medicine* 190(8):1165-1174.
- Ochsenbein AF, Pinschewer DD, Odermatt B, Ciurea A, Hengartner H & Zinkernagel RM (2000a) Correlation of T cell independence of antibody responses with antigen dose reaching secondary lymphoid organs: implications for splenectomized patients and vaccine design. *J Immunol* 164(12):6296-6302.
- Ochsenbein AF, Sierro S, Odermatt B, Pericin M, Karrer U, Hermans J, Hemmi S, Hengartner H & Zinkernagel RM (2001) Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 411(6841):1058-1064.
- Ochsenbein AF & Zinkernagel RM (2000b) Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunology today* 21(12):624-630.
- Oh S, Berzofsky JA, Burke DS, Waldmann TA & Perera LP (2003) Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(6):3392-3397.
- Oh S, Perera LP, Terabe M, Ni L, Waldmann TA & Berzofsky JA (2008) IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(13):5201-5206.
- Okazaki N, Hazeki K, Izumi T, Nigorikawa K & Hazeki O (2011) C5a controls TLR-induced IL-10 and IL-12 production independent of phosphoinositide 3-kinase. *Journal of biochemistry* 149(3):265-274.

- Oldstone MB (2015) A Jekyll and Hyde Profile: Type 1 Interferon Signaling Plays a Prominent Role in the Initiation and Maintenance of a Persistent Virus Infection. *The Journal of infectious diseases* 212 Suppl 1:S31-36.
- Ontiveros F, Wilson EB & Livingstone AM (2011) Type I interferon supports primary CD8+ T-cell responses to peptide-pulsed dendritic cells in the absence of CD4+ T-cell help. *Immunology* 132(4):549-558.
- Or R, Renz H, Terada N & Gelfand EW (1992) IL-4 and IL-2 promote human T-cell proliferation through symmetrical but independent pathways. *Clin Immunol Immunopathol* 64(3):210-217.
- Osborne LC, Dhanji S, Snow JW, Priatel JJ, Ma MC, Miners MJ, Teh HS, Goldsmith MA & Abraham N (2007) Impaired CD8 T cell memory and CD4 T cell primary responses in IL-7R alpha mutant mice. *The Journal of experimental medicine* 204(3):619-631.
- Ott G, Barchfeld GL, Chernoff D, Radhakrishnan R, van Hoogevest P & Van Nest G (1995a) MF59. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. *Pharm Biotechnol* 6:277-296.
- Ott G, Barchfeld GL & Van Nest G (1995b) Enhancement of humoral response against human influenza vaccine with the simple submicron oil/water emulsion adjuvant MF59. *Vaccine* 13(16):1557-1562.
- Ott PA, Hodi FS & Robert C (2013) CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19(19):5300-5309.
- Oussoren C, Zuidema J, Crommelin DJ & Storm G (1997) Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *Biochimica et biophysica acta* 1328(2):261-272.
- Overwijk WW & Restifo NP (2001) B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr Protoc Immunol* Chapter 20:Unit 20 21.
- Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, Chow SN, Apter DL, Kitchener HC, Castellsague X, de Carvalho NS, Skinner SR, Harper DM, Hedrick JA, Jaisamram U, Limson GA, Dionne M, Quint W, Spiessens B, Peeters P, Struyf F, Wieting SL, Lehtinen MO, Dubin G & group HPs (2007) Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 369(9580):2161-2170.
- Paco L, Garcia-Lora AM, Casares C, Cabrera C, Algarra I, Collado A, Maleno I, Garrido F & Lopez-Nevot MA (2007) Total loss of HLA class I expression on a melanoma cell line after growth in nude mice in absence of autologous antitumor immune response. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 121(9):2023-2030.
- Paczesny S, Banchereau J, Wittkowski KM, Saracino G, Fay J & Palucka AK (2004) Expansion of melanoma-specific cytolytic CD8+ T cell precursors in patients with metastatic melanoma vaccinated with CD34+ progenitor-derived dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 199(11):1503-1511.
- Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Garlatti V, Darnault C, Ghebrehiwet B, Gaboriaud C, Arlaud GJ & Frchet P (2008) C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition. *J Immunol* 180(4):2329-2338.
- Palmer KE, Benko A, Doucette SA, Cameron TI, Foster T, Hanley KM, McCormick AA, McCulloch M, Pogue GP, Smith ML & Christensen ND (2006) Protection of rabbits against cutaneous papillomavirus infection using recombinant tobacco mosaic virus containing L2 capsid epitopes. *Vaccine* 24(26):5516-5525.
- Palucka K & Banchereau J (2012) Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature reviews. Cancer* 12(4):265-277.

- Palucka K, Ueno H, Fay J & Banchereau J (2011a) Dendritic cells and immunity against cancer. *Journal of internal medicine* 269(1):64-73.
- Palucka K, Ueno H, Roberts L, Fay J & Banchereau J (2011b) Dendritic cell subsets as vectors and targets for improved cancer therapy. *Current topics in microbiology and immunology* 344:173-192.
- Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, Linsley PS, Thompson CB & Riley JL (2005) CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 25(21):9543-9553.
- Parsa AT, Waldron JS, Panner A, Crane CA, Parney IF, Barry JJ, Cachola KE, Murray JC, Tihan T, Jensen MC, Mischel PS, Stokoe D & Pieper RO (2007) Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nature medicine* 13(1):84-88.
- Pasare C & Medzhitov R (2005) Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 438(7066):364-368.
- Paschen A, Mendez RM, Jimenez P, Sucker A, Ruiz-Cabello F, Song M, Garrido F & Schadendorf D (2003) Complete loss of HLA class I antigen expression on melanoma cells: a result of successive mutational events. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 103(6):759-767.
- Pasteur L (1880) De l'attenuation du virus du cholera des poules. *C.R. Acad. sci. Paris* 91:673-680.
- Pasteur L (1885) Méthode pour prévenir la rage après morsure. *C.R. Acad. sci. Paris* 101:765-772.
- Pavlov V, Raedler H, Yuan S, Leisman S, Kwan WH, Lalli PN, Medof ME & Heeger PS (2008) Donor deficiency of decay-accelerating factor accelerates murine T cell-mediated cardiac allograft rejection. *J Immunol* 181(7):4580-4589.
- Pavot V, Rochereau N, Resseguier J, Gutjahr A, Genin C, Tiraby G, Perouzel E, Lioux T, Vernejoul F, Verrier B & Paul S (2014) Cutting edge: New chimeric NOD2/TLR2 adjuvant drastically increases vaccine immunogenicity. *J Immunol* 193(12):5781-5785.
- Peacey M, Wilson S, Perret R, Ronchese F, Ward VK, Young V, Young SL & Baird MA (2008) Virus-like particles from rabbit hemorrhagic disease virus can induce an anti-tumor response. *Vaccine* 26(42):5334-5337.
- Pellegrini M, Nicolay U, Lindert K, Groth N & Della Cioppa G (2009) MF59-adjuvanted versus non-adjuvanted influenza vaccines: integrated analysis from a large safety database. *Vaccine* 27(49):6959-6965.
- Peng Q, Li K, Wang N, Li Q, Asgari E, Lu B, Woodruff TM, Sacks SH & Zhou W (2009) Dendritic cell function in allostimulation is modulated by C5aR signaling. *J Immunol* 183(10):6058-6068.
- Pereyra F, Heckerman D, Carlson JM, Kadie C, Soghoian DZ, Karel D, Goldenthal A, Davis OB, DeZiel CE, Lin T, Peng J, Piechocka A, Carrington M & Walker BD (2014) HIV control is mediated in part by CD8+ T-cell targeting of specific epitopes. *Journal of virology* 88(22):12937-12948.
- Perna SK, De Angelis B, Pagliara D, Hasan ST, Zhang L, Mahendravada A, Heslop HE, Brenner MK, Rooney CM, Dotti G & Savoldo B (2013) Interleukin 15 provides relief to CTLs from regulatory T cell-mediated inhibition: implications for adoptive T cell-based therapies for lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19(1):106-117.
- Perrone G, Ruffini PA, Catalano V, Spino C, Santini D, Muretto P, Spoto C, Zingaretti C, Sisti V, Alessandrini P, Giordani P, Cicetti A, D'Emidio S, Morini S, Ruzzo A, Magnani M, Tonini G, Rabitti C & Graziano F (2008) Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur J Cancer* 44(13):1875-1882.
- Pertl U, Luster AD, Varki NM, Homann D, Gaedicke G, Reisfeld RA & Lode HN (2001) IFN-gamma-inducible protein-10 is essential for the generation of a protective tumor-specific CD8 T cell response induced by single-chain IL-12 gene therapy. *J Immunol* 166(11):6944-6951.

- Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, Conlon D, Joshi MB, Harpole DH, Jr. & Patz EF, Jr. (2006) Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer* 107(12):2866-2872.
- Petrella TM, Tozer R, Belanger K, Savage KJ, Wong R, Smylie M, Kamel-Reid S, Tron V, Chen BE, Hunder NN, Hagerman L, Walsh W & Eisenhauer EA (2012) Interleukin-21 has activity in patients with metastatic melanoma: a phase II study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30(27):3396-3401.
- Petrillo M, Zannoni GF, Martinelli E, Pedone Anchora L, Ferrandina G, Tropeano G, Fagotti A & Scambia G (2015) Polarisation of Tumor-Associated Macrophages toward M2 Phenotype Correlates with Poor Response to Chemoradiation and Reduced Survival in Patients with Locally Advanced Cervical Cancer. *PLoS one* 10(9):e0136654.
- Petukhova NV, Gasanova TV, Ivanov PA & Atabekov JG (2014) High-level systemic expression of conserved influenza epitope in plants on the surface of rod-shaped chimeric particles. *Viruses* 6(4):1789-1800.
- Petukhova NV, Gasanova TV, Stepanova LA, Rusova OA, Potapchuk MV, Korotkov AV, Skurat EV, Tsybalova LM, Kiselev OI, Ivanov PA & Atabekov JG (2013) Immunogenicity and protective efficacy of candidate universal influenza A nanovaccines produced in plants by Tobacco mosaic virus-based vectors. *Current pharmaceutical design* 19(31):5587-5600.
- Pham NL, Badovinac VP & Harty JT (2011) Differential role of "Signal 3" inflammatory cytokines in regulating CD8 T cell expansion and differentiation in vivo. *Frontiers in immunology* 2:4.
- Phan TG, Kapusinszky B, Wang C, Rose RK, Lipton HL & Delwart EL (2011) The fecal viral flora of wild rodents. *PLoS pathogens* 7(9):e1002218.
- Phelps JP, Dang N & Rasochova L (2007) Inactivation and purification of cowpea mosaic virus-like particles displaying peptide antigens from Bacillus anthracis. *Journal of virological methods* 141(2):146-153.
- Piazzolla G, Nuzzaci M, Tortorella C, Panella E, Natilla A, Boscia D, De Stradis A, Piazzolla P & Antonaci S (2005) Immunogenic properties of a chimeric plant virus expressing a hepatitis C virus (HCV)-derived epitope: new prospects for an HCV vaccine. *Journal of clinical immunology* 25(2):142-152.
- Pichyangkul S, Gettayacamin M, Miller RS, Lyon JA, Angov E, Tongtawe P, Ruble DL, Heppner DG, Jr., Kester KE, Ballou WR, Diggs CL, Voss G, Cohen JD & Walsh DS (2004) Pre-clinical evaluation of the malaria vaccine candidate P. falciparum MSP1(42) formulated with novel adjuvants or with alum. *Vaccine* 22(29-30):3831-3840.
- Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ & Walport MJ (2000) Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Advances in immunology* 76:227-324.
- Pinto LA, Viscidi R, Harro CD, Kemp TJ, Garcia-Pineros AJ, Trivett M, Demuth F, Lowy DR, Schiller JT, Berzofsky JA & Hildesheim A (2006) Cellular immune responses to HPV-18, -31, and -53 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles. *Virology* 353(2):451-462.
- Pipkin ME, Sacks JA, Cruz-Guilloty F, Lichtenheld MG, Bevan MJ & Rao A (2010) Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* 32(1):79-90.
- Piras F, Colombari R, Minerba L, Murtas D, Floris C, Maxia C, Corbu A, Perra MT & Sirigu P (2005) The predictive value of CD8, CD4, CD68, and human leukocyte antigen-D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase. *Cancer* 104(6):1246-1254.
- Plochova H, Moravec T, Hoffmeisterova H, Folwarczna J & Cerovska N (2011) Expression of Human papillomavirus 16 E7ggg oncoprotein on N- and C-terminus of Potato virus X coat protein in bacterial and plant cells. *Protein expression and purification* 77(2):146-152.

- Plotkin SA (2005) Vaccines: past, present and future. *Nature medicine* 11(4 Suppl):S5-11.
- Plotkin SA (2008) Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 47(3):401-409.
- Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG & Murphy K (1981) Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull World Health Organ* 59(6):895-900.
- Popple A, Durrant LG, Spendlove I, Rolland P, Scott IV, Deen S & Ramage JM (2012) The chemokine, CXCL12, is an independent predictor of poor survival in ovarian cancer. *British journal of cancer* 106(7):1306-1313.
- Porta C, Spall VE, Findlay KC, Gergerich RC, Farrance CE & Lomonosoff GP (2003) Cowpea mosaic virus-based chimaeras. Effects of inserted peptides on the phenotype, host range, and transmissibility of the modified viruses. *Virology* 310(1):50-63.
- Postow MA, Callahan MK, Barker CA, Yamada Y, Yuan J, Kitano S, Mu Z, Rasalan T, Adamow M, Ritter E, Sedrak C, Jungbluth AA, Chua R, Yang AS, Roman RA, Rosner S, Benson B, Allison JP, Lesokhin AM, Gnjatic S & Wolchok JD (2012) Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *The New England journal of medicine* 366(10):925-931.
- Prabakaran M, Kolpe AB, He F & Kwang J (2013) Cross-protective efficacy of bivalent recombinant baculoviral vaccine against heterologous influenza H5N1 challenge. *Vaccine* 31(10):1385-1392.
- Printz C (2001) Spontaneous regression of melanoma may offer insight into cancer immunology. *Journal of the National Cancer Institute* 93(14):1047-1048.
- Prior IA, Lewis PD & Mattos C (2012) A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer research* 72(10):2457-2467.
- Quan FS, Huang C, Compans RW & Kang SM (2007) Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus. *Journal of virology* 81(7):3514-3524.
- Quattrocchi V, Pappalardo JS, Langellotti C, Smitsaert E, Fondevila N & Zamorano P (2014) Early protection against foot-and-mouth disease virus in cattle using an inactivated vaccine formulated with Montanide ESSAI IMS D 12802 VG PR adjuvant. *Vaccine* 32(19):2167-2172.
- Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, Akira S, Ahmed R & Pulendran B (2006) Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *The Journal of experimental medicine* 203(2):413-424.
- Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, Pirani A, Gernert K, Deng J, Marzolf B, Kennedy K, Wu H, Bennouna S, Oluoch H, Miller J, Vencio RZ, Mulligan M, Aderem A, Ahmed R & Pulendran B (2009) Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nature immunology* 10(1):116-125.
- Quinn KM, Yamamoto A, Costa A, Darrah PA, Lindsay RW, Hegde ST, Johnson TR, Flynn BJ, Lore K & Seder RA (2013) Coadministration of Polyinosinic:Polycytidylic Acid and Immunostimulatory Complexes Modifies Antigen Processing in Dendritic Cell Subsets and Enhances HIV Gag-Specific T Cell Immunity. *J Immunol* 10.4049/jimmunol.1301730.
- Raby AC, Holst B, Davies J, Colmont C, Laumonnier Y, Coles B, Shah S, Hall J, Topley N, Kohl J, Morgan BP & Labeta MO (2011) TLR activation enhances C5a-induced pro-inflammatory responses by negatively modulating the second C5a receptor, C5L2. *European journal of immunology* 41(9):2741-2752.
- Rae CS, Khor IW, Wang Q, Destito G, Gonzalez MJ, Singh P, Thomas DM, Estrada MN, Powell E, Finn MG & Manchester M (2005) Systemic trafficking of plant virus nanoparticles in mice via the oral route. *Virology* 343(2):224-235.
- Raedler H, Yang M, Lalli PN, Medof ME & Heeger PS (2009) Primed CD8(+) T-cell responses to allogeneic endothelial cells are controlled by local complement activation. *American journal of*

transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 9(8):1784-1795.

- Rafique I, Kirkwood JM & Tarhini AA (2015) Immune checkpoint blockade and interferon-alpha in melanoma. *Semin Oncol* 42:436-447.
- Rajagopal D, Paturel C, Morel Y, Uematsu S, Akira S & Diebold SS (2010) Plasmacytoid dendritic cell-derived type I interferon is crucial for the adjuvant activity of Toll-like receptor 7 agonists. *Blood* 115(10):1949-1957.
- Rastogi RP, Richa, Kumar A, Tyagi MB & Sinha RP (2010) Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids* 2010:592980.
- Rayman P, Uzzo RG, Kolenko V, Bloom T, Cathcart MK, Molto L, Novick AC, Bukowski RM, Hamilton T & Finke JH (2000) Tumor-induced dysfunction in interleukin-2 production and interleukin-2 receptor signaling: a mechanism of immune escape. *Cancer J Sci Am* 6 Suppl 1:S81-87.
- Read S, Malmstrom V & Powrie F (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine* 192(2):295-302.
- Rech AJ & Vonderheide RH (2009) Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1174:99-106.
- Redecke V, Hacker H, Datta SK, Fermin A, Pitha PM, Broide DH & Raz E (2004) Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* 172(5):2739-2743.
- Reed SG, Bertholet S, Coler RN & Friede M (2009) New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in immunology* 30(1):23-32.
- Reis ES, Barbuto JA & Isaac L (2006) Human monocyte-derived dendritic cells are a source of several complement proteins. *Inflamm Res* 55(5):179-184.
- Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, Wansley EK, Camphausen K, Luiten RM, de Ru AH, Neijssen J, Griekspoor A, Mesman E, Verreck FA, Spits H, Schlom J, van Veelen P & Neefjes JJ (2006) Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *The Journal of experimental medicine* 203(5):1259-1271.
- Ren Z, Ji X, Meng L, Wei Y, Wang T, Feng N, Zheng X, Wang H, Li N, Gao X, Jin H, Zhao Y, Yang S, Qin C, Gao Y & Xia X (2015) H5N1 influenza virus-like particle vaccine protects mice from heterologous virus challenge better than whole inactivated virus. *Virus research* 200:9-18.
- Rennermalm A, Li YH, Bohaufs L, Jarstrand C, Brauner A, Brennan FR & Flock JI (2001) Antibodies against a truncated *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein protect against dissemination of infection in the rat. *Vaccine* 19(25-26):3376-3383.
- Restifo NP, Dudley ME & Rosenberg SA (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature reviews. Immunology* 12(4):269-281.
- Reynders K, Illidge T, Siva S, Chang JY & De Ruyscher D (2015) The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. *Cancer Treat Rev* 41(6):503-510.
- Rharbaoui F, Drabner B, Borsutzky S, Winckler U, Morr M, Ensoli B, Muhlrads PF & Guzman CA (2002) The Mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 is a potent mucosal adjuvant. *European journal of immunology* 32(10):2857-2865.
- Richer MJ, Nolz JC & Harty JT (2013) Pathogen-specific inflammatory milieu tune the antigen sensitivity of CD8(+) T cells by enhancing T cell receptor signaling. *Immunity* 38(1):140-152.

