

Université de Montréal

**Le CpG et le poly(I:C) agissent en synergie avec le
trastuzumab contre le cancer du sein HER2+**

par

Roxanne Charlebois

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en Microbiologie et Immunologie

Juin, 2015

© Roxanne Charlebois, 2015

Résumé

Chez la souris, la thérapie anti-HER2 est dépendante de la présence de cellules T CD8⁺IFN- γ ⁺ et des réponses IFN de type I. Ces IFN sont induits par les TLRs suite à la reconnaissance de signaux de danger, appelés PAMPs et DAMPs. Les TLR-3 et TLR-9 sont tous deux de bons inducteurs d'IFN de type I et sont également capable d'agir en synergie afin d'augmenter les niveaux d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-12. Notre hypothèse fut que la stimulation de ces deux TLRs mènerait à l'amélioration de l'activité anti-tumorale du trastuzumab via le recrutement et l'activation des cellules immunitaires. Nos buts furent de confirmer le potentiel thérapeutique de la combinaison de l'anticorps anti-HER2, de l'agoniste de TLR-3, le poly(I:C), et de l'agoniste de TLR-9, le CpG ODN. Des études *in vivo* et *in vitro* nous ont permis de découvrir une synergie entre ces agents qui résulte en une cytotoxicité ciblée plus efficace. De plus, cette thérapie s'avéra efficace chez des modèles CD8-dépendants et CD8-indépendants. Les souris purent rejeter leur tumeur et demeurer sains plusieurs semaines après l'arrêt des injections. Ces souris étaient également protégées lors d'un *challenge*, soulignant ainsi la présence d'une immunité mémoire. Nous avons aussi découvert que l'administration combine de trastuzumab des deux agonistes de TLRs mène à des réponses systémiques. Des études de déplétion confirmèrent que les cellules T CD8⁺ sont cruciales pour la protection à long terme des animaux, mais que les pDC sont moins impliquées que ce que l'on pourrait croire. Leur absence n'a que modestement affecté les effets de notre thérapie. À l'opposé, les cellules NK sont d'importants médiateurs des effets thérapeutiques. Des expériences d'ADCC ont révélé que le CpG ODN et poly(I:C) ont tous deux la capacité d'améliorer les fonctions des cellules NK, mais que la stimulation simultanée des TLR-3 et TLR-9 permet de maximiser les effets bénéfiques du trastuzumab. De la même manière, l'addition de CpG ODN et de poly(I:C) aux anticorps anti-HER2 a permis d'augmenter les réponses pro-inflammatoires, plus spécifiquement l'IFN- γ , le TNF- α , l'IP-10 et l'IL-12.

Mots-clés: Immunothérapies, HER2/ErbB2, trastuzumab, TLR, *in vivo*, *in vitro*, souris Balb/c, poly(I:C), CpG ODN, ADCC, NK cells, DC, pDC, CTL, IFN- γ , type I IFN, IL-12, TNF- α , IP-10