- Riedel S (2005) Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 18(1):21-25.
- Riedmann EM (2012) Chinese biotech partnership brings first hepatitis E vaccine to the market. *Human vaccines & immunotherapeutics* 8(12):1743-1744.
- Rini B (2014) Future approaches in immunotherapy. *Seminars in oncology* 41 Suppl 5:S30-40.
- Rioux G, Babin C, Majeau N & Leclerc D (2012a) Engineering of papaya mosaic virus (PapMV) nanoparticles through fusion of the HA11 peptide to several putative surface-exposed sites. *PLoS one* 7(2):e31925.
- Rioux G, Majeau N & Leclerc D (2012b) Mapping the surface-exposed regions of papaya mosaic virus nanoparticles. *The FEBS journal* 279(11):2004-2011.
- Rioux G, Mathieu C, Russell A, Bolduc M, Laliberte-Gagne ME, Savard P & Leclerc D (2014) PapMV nanoparticles improve mucosal immune responses to the trivalent inactivated flu vaccine. *Journal of nanobiotechnology* 12:19.
- Robinson RA, DeVita VT, Levy HB, Baron S, Hubbard SP & Levine AS (1976) A phase I-II trial of multiple-dose polyribonucleic-polyribocytidylic acid in patients with leukemia or solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 57(3):599-602.
- Romagnani P, Annunziato F, Lazzeri E, Cosmi L, Beltrame C, Lasagni L, Galli G, Francalanci M, Manetti R, Marra F, Vanini V, Maggi E & Romagnani S (2001) Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) alpha beta+ CD8+ single-positive T cells, TCR gamma delta+ T cells, and natural killer-type cells in human thymus. *Blood* 97(3):601-607.
- Romero Mendez IZ, Shi Y, HogenEsch H & Hem SL (2007) Potentiation of the immune response to non-adsorbed antigens by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 25(5):825-833.
- Rook AH, Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Sporn MB, Burlington DB, Lane HC & Fauci AS (1986) Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol* 136(10):3916-3920.
- Rose WA, 2nd, Okragly AJ, Patel CN & Benschop RJ (2015) IL-33 released by alum is responsible for early cytokine production and has adjuvant properties. *Sci Rep* 5:13146.
- Rosenberg SA (2014) IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol* 192(12):5451-5458.
- Rosenberg SA, Sherry RM, Morton KE, Scharfman WJ, Yang JC, Topalian SL, Royal RE, Kammula U, Restifo NP, Hughes MS, Schwartzentruber D, Berman DM, Schwarz SL, Ngo LT, Mavroukakis SA, White DE & Steinberg SM (2005) Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma. *J Immunol* 175(9):6169-6176.
- Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, Morton KE, Laurencot CM, Steinberg SM, White DE & Dudley ME (2011) Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(13):4550-4557.
- Roumenina LT, Sene D, Radanova M, Blouin J, Halbwachs-Mecarelli L, Dragon-Durey MA, Fridman WH & Fremeaux-Bacchi V (2011) Functional complement C1q abnormality leads to impaired immune complexes and apoptotic cell clearance. *J Immunol* 187(8):4369-4373.
- Ruedl C, Storni T, Lechner F, Bachi T & Bachmann MF (2002) Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP. *European journal of immunology* 32(3):818-825.

- Saidi H, Bras M, Formaglio P, Melki MT, Charbit B, Herbeuval JP & Gougeon ML (2016) HMGB1 Is Involved in IFN-alpha Production and TRAIL Expression by HIV-1-Exposed Plasmacytoid Dendritic Cells: Impact of the Crosstalk with NK Cells. *PLoS pathogens* 12(2):e1005407.
- Sainsbury F, Saxena P, Aljabali AA, Saunders K, Evans DJ & Lomonosoff GP (2014) Genetic engineering and characterization of Cowpea mosaic virus empty virus-like particles. *Methods Mol Biol* 1108:139-153.
- Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK & Anderson AC (2010) Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *The Journal of experimental medicine* 207(10):2187-2194.
- Salavoura K, Kolialexi A, Tsangaris G & Mavrou A (2008) Development of cancer in patients with primary immunodeficiencies. *Anticancer Res* 28(2B):1263-1269.
- Salerno-Goncalves R, Pasetti MF & Szein MB (2002) Characterization of CD8(+) effector T cell responses in volunteers immunized with Salmonella enterica serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine. *J Immunol* 169(4):2196-2203.
- Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M & Lanzavecchia A (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401(6754):708-712.
- Saluja SS, Hanlon DJ, Sharp FA, Hong E, Khalil D, Robinson E, Tigelaar R, Fahmy TM & Edelson RL (2014) Targeting human dendritic cells via DEC-205 using PLGA nanoparticles leads to enhanced cross-presentation of a melanoma-associated antigen. *International journal of nanomedicine* 9:5231-5246.
- Sanal O, Loos M, Ersoy F, Kanra G, Secmeer G & Tezcan I (1992) Complement component deficiencies and infection: C5, C8 and C3 deficiencies in three families. *Eur J Pediatr* 151(9):676-679.
- Sanchez PJ, McWilliams JA, Haluszczak C, Yagita H & Kedl RM (2007) Combined TLR/CD40 stimulation mediates potent cellular immunity by regulating dendritic cell expression of CD70 in vivo. *J Immunol* 178(3):1564-1572.
- Sanchez-Perez L, Kottke T, Diaz RM, Ahmed A, Thompson J, Chong H, Melcher A, Holmen S, Daniels G & Vile RG (2005) Potent selection of antigen loss variants of B16 melanoma following inflammatory killing of melanocytes in vivo. *Cancer research* 65(5):2009-2017.
- sanofi pasteur (2006) *PRODUCT MONOGRAPH* : *IMOVAX® Rabies.*, https://www.vaccineshoppecanada.com/document.cfm?file=IMOVAX_E.pdf
- sanofi pasteur (2012a) *PRODUCT MONOGRAPH*: *Act-HIB.*, https://www.vaccineshoppecanada.com/document.cfm?file=act_hib_e.pdf
- sanofi pasteur (2012b) *PRODUCT MONOGRAPH*: *ADACEL.*, https://www.vaccineshoppecanada.com/document.cfm?file=ADACEL_E.pdf
- Sartorius R, D'Apice L, Trovato M, Cuccaro F, Costa V, De Leo MG, Marzullo VM, Biondo C, D'Auria S, De Matteis MA, Ciccodicola A & De Berardinis P (2015) Antigen delivery by filamentous bacteriophage fd displaying an anti-DEC-205 single-chain variable fragment confers adjuvanticity by triggering a TLR9-mediated immune response. *EMBO Mol Med* 7(7):973-988.
- Saunders K, Sainsbury F & Lomonosoff GP (2009) Efficient generation of cowpea mosaic virus empty virus-like particles by the proteolytic processing of precursors in insect cells and plants. *Virology* 393(2):329-337.
- Savard C, Guerin A, Drouin K, Bolduc M, Laliberte-Gagne ME, Dumas MC, Majeau N & Leclerc D (2011) Improvement of the trivalent inactivated flu vaccine using PapMV nanoparticles. *PLoS one* 6(6):e21522.
- Savard C, Laliberte-Gagne ME, Babin C, Bolduc M, Guerin A, Drouin K, Forget MA, Majeau N, Lapointe R & Leclerc D (2012) Improvement of the PapMV nanoparticle adjuvant property through an increased of its avidity for the antigen [influenza NP]. *Vaccine* 30(15):2535-2542.

- Sawant A, Hensel JA, Chanda D, Harris BA, Siegal GP, Maheshwari A & Ponnazhagan S (2012) Depletion of plasmacytoid dendritic cells inhibits tumor growth and prevents bone metastasis of breast cancer cells. *J Immunol* 189(9):4258-4265.
- Sayegh ET, Bloch O & Parsa AT (2014) Complement anaphylatoxins as immune regulators in cancer. *Cancer medicine* 3(4):747-758.
- Schauber-Plewa C, Simmons A, Tuerk MJ, Pacheco CD & Veres G (2005) Complement regulatory proteins are incorporated into lentiviral vectors and protect particles against complement inactivation. *Gene therapy* 12(3):238-245.
- Scheiermann J & Klinman DM (2014) Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine* 32(48):6377-6389.
- Schenkel JM, Fraser KA & Masopust D (2014) Cutting edge: resident memory CD8 T cells occupy frontline niches in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 192(7):2961-2964.
- Schietinger A, Philip M, Liu RB, Schreiber K & Schreiber H (2010) Bystander killing of cancer requires the cooperation of CD4(+) and CD8(+) T cells during the effector phase. *The Journal of experimental medicine* 207(11):2469-2477.
- Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V & Cerwenka A (2012) Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. *J Immunol* 189(12):5602-5611.
- Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC & Lefrancois L (2000) Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nature immunology* 1(5):426-432.
- Schmidt NW, Butler NS, Badovinac VP & Harty JT (2010) Extreme CD8 T cell requirements for anti-malarial liver-stage immunity following immunization with radiation attenuated sporozoites. *PLoS pathogens* 6(7):e1000998.
- Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R & Melief CJ (1998) T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393(6684):480-483.
- Schultze V, D'Agosto V, Wack A, Novicki D, Zorn J & Hennig R (2008) Safety of MF59 adjuvant. *Vaccine* 26(26):3209-3222.
- Schwartz RN, Stover L & Dutcher J (2002) Managing toxicities of high-dose interleukin-2. *Oncology* 16(11 Suppl 13):11-20.
- Screpanti V, Wallin RP, Ljunggren HG & Grandien A (2001) A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. *J Immunol* 167(4):2068-2073.
- Seder RA & Hill AV (2000) Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature* 406(6797):793-798.
- Senti G, Johansen P, Haug S, Bull C, Gottschaller C, Muller P, Pfister T, Maurer P, Bachmann MF, Graf N & Kundig TM (2009) Use of A-type CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant in allergen-specific immunotherapy in humans: a phase I/IIa clinical trial. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 39(4):562-570.
- Serre K, Giraud L, Siret C, Leserman L & Machy P (2006) CD4 T cell help is required for primary CD8 T cell responses to vesicular antigen delivered to dendritic cells in vivo. *European journal of immunology* 36(6):1386-1397.
- Serre K, Mohr E, Toellner KM, Cunningham AF, Granjeaud S, Bird R & MacLennan IC (2008) Molecular differences between the divergent responses of ovalbumin-specific CD4 T cells to alum-precipitated ovalbumin compared to ovalbumin expressed by Salmonella. *Molecular immunology* 45(13):3558-3566.
- Sester DP, Naik S, Beasley SJ, Hume DA & Stacey KJ (2000) Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA. *J Immunol* 165(8):4165-4173.

- Seubert A, Calabro S, Santini L, Galli B, Genovese A, Valentini S, Aprea S, Colaprico A, D'Oro U, Giuliani MM, Pallaoro M, Pizza M, O'Hagan DT, Wack A, Rappuoli R & De Gregorio E (2011) Adjuvanticity of the oil-in-water emulsion MF59 is independent of Nlrp3 inflammasome but requires the adaptor protein MyD88. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(27):11169-11174.
- Sfondrini L, Sommariva M, Tortoreto M, Meini A, Piconese S, Calvaruso M, Van Rooijen N, Bonecchi R, Zaffaroni N, Colombo MP, Tagliabue E & Balsari A (2013) Anti-tumor activity of CpG-ODN aerosol in mouse lung metastases. *Int J Cancer* 133:383-393.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ & Schreiber RD (2001) IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410(6832):1107-1111.
- Shapiro VS, Truitt KE, Imboden JB & Weiss A (1997) CD28 mediates transcriptional upregulation of the interleukin-2 (IL-2) promoter through a composite element containing the CD28RE and NF-IL-2B AP-1 sites. *Mol Cell Biol* 17(7):4051-4058.
- Sharma A, Bode B, Studer G, Moch H, Okoniewski M, Knuth A, von Boehmer L & van den Broek M (2013) Radiotherapy of human sarcoma promotes an intratumoral immune effector signature. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19(17):4843-4853.
- Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou DY, Singh N, Yagita H, Azuma M, Blazar BR, Mellor AL & Munn DH (2007) Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of clinical investigation* 117(9):2570-2582.
- Sharma P & Allison JP (2015) The future of immune checkpoint therapy. *Science* 348:56-61.
- Shedlock DJ & Shen H (2003) Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300(5617):337-339.
- Sheen-Chen SM, Chen HS, Eng HL & Chen WJ (2003) Circulating soluble Fas in patients with breast cancer. *World J Surg* 27(1):10-13.
- Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, Qiu Y, Jussif JM, Carter LL, Wood CR & Chaudhary D (2004) PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS letters* 574(1-3):37-41.
- Shevach EM (2009) Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30(5):636-645.
- Shiels MS, Cole SR, Kirk GD & Poole C (2009) A meta-analysis of the incidence of non-AIDS cancers in HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 52(5):611-622.
- Shoji Y, Prokhnovsky A, Leffet B, Vetter N, Tottey S, Satinover S, Musiychuk K, Shamloul M, Norikane J, Jones RM, Chichester JA, Green BJ, Streatfield SJ & Yusibov V (2015) Immunogenicity of H1N1 influenza virus-like particles produced in *Nicotiana benthamiana*. *Human vaccines & immunotherapeutics* 11(1):118-123.
- Sica A, Schioppa T, Mantovani A & Allavena P (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42(6):717-727.
- Siddiqui S, Alatery A, Kus A & Basta S (2011) TLR engagement prior to virus infection influences MHC-I antigen presentation in an epitope-dependent manner as a result of nitric oxide release. *Journal of leukocyte biology* 89(3):457-468.
- Sigal LJ, Crotty S, Andino R & Rock KL (1999) Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 398(6722):77-80.

- Sim RB, Day AJ, Moffatt BE & Fontaine M (1993) Complement factor I and cofactors in control of complement system convertase enzymes. *Methods in enzymology* 223:13-35.
- Singh M, Khong H, Dai Z, Huang XF, Wargo JA, Cooper ZA, Vasilakos JP, Hwu P & Overwijk WW (2014) Effective Innate and Adaptive Antimelanoma Immunity through Localized TLR7/8 Activation. *J Immunol* 10.4049/jimmunol.1401160.
- Sisirak V, Faget J, Gobert M, Goutagny N, Vey N, Treilleux I, Renaudineau S, Poyet G, Labidi-Galy SI, Goddard-Leon S, Durand I, Le Mercier I, Bajard A, Bachelot T, Puisieux A, Puisieux I, Blay JY, Menetrier-Caux C, Caux C & Bendriss-Vermare N (2012) Impaired IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. *Cancer research* 72(20):5188-5197.
- Sisirak V, Vey N, Goutagny N, Renaudineau S, Malfroy M, Thys S, Treilleux I, Labidi-Galy SI, Bachelot T, Dezutter-Dambuyant C, Menetrier-Caux C, Blay JY, Caux C & Bendriss-Vermare N (2013) Breast cancer-derived transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha compromise interferon-alpha production by tumor-associated plasmacytoid dendritic cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 133(3):771-778.
- Smith A, Santoro F, Di Lullo G, Dagna L, Verani A & Lusso P (2003) Selective suppression of IL-12 production by human herpesvirus 6. *Blood* 102(8):2877-2884.
- Smith ML, Corbo T, Bernales J, Lindbo JA, Pogue GP, Palmer KE & McCormick AA (2007) Assembly of trans-encapsidated recombinant viral vectors engineered from Tobacco mosaic virus and Semliki Forest virus and their evaluation as immunogens. *Virology* 358(2):321-333.
- Smith ML, Lindbo JA, Dillard-Telm S, Brosio PM, Lasnik AB, McCormick AA, Nguyen LV & Palmer KE (2006) Modified tobacco mosaic virus particles as scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications. *Virology* 348(2):475-488.
- Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, Wiltrout RH, Sedger LM, Kayagaki N, Yagita H & Okumura K (2001) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *The Journal of experimental medicine* 193(6):661-670.
- Smyth MJ, Thia KY, Cretney E, Kelly JM, Snook MB, Forbes CA & Scalzo AA (1999) Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J Immunol* 162(11):6658-6662.
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI & Trapani JA (2000) Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *The Journal of experimental medicine* 192(5):755-760.
- Snapper CM, McIntyre TM, Mandler R, Pecanha LM, Finkelman FD, Lees A & Mond JJ (1992) Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *The Journal of experimental medicine* 175(5):1367-1371.
- Somasundaram R, Jacob L, Swoboda R, Caputo L, Song H, Basak S, Monos D, Peritt D, Marincola F, Cai D, Birebent B, Bloome E, Kim J, Berencsi K, Mastrangelo M & Herlyn D (2002) Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4+/CD25+ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-beta. *Cancer research* 62(18):5267-5272.
- Somers CM, Yauk CL, White PA, Parfett CL & Quinn JS (2002) Air pollution induces heritable DNA mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(25):15904-15907.
- Sominskaya I, Skrastina D, Dislers A, Vasiljev D, Mihailova M, Ose V, Dreilina D & Pumpens P (2010) Construction and immunological evaluation of multivalent hepatitis B virus (HBV) core virus-like particles carrying HBV and HCV epitopes. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 17(6):1027-1033.

- Song E, Chen J, Ouyang N, Su F, Wang M & Heemann U (2001) Soluble Fas ligand released by colon adenocarcinoma cells induces host lymphocyte apoptosis: an active mode of immune evasion in colon cancer. *British journal of cancer* 85(7):1047-1054.
- Song WC (2012) Crosstalk between complement and toll-like receptors. *Toxicologic pathology* 40(2):174-182.
- Spadaro F, Lapenta C, Donati S, Abalsamo L, Barnaba V, Belardelli F, Santini SM & Ferrantini M (2012) IFN-alpha enhances cross-presentation in human dendritic cells by modulating antigen survival, endocytic routing, and processing. *Blood* 119(6):1407-1417.
- Speiser DE, Schwarz K, Baumgaertner P, Manolova V, Devevre E, Sterry W, Walden P, Zippelius A, Conzett KB, Senti G, Voelter V, Cerottini JP, Guggisberg D, Willers J, Geldhof C, Romero P, Kundig T, Knuth A, Dummer R, Trefzer U & Bachmann MF (2010) Memory and effector CD8 T-cell responses after nanoparticle vaccination of melanoma patients. *J Immunother* 33(8):848-858.
- Spiotto MT, Yu P, Rowley DA, Nishimura MI, Meredith SC, Gajewski TF, Fu YX & Schreiber H (2002) Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells. *Immunity* 17(6):737-747.
- Spranger S, Bao R & Gajewski TF (2015) Melanoma-intrinsic beta-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* 523(7559):231-235.
- Spranger S, Koblish HK, Horton B, Scherle PA, Newton R & Gajewski TF (2014) Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8(+) T cells directly within the tumor microenvironment. *Journal for immunotherapy of cancer* 2:3.
- Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT & Gajewski TF (2013) Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Science translational medicine* 5(200):200ra116.
- Stackpole CW (1981) Distinct lung-colonizing and lung-metastasizing cell populations in B16 mouse melanoma. *Nature* 289:798-800.
- Staczek J, Bendahmane M, Gilleland LB, Beachy RN & Gilleland HE, Jr. (2000) Immunization with a chimeric tobacco mosaic virus containing an epitope of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* provides protection against challenge with *P. aeruginosa*. *Vaccine* 18(21):2266-2274.
- Stamell EF, Wolchok JD, Gnjatic S, Lee NY & Brownell I (2013) The abscopal effect associated with a systemic anti-melanoma immune response. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 85(2):293-295.
- Starbeck-Miller GR, Xue HH & Harty JT (2014) IL-12 and type I interferon prolong the division of activated CD8 T cells by maintaining high-affinity IL-2 signaling in vivo. *The Journal of experimental medicine* 211(1):105-120.
- Stary G, Bangert C, Tauber M, Strohal R, Kopp T & Stingl G (2007) Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 204(6):1441-1451.
- Steinbrink K, Wolff M, Jonuleit H, Knop J & Enk AH (1997) Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159(10):4772-4780.
- Steinhagen F, Kinjo T, Bode C & Klinman DM (2011) TLR-based immune adjuvants. *Vaccine* 29(17):3341-3355.
- Stelekati E, Shin H, Doering TA, Dolfi DV, Ziegler CG, Beiting DP, Dawson L, Liboon J, Wolski D, Ali MA, Katsikis PD, Shen H, Roos DS, Haining WN, Lauer GM & Wherry EJ (2014) Bystander chronic infection negatively impacts development of CD8(+) T cell memory. *Immunity* 40(5):801-813.
- Sterry W, Ruzicka T, Herrera E, Takwale A, Bichel J, Andres K, Ding L & Thissen MR (2002) Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial and nodular basal cell carcinoma: randomized studies

- comparing low-frequency dosing with and without occlusion. *The British journal of dermatology* 147(6):1227-1236.
- Stier S, Maletzki C, Klier U & Linnebacher M (2013) Combinations of TLR ligands: a promising approach in cancer immunotherapy. *Clinical & developmental immunology* 2013:271246.
- Stoermer KA & Morrison TE (2011) Complement and viral pathogenesis. *Virology* 411(2):362-373.
- Stone HB, Peters LJ & Milas L (1979) Effect of host immune capability on radiocurability and subsequent transplantability of a murine fibrosarcoma. *Journal of the National Cancer Institute* 63(5):1229-1235.
- Storni T, Lechner F, Erdmann I, Bachi T, Jegerlehner A, Dumrese T, Kundig TM, Ruedl C & Bachmann MF (2002) Critical role for activation of antigen-presenting cells in priming of cytotoxic T cell responses after vaccination with virus-like particles. *J Immunol* 168(6):2880-2886.
- Storni T, Ruedl C, Schwarz K, Schwendener RA, Renner WA & Bachmann MF (2004) Nonmethylated CG motifs packaged into virus-like particles induce protective cytotoxic T cell responses in the absence of systemic side effects. *J Immunol* 172(3):1777-1785.
- Straathof KC, Pule MA, Yotnda P, Dotti G, Vanin EF, Brenner MK, Heslop HE, Spencer DM & Rooney CM (2005) An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood* 105(11):4247-4254.
- Strainic MG, Liu J, Huang D, An F, Lalli PN, Muqim N, Shapiro VS, Dubyak GR, Heeger PS & Medof ME (2008) Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells. *Immunity* 28(3):425-435.
- Stratton MR (2011) Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science* 331(6024):1553-1558.
- Sumner WC (1953) Spontaneous regression of melanoma. *Cancer* 6(5):1040-1043.
- Sun H, Pollock KG & Brewer JM (2003a) Analysis of the role of vaccine adjuvants in modulating dendritic cell activation and antigen presentation in vitro. *Vaccine* 21(9-10):849-855.
- Sun JC & Bevan MJ (2003b) Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300(5617):339-342.
- Sun S, Gao F, Mao Q, Shao J, Jiang L, Liu D, Wang Y, Yao X, Wu X, Sun B, Zhao D, Ma Y, Lu J, Kong W, Jiang C & Liang Z (2015) Immunogenicity and protective efficacy of an EV71 virus-like particle vaccine against lethal challenge in newborn mice. *Human vaccines & immunotherapeutics* 10.1080/21645515.2015.1053675:0.
- Surace L, Lysenko V, Fontana AO, Cecconi V, Janssen H, Bicvic A, Okoniewski M, Pruschy M, Dummer R, Neefjes J, Knuth A, Gupta A & van den Broek M (2015) Complement is a central mediator of radiotherapy-induced tumor-specific immunity and clinical response. *Immunity* 42(4):767-777.
- Suresh M, Molina H, Salvato MS, Mastellos D, Lambris JD & Sandor M (2003) Complement component 3 is required for optimal expansion of CD8 T cells during a systemic viral infection. *J Immunol* 170(2):788-794.
- Suzuki T, Fukuhara T, Tanaka M, Nakamura A, Akiyama K, Sakakibara T, Koinuma D, Kikuchi T, Tazawa R, Maemondo M, Hagiwara K, Saijo Y & Nukiwa T (2005) Vaccination of dendritic cells loaded with interleukin-12-secreting cancer cells augments in vivo antitumor immunity: characteristics of syngeneic and allogeneic antigen-presenting cell cancer hybrid cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11(1):58-66.
- Swaiika A, Hammond WA & Joseph RW (2015) Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy. *Molecular immunology* 10.1016/j.molimm.2015.02.009.
- Takagi H, Arimura K, Uto T, Fukaya T, Nakamura T, Chojiookhuu N, Hishikawa Y & Sato K (2016) Plasmacytoid dendritic cells orchestrate TLR7-mediated innate and adaptive immunity for the initiation of autoimmune inflammation. *Sci Rep* 6:24477.

- Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW & Sakaguchi S (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *The Journal of experimental medicine* 192(2):303-310.
- Takeda (2000- [cited 2015 jul 21]) Safety and Immunogenicity of Norovirus Bivalent Virus-Like Particle Vaccine in Healthy Adults. in *ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US)*. (NLM Identifier: NCT02142504, <https://clinicaltrials.gov/>).
- Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, Iwakura Y, Yagita H & Okumura K (2001) Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nature medicine* 7(1):94-100.
- Takeuchi O & Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140(6):805-820.
- Talmadge JE (2007) Pathways mediating the expansion and immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells and their relevance to cancer therapy. *Clin Cancer Res* 13:5243-5248.
- Tan JT, Ernst B, Kieper WC, LeRoy E, Sprent J & Surh CD (2002) Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *The Journal of experimental medicine* 195(12):1523-1532.
- Tang H, Amara U, Tang D, Barnes MA, McDonald C & Nagy LE (2013) Synergistic interaction between C5a and NOD2 signaling in the regulation of chemokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Adv Biosci Biotechnol* 4(8C):30-37.
- Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ, Bour-Jordan H, Bi M & Bluestone JA (2004) Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *European journal of immunology* 34(11):2996-3005.
- Taqi AM, Abdurrahman MB, Yakubu AM & Fleming AF (1981) Regression of Hodgkin's disease after measles. *Lancet* 1(8229):1112.
- Taraban VY, Rowley TF & Al-Shamkhani A (2004) Cutting edge: a critical role for CD70 in CD8 T cell priming by CD40-licensed APCs. *J Immunol* 173(11):6542-6546.
- Tarhini AA, Gogas H & Kirkwood JM (2012) IFN-alpha in the treatment of melanoma. *J Immunol* 189:3789-3793.
- Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, Chen S, Klein AP, Pardoll DM, Topalian SL & Chen L (2012) Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Science translational medicine* 4(127):127ra137.
- Tavano R, Contento RL, Baranda SJ, Soligo M, Tuosto L, Manes S & Viola A (2006) CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nat Cell Biol* 8(11):1270-1276.
- Taylor KM, Lin T, Porta C, Mosser AG, Giesing HA, Lomonosoff GP & Johnson JE (2000) Influence of three-dimensional structure on the immunogenicity of a peptide expressed on the surface of a plant virus. *Journal of molecular recognition : JMR* 13(2):71-82.
- Tel J, Aarntzen EH, Baba T, Schreiber G, Schulte BM, Benitez-Ribas D, Boerman OC, Croockewit S, Oyen WJ, van Rossum M, Winkels G, Coulie PG, Punt CJ, Figdor CG & de Vries IJ (2013) Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients. *Cancer research* 73(3):1063-1075.
- Test ST, Mitsuyoshi J, Connolly CC & Lucas AH (2001) Increased immunogenicity and induction of class switching by conjugation of complement C3d to pneumococcal serotype 14 capsular polysaccharide. *Infection and immunity* 69(5):3031-3040.
- Tewari K, Flynn BJ, Boscardin SB, Kastenmueller K, Salazar AM, Anderson CA, Soundarapandian V, Ahumada A, Keler T, Hoffman SL, Nussenzweig MC, Steinman RM & Seder RA (2010) Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4+ T cell responses to Plasmodium

- falciparum circumsporozoite protein (CSP) and alphaDEC-CSP in non human primates. *Vaccine* 28(45):7256-7266.
- Thanavala Y, Mahoney M, Pal S, Scott A, Richter L, Natarajan N, Goodwin P, Arntzen CJ & Mason HS (2005) Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(9):3378-3382.
- Theiler M & Smith HH (1937a) The Effect of Prolonged Cultivation in Vitro Upon the Pathogenicity of Yellow Fever Virus. *The Journal of experimental medicine* 65(6):767-786.
- Theiler M & Smith HH (1937b) The Use of Yellow Fever Virus Modified by in Vitro Cultivation for Human Immunization. *The Journal of experimental medicine* 65(6):787-800.
- Thompson BS, Chilton PM, Ward JR, Evans JT & Mitchell TC (2005) The low-toxicity versions of LPS, MPL adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells. *Journal of leukocyte biology* 78(6):1273-1280.
- Thompson LJ, Kolumam GA, Thomas S & Murali-Krishna K (2006) Innate inflammatory signals induced by various pathogens differentially dictate the IFN-I dependence of CD8 T cells for clonal expansion and memory formation. *J Immunol* 177(3):1746-1754.
- Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS, Page DL & Holt JT (1995) Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nat Genet* 9(4):444-450.
- Tissot AC, Renhofa R, Schmitz N, Cielens I, Meijerink E, Ose V, Jennings GT, Saudan P, Pumpens P & Bachmann MF (2010) Versatile virus-like particle carrier for epitope based vaccines. *PloS one* 5(3):e9809.
- Tomai MA & Vasilakos JP (2011) TLR-7 and -8 agonists as vaccine adjuvants. *Expert review of vaccines* 10(4):405-407.
- Tomlinson JA, Faithfull E, Flewett TH & Beards G (1982) Isolation of infective tomato bushy stunt virus after passage through the human alimentary tract. *Nature* 300(5893):637-638.
- Topalian SL, Drake CG & Pardoll DM (2015) Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 27:450-461.
- Toutirais O, Chartier P, Dubois D, Bouet F, Leveque J, Catros-Quemener V & Genetet N (2003) Constitutive expression of TGF-beta1, interleukin-6 and interleukin-8 by tumor cells as a major component of immune escape in human ovarian carcinoma. *Eur Cytokine Netw* 14(4):246-255.
- Trajanoski Z, Maccalli C, Mennonna D, Casorati G, Parmiani G & Dellabona P (2015) Somatically mutated tumor antigens in the quest for a more efficacious patient-oriented immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 64:99-104.
- Tran T, Burt D, Eapen L & Keller OR (2013) Spontaneous regression of metastatic melanoma after inoculation with tetanus-diphtheria-pertussis vaccine. *Curr Oncol* 20(3):e270-273.
- Tremblay MH, Majeau N, Gagne ME, Lecours K, Morin H, Duvignaud JB, Bolduc M, Chouinard N, Pare C, Gagne S & Leclerc D (2006) Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaic potexvirus coat protein. *The FEBS journal* 273(1):14-25.
- Trinchieri G (1994) Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 84(12):4008-4027.
- Tugues S, Burkhard SH, Ohs I, Vrohling M, Nussbaum K, Vom Berg J, Kulig P & Becher B (2015) New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ* 22:237-246.
- Tumban E, Peabody J, Peabody DS & Chackerian B (2013) A universal virus-like particle-based vaccine for human papillomavirus: longevity of protection and role of endogenous and exogenous adjuvants. *Vaccine* 31(41):4647-4654.

- Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, Kivork C, Seja E, Cherry G, Gutierrez AJ, Grogan TR, Mateus C, Tomasic G, Glaspy JA, Emerson RO, Robins H, Pierce RH, Elashoff DA, Robert C & Ribas A (2014) PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515(7528):568-571.
- Tuo D, Shen W, Yang Y, Yan P, Li X & Zhou P (2014) Development and validation of a multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of three papaya viruses. *Viruses* 6(10):3893-3906.
- Twyman-Saint Victor C, Rech AJ, Maity A, Rengan R, Pauken KE, Stelekati E, Benci JL, Xu B, Dada H, Odorizzi PM, Herati RS, Mansfield KD, Patsch D, Amaravadi RK, Schuchter LM, Ishwaran H, Mick R, Pryma DA, Xu X, Feldman MD, Gangadhar TC, Hahn SM, Wherry EJ, Vonderheide RH & Minn AJ (2015) Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature* 520(7547):373-377.
- Tyulkina LG, Skurat EV, Frolova OY, Komarova TV, Karger EM & Atabekov IG (2011) New viral vector for superproduction of epitopes of vaccine proteins in plants. *Acta naturae* 3(4):73-82.
- Udono H, Levey DL & Srivastava PK (1994) Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8+ T cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(8):3077-3081.
- Uhde-Holzem K, Fischer R & Commandeur U (2007) Genetic stability of recombinant potato virus X virus vectors presenting foreign epitopes. *Archives of virology* 152(4):805-811.
- Uhde-Holzem K, Schlosser V, Viazov S, Fischer R & Commandeur U (2010) Immunogenic properties of chimeric potato virus X particles displaying the hepatitis C virus hypervariable region I peptide R9. *Journal of virological methods* 166(1-2):12-20.
- Uher F, Dobronyi I & Gergel J (1981) IgM-Fc receptor-mediated phagocytosis of rat macrophages. *Immunology* 42(3):419-425.
- Vaknin-Dembinsky A, Murugaiyan G, Hafler DA, Astier AL & Weiner HL (2008) Increased IL-23 secretion and altered chemokine production by dendritic cells upon CD46 activation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 195(1-2):140-145.
- Valle L (2014) Genetic predisposition to colorectal cancer: where we stand and future perspectives. *World journal of gastroenterology : WJG* 20(29):9828-9849.
- van der Meer JW, Weening RS, Schellekens PT, van Munster IP & Nagengast FM (1993) Colorectal cancer in patients with X-linked agammaglobulinaemia. *Lancet* 341(8858):1439-1440.
- Van Deusen KE, Rajapakse R & Bullock TN (2010) CD70 expression by dendritic cells plays a critical role in the immunogenicity of CD40-independent, CD4+ T cell-dependent, licensed CD8+ T cell responses. *Journal of leukocyte biology* 87(3):477-485.
- van Doorn E, Liu H, Huckriede A & Hak E (2015) Safety and tolerability evaluation of the use of Montanide ISA51 as vaccine adjuvant: A systematic review. *Human vaccines & immunotherapeutics* 10.1080/21645515.2015.1071455:1-11.
- Van Lint S, Wilgenhof S, Heirman C, Corthals J, Breckpot K, Bonehill A, Neyns B & Thielemans K (2014) Optimized dendritic cell-based immunotherapy for melanoma: the TriMix-formula. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 10.1007/s00262-014-1558-3.
- Vanderplasschen A, Mathew E, Hollinshead M, Sim RB & Smith GL (1998) Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(13):7544-7549.
- Varypataki EM, van der Maaden K, Bouwstra J, Ossendorp F & Jiskoot W (2015) Cationic liposomes loaded with a synthetic long peptide and poly(I:C): a defined adjuvanted vaccine for induction of antigen-specific T cell cytotoxicity. *AAPS J* 17(1):216-226.

- Vas J, Gronwall C & Silverman GJ (2013) Fundamental roles of the innate-like repertoire of natural antibodies in immune homeostasis. *Frontiers in immunology* 4:4.
- Veiga-Fernandes H, Walter U, Bourgeois C, McLean A & Rocha B (2000) Response of naive and memory CD8⁺ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nature immunology* 1(1):47-53.
- Vernacchio L, Bernstein H, Pelton S, Allen C, MacDonald K, Dunn J, Duncan DD, Tsao G, LaPosta V, Eldridge J, Laussucq S, Ambrosino DM & Molrine DC (2002) Effect of monophosphoryl lipid A (MPL) on T-helper cells when administered as an adjuvant with pneumococcal-CRM197 conjugate vaccine in healthy toddlers. *Vaccine* 20(31-32):3658-3667.
- Verneret M, Tacnet-Delorme P, Osman R, Awad R, Grichine A, Kleman JP & Frachet P (2014) Relative contribution of c1q and apoptotic cell-surface calreticulin to macrophage phagocytosis. *Journal of innate immunity* 6(4):426-434.
- Vesikari T, Forsten A, Borkowski A, Gaitatzis N, Banzhoff A & Clemens R (2012) Homologous and heterologous antibody responses to a one-year booster dose of an MF59((R)) adjuvanted A/H5N1 pre-pandemic influenza vaccine in pediatric subjects. *Human vaccines & immunotherapeutics* 8(7):921-928.
- Vianello F, Papeta N, Chen T, Kraft P, White N, Hart WK, Kircher MF, Swart E, Rhee S, Palu G, Irimia D, Toner M, Weissleder R & Poznansky MC (2006) Murine B16 melanomas expressing high levels of the chemokine stromal-derived factor-1/CXCL12 induce tumor-specific T cell chemorepulsion and escape from immune control. *J Immunol* 176(5):2902-2914.
- Vieyra M, Leisman S, Raedler H, Kwan WH, Yang M, Strainic MG, Medof ME & Heeger PS (2011) Complement regulates CD4 T-cell help to CD8 T cells required for murine allograft rejection. *The American journal of pathology* 179(2):766-774.
- Viguiier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P & Ferradini L (2004) Foxp3 expressing CD4⁺CD25^(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173(2):1444-1453.
- Vitoriano-Souza J, Moreira N, Teixeira-Carvalho A, Carneiro CM, Siqueira FA, Vieira PM, Giunchetti RC, Moura SA, Fujiwara RT, Melo MN & Reis AB (2012) Cell recruitment and cytokines in skin mice sensitized with the vaccine adjuvants: saponin, incomplete Freund's adjuvant, and monophosphoryl lipid A. *PLoS one* 7(7):e40745.
- Vitti A, Piazzolla G, Condelli V, Nuzzaci M, Lanorte MT, Boscia D, De Stradis A, Antonaci S, Piazzolla P & Tortorella C (2010) Cucumber mosaic virus as the expression system for a potential vaccine against Alzheimer's disease. *Journal of virological methods* 169(2):332-340.
- Vo MC, Lee HJ, Kim JS, Hoang MD, Choi NR, Rhee JH, Lakshmanan VK, Shin SJ & Lee JJ (2015) Dendritic cell vaccination with a toll-like receptor agonist derived from mycobacteria enhances anti-tumor immunity. *Oncotarget*.
- Vogel CW & Fritzing DC (2010) Cobra venom factor: Structure, function, and humanization for therapeutic complement depletion. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 56(7):1198-1222.
- von Andrian UH & Mempel TR (2003) Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nature reviews. Immunology* 3(11):867-878.
- Wack A, Baudner BC, Hilbert AK, Manini I, Nuti S, Tavarini S, Scheffczik H, Ugozzoli M, Singh M, Kazzaz J, Montomoli E, Del Giudice G, Rappuoli R & O'Hagan DT (2008) Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. *Vaccine* 26(4):552-561.
- Waggoner SN, Cruise MW, Kassel R & Hahn YS (2005) gC1q receptor ligation selectively down-regulates human IL-12 production through activation of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Immunol* 175(7):4706-4714.

- Waggoner SN, Hall CH & Hahn YS (2007) HCV core protein interaction with gC1q receptor inhibits Th1 differentiation of CD4+ T cells via suppression of dendritic cell IL-12 production. *Journal of leukocyte biology* 82(6):1407-1419.
- Wahid R, Fresnay S, Levine MM & Sztein MB (2015) Immunization with Ty21a live oral typhoid vaccine elicits crossreactive multifunctional CD8+ T-cell responses against Salmonella enterica serovar Typhi, S. Paratyphi A, and S. Paratyphi B in humans. *Mucosal immunology* 8(6):1349-1359.
- Wakim LM & Bevan MJ (2011) Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8+ T-cell activation after viral infection. *Nature* 471(7340):629-632.
- Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breitmayer JP, Cottrez F & Groux H (2003) Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18(5):605-617.
- Wang G, Tschoi M, Spolski R, Lou Y, Ozaki K, Feng C, Kim G, Leonard WJ & Hwu P (2003) In vivo antitumor activity of interleukin 21 mediated by natural killer cells. *Cancer research* 63(24):9016-9022.
- Wang Z, Cao Y, Albino AP, Zeff RA, Houghton A & Ferrone S (1993) Lack of HLA class I antigen expression by melanoma cells SK-MEL-33 caused by a reading frameshift in beta 2-microglobulin messenger RNA. *The Journal of clinical investigation* 91(2):684-692.
- Warfield KL, Bosio CM, Welcher BC, Deal EM, Mohamadzadeh M, Schmaljohn A, Aman MJ & Bavari S (2003) Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(26):15889-15894.
- Wassef NM & Alving CR (1987) Complement-dependent phagocytosis of liposomes by macrophages. *Methods in enzymology* 149:124-134.
- Weninger W, Crowley MA, Manjunath N & von Andrian UH (2001) Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *The Journal of experimental medicine* 194(7):953-966.
- Werner S, Marillonnet S, Hause G, Klimyuk V & Gleba Y (2006) Immunoabsorbent nanoparticles based on a tobamovirus displaying protein A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(47):17678-17683.
- Wiesel M, Crouse J, Bedenikovic G, Sutherland A, Joller N & Oxenius A (2012) Type-I IFN drives the differentiation of short-lived effector CD8+ T cells in vivo. *European journal of immunology* 42(2):320-329.
- Wilgenhof S, Van Nuffel AM, Corthals J, Heirman C, Tuyaeerts S, Benteyn D, De Coninck A, Van Riet I, Verfaillie G, Vandeloo J, Bonehill A, Thielemans K & Neyns B (2011) Therapeutic vaccination with an autologous mRNA electroporated dendritic cell vaccine in patients with advanced melanoma. *J Immunother* 34(5):448-456.
- Wilkie S, van Schalkwyk MC, Hobbs S, Davies DM, van der Stegen SJ, Pereira AC, Burbridge SE, Box C, Eccles SA & Maher J (2012) Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *Journal of clinical immunology* 32(5):1059-1070.
- Wille-Reece U, Wu CY, Flynn BJ, Kedl RM & Seder RA (2005) Immunization with HIV-1 Gag protein conjugated to a TLR7/8 agonist results in the generation of HIV-1 Gag-specific Th1 and CD8+ T cell responses. *J Immunol* 174(12):7676-7683.
- Williams PH & Clarke CH (1974) The isolation and characterisation of a mutant of Salmonella typhimurium defective in mutation frequency decline. *Mutat Res* 22(3):243-253.
- Wilson KD, Raney SG, Sekirov L, Chikh G, deJong SD, Cullis PR & Tam YK (2007) Effects of intravenous and subcutaneous administration on the pharmacokinetics, biodistribution, cellular uptake and immunostimulatory activity of CpG ODN encapsulated in liposomal nanoparticles. *International immunopharmacology* 7(8):1064-1075.
- Win SJ, Ward VK, Dunbar PR, Young SL & Baird MA (2011) Cross-presentation of epitopes on virus-like particles via the MHC I receptor recycling pathway. *Immunology and cell biology* 89(6):681-688.

- Wirth TC, Xue HH, Rai D, Sabel JT, Bair T, Harty JT & Badovinac VP (2010) Repetitive antigen stimulation induces stepwise transcriptome diversification but preserves a core signature of memory CD8(+) T cell differentiation. *Immunity* 33(1):128-140.
- Wittmann M, Zwirner J, Larsson VA, Kirchhoff K, Begemann G, Kapp A, Gotze O & Werfel T (1999) C5a suppresses the production of IL-12 by IFN-gamma-primed and lipopolysaccharide-challenged human monocytes. *J Immunol* 162(11):6763-6769.
- Wolchok JD, Hodi FS, Weber JS, Allison JP, Urban WJ, Robert C, O'Day SJ, Hoos A, Humphrey R, Berman DM, Lonberg N & Korman AJ (2013a) Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1291:1-13.
- Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, Segal NH, Ariyan CE, Gordon RA, Reed K, Burke MM, Caldwell A, Kronenberg SA, Agunwamba BU, Zhang X, Lowy I, Inzunza HD, Feely W, Horak CE, Hong Q, Korman AJ, Wigginton JM, Gupta A & Sznol M (2013b) Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *The New England journal of medicine* 369(2):122-133.
- Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E & Grubeck-Loebenstien B (2003) Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9(2):606-612.
- Wong DY, Ong WW & Ang WH (2015) Induction of immunogenic cell death by chemotherapeutic platinum complexes. *Angewandte Chemie* 54(22):6483-6487.
- Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ, Bettini ML, Gravano DM, Vogel P, Liu CL, Tansombatvisit S, Grosso JF, Netto G, Smeltzer MP, Chaux A, Utz PJ, Workman CJ, Pardoll DM, Korman AJ, Drake CG & Vignali DA (2012) Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer research* 72(4):917-927.
- Wu J, Wu YQ, Ricklin D, Janssen BJ, Lambris JD & Gros P (2009) Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators. *Nature immunology* 10(7):728-733.
- Wu L, Jiang L, Zhou Z, Fan J, Zhang Q, Zhu H, Han Q & Xu Z (2003) Expression of foot-and-mouth disease virus epitopes in tobacco by a tobacco mosaic virus-based vector. *Vaccine* 21(27-30):4390-4398.
- Wu YL, Park K, Soo RA, Sun Y, Tyroller K, Wages D, Ely G, Yang JC & Mok T (2011) INSPIRE: A phase III study of the BLP25 liposome vaccine (L-BLP25) in Asian patients with unresectable stage III non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 11:430.
- Wurzner R, Joysey VC & Lachmann PJ (1994) Complement component C7. Assessment of in vivo synthesis after liver transplantation reveals that hepatocytes do not synthesize the majority of human C7. *J Immunol* 152(9):4624-4629.
- Xiao Z, Casey KA, Jameson SC, Curtsinger JM & Mescher MF (2009) Programming for CD8 T cell memory development requires IL-12 or type I IFN. *J Immunol* 182(5):2786-2794.
- Xu F, Jones TD & Rodgers PB (1996) Potential of chimaeric plant virus particles as novel, stable vaccines. *Dev Biol Stand* 87:201-205.
- Xu W, Zheng M, Zhou F & Chen Z (2015) Long-term immunogenicity of an inactivated split-virion 2009 pandemic influenza A H1N1 virus vaccine with or without aluminum adjuvant in mice. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 22(3):327-335.
- Xu Z, Ramishetti S, Tseng YC, Guo S, Wang Y & Huang L (2013) Multifunctional nanoparticles co-delivering Trp2 peptide and CpG adjuvant induce potent cytotoxic T-lymphocyte response against melanoma and its lung metastasis. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 10.1016/j.jconrel.2013.08.021.

- Yajima T, Yoshihara K, Nakazato K, Kumabe S, Koyasu S, Sad S, Shen H, Kuwano H & Yoshikai Y (2006) IL-15 regulates CD8+ T cell contraction during primary infection. *J Immunol* 176(1):507-515.
- Yamaguchi T, Wing JB & Sakaguchi S (2011) Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Seminars in immunology* 23(6):424-430.
- Yang CD, Liao JT, Lai CY, Jong MH, Liang CM, Lin YL, Lin NS, Hsu YH & Liang SM (2007) Induction of protective immunity in swine by recombinant bamboo mosaic virus expressing foot-and-mouth disease virus epitopes. *BMC biotechnology* 7:62.
- Yasuda T, Kamigaki T, Kawasaki K, Nakamura T, Yamamoto M, Kanemitsu K, Takase S, Kuroda D, Kim Y, Ajiki T & Kuroda Y (2007) Superior anti-tumor protection and therapeutic efficacy of vaccination with allogeneic and semiallogeneic dendritic cell/tumor cell fusion hybrids for murine colon adenocarcinoma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 56(7):1025-1036.
- Yauk CL, Berndt ML, Williams A, Rowan-Carroll A, Douglas GR & Stampfli MR (2007) Mainstream tobacco smoke causes paternal germ-line DNA mutation. *Cancer research* 67(11):5103-5106.
- Ye L, Lin J, Sun Y, Bennouna S, Lo M, Wu Q, Bu Z, Pulendran B, Compans RW & Yang C (2006) Ebola virus-like particles produced in insect cells exhibit dendritic cell stimulating activity and induce neutralizing antibodies. *Virology* 351(2):260-270.
- Yewdell JW, Norbury CC & Bennink JR (1999) Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Advances in immunology* 73:1-77.
- Yin Z, Nguyen HG, Chowdhury S, Bentley P, Bruckman MA, Miermont A, Gildersleeve JC, Wang Q & Huang X (2012) Tobacco mosaic virus as a new carrier for tumor associated carbohydrate antigens. *Bioconjugate chemistry* 23(8):1694-1703.
- Young DB & Stewart GR (2002) Tuberculosis vaccines. *British medical bulletin* 62:73-86.
- Yu J, Du W, Yan F, Wang Y, Li H, Cao S, Yu W, Shen C, Liu J & Ren X (2013) Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol* 190(7):3783-3797.
- Yusibov V, Mett V, Mett V, Davidson C, Musiychuk K, Gilliam S, Farese A, Macvittie T & Mann D (2005) Peptide-based candidate vaccine against respiratory syncytial virus. *Vaccine* 23(17-18):2261-2265.
- Zaal A, Lissenberg-Thunnissen SN, van Schijndel G, Wouters D, van Ham SM & ten Brinke A (2013) Crosstalk between Toll like receptors and C5a receptor in human monocyte derived DCs suppress inflammatory cytokine production. *Immunobiology* 218(2):175-180.
- Zaiss AK, Machado HB & Herschman HR (2009) The influence of innate and pre-existing immunity on adenovirus therapy. *Journal of cellular biochemistry* 108(4):778-790.
- Zak DE, Andersen-Nissen E, Peterson ER, Sato A, Hamilton MK, Borgerding J, Krishnamurty AT, Chang JT, Adams DJ, Hensley TR, Salter AI, Morgan CA, Duerr AC, De Rosa SC, Aderem A & McElrath MJ (2012) Merck Ad5/HIV induces broad innate immune activation that predicts CD8(+) T-cell responses but is attenuated by preexisting Ad5 immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(50):E3503-3512.
- Zaks K, Jordan M, Guth A, Sellins K, Kedl R, Izzo A, Bosio C & Dow S (2006) Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes. *J Immunol* 176(12):7335-7345.
- Zea AH, Rodriguez PC, Culotta KS, Hernandez CP, DeSalvo J, Ochoa JB, Park HJ, Zabaleta J & Ochoa AC (2004) L-Arginine modulates CD3zeta expression and T cell function in activated human T lymphocytes. *Cellular immunology* 232(1-2):21-31.

- Zeng R, Spolski R, Finkelstein SE, Oh S, Kovanen PE, Hinrichs CS, Pise-Masison CA, Radonovich MF, Brady JN, Restifo NP, Berzofsky JA & Leonard WJ (2005) Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *The Journal of experimental medicine* 201(1):139-148.
- Zhang B, Yao G, Zhang Y, Gao J, Yang B, Rao Z & Gao J (2011) M2-polarized tumor-associated macrophages are associated with poor prognoses resulting from accelerated lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Clinics (Sao Paulo)* 66(11):1879-1886.
- Zhang B, Zhang Y, Yao G, Gao J, Yang B, Zhao Y, Rao Z & Gao J (2012) M2-polarized macrophages promote metastatic behavior of Lewis lung carcinoma cells by inducing vascular endothelial growth factor-C expression. *Clinics (Sao Paulo)* 67(8):901-906.
- Zhang M, He Y, Sun X, Li Q, Wang W, Zhao A & Di W (2014) A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. *J Ovarian Res* 7:19.
- Zhang T, Breitbart M, Lee WH, Run JQ, Wei CL, Soh SW, Hibberd ML, Liu ET, Rohwer F & Ruan Y (2006) RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol* 4(1):e3.
- Zhang WW & Matlashewski G (2008) Immunization with a Toll-like receptor 7 and/or 8 agonist vaccine adjuvant increases protective immunity against *Leishmania major* in BALB/c mice. *Infection and immunity* 76(8):3777-3783.
- Zhang X, Kimura Y, Fang C, Zhou L, Sfyroera G, Lambris JD, Wetsel RA, Miwa T & Song WC (2007) Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo. *Blood* 110(1):228-236.
- Zheng X, Koropatnick J, Chen D, Velenosi T, Ling H, Zhang X, Jiang N, Navarro B, Ichim TE, Urquhart B & Min W (2013) Silencing IDO in dendritic cells: a novel approach to enhance cancer immunotherapy in a murine breast cancer model. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 132(4):967-977.
- Zhou W (2012) The new face of anaphylatoxins in immune regulation. *Immunobiology* 217(2):225-234.
- Zoglmeier C, Bauer H, Norenberg D, Wedekind G, Bittner P, Sandholzer N, Rapp M, Anz D, Endres S & Bourquin C (2011) CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Clin Cancer Res* 17:1765-1775.
- Zou W (2006) Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews. Immunology* 6(4):295-307.

ANNEXES

Annexe I : Analyse phénotypique des BMDC transférées dans des souris prétraitées avec le Tris ou PapMV