Abstract

In murine models, anti-HER2 therapy has been shown to be dependent on IFN- γ -producing CD8⁺ T cells and type I IFN responses. These IFN are induced by TLRs following the recognition of danger signals, called PAMPs or DAMPs. Both TLR-3 and TLR-9 are well known inducers of type I IFN and were also shown to act synergistically to enhance the levels of IFN- γ , TNF- α , and IL-12. Our hypothesis thus was that the stimulation of those two TLRs would lead to an enhancement of the activity of trastuzumab against tumor cells by the recruitment and activation of immune cells. Our goals were to assess the potential therapeutic effects of a combination of anti-HER2 mAbs, TLR-3 agonist poly(I:C) and TLR-9 agonist CpG ODN. *In vivo* and *in vitro* studies enabled us to discover a synergy between all agents resulting in a more efficient targeted cytotoxicity. Moreover, this therapy was fully effective in a CD8-dependant cell line as well as a CD8-independent one. Mice were able to completely reject their tumor and remain tumor-free weeks after the injections. Those mice were also protected against a rechallenge, thus underlining the presence of an immune memory. We also discovered that the combined administration of trastuzumab and the TLR agonists leads to systemic responses. Depleting studies confirmed that T CD8⁺ cells are crucial for the animal to remain tumor-free on the long term, but that pDC are far less involved than what we could have thought. Their absence only modestly affected the outcome of our therapy. On the counterpart, NK cells were important mediators of the therapeutic effect. ADCC assays revealed that both CpG ODN and poly(I:C) are able to enhance the functions of NK cells, but that simultaneous stimulation of the TLR-3 and TLR-9 allows to maximize the beneficial effects of trastuzumab. The same way, the addition of both CpG ODN and poly(I:C) to the anti-HER2 mAbs further enhanced pro-inflammatory responses, more specifically IFN- γ , TNF- α , IP-10 and IL-12.

Keywords: Immunotherapies, HER2/ErbB2, trastuzumab, TLR, *in vivo*, *in vitro*, Balb/c mice, poly(I:C), CpG ODN, ADCC, NK cells, DC, pDC, CTL, IFN- γ , type I IFN, IL-12, TNF- α , IP-10

Table des matières

Résumé.....	1
Abstract.....	2
Table des matières.....	3
Liste des tableaux 193,58ma.....	6
Liste des figures	7
Liste des sigles	9
Liste des abréviations.....	13
Remerciements.....	14
Chapitre 1 : Introduction.....	ii
1.1 Historique des thérapies anti-cancéreuses.....	ii
1.1.1. Chirurgies.....	ii
1.1.2. Hormonothérapies	iii
1.1.3. Irradiation.....	iii
1.1.4. Chimiothérapies	iv
1.1.5. Immunothérapies.....	v
1.2 Cancer du sein.....	v
1.2.1 Caractéristiques et incidence.....	v
1.2.2 Stades et grades	viii
1.2.3 Traitements.....	ix
a) Cancer du sein ER+/PR+	ix
b) Cancer du sein HER2+	xi
c) Cancer du sein triple négatif.....	xiii
1.3 ErbB2/HER2	xiv
1.4 L’Herceptin en détails	xvii
1.4.1 Modèle de production	xvii
1.4.2 Mécanismes d’action.....	xix
1.4.3 Mécanismes de résistance	xxi
1.5 Immunomodulation.....	xxiii

1.5.1 Points de contrôle immunitaire	xxiii
a) CTLA-4.....	xxiii
b) PD1 et PD-L1/2.....	xxiv
1.5.2 Récepteurs <i>Toll-like</i>	xxv
a) TLR-3.....	xxvi
b) TLR-9.....	xxvii
Chapitre 2 : Hypothèse et objectifs.....	xxx
2.1 Hypothèse.....	xxx
2.2 Objectifs du projet.....	xxx
Chapitre 3 : Matériels et méthodes	xxxix
3.1 Traitement des tumeurs transplantées et immunité mémoire.....	xxxix
3.2 Effets locaux ou systémiques	xxxix
3.3 Rôle des CTL	xxxix
3.4 Rôle des lymphocytes T CD8 ⁺	xxxix
3.5 Rôle des pDC	xxxix
3.6 Rôle des cellules NK.....	xxxix
3.7 Rôle de l'IFN- γ , du TNF- α , de l'IL-12 et de l'IP-10.....	xxxix
3.8 Analyses statistiques	xxxix
Chapitre 4 : Résultats	xxxix
4.1 Présence d'une synergie entre l'anti-HER2 et les agonistes TLR <i>in vivo</i>	xxxix
4.2 Des réponses systémiques sont atteintes avec la thérapie combinée	xl
4.3 <i>In vivo</i> , la thérapie encourage l'activité des CTL	xli
4.4 Les deux agonistes TLR induisent une sécrétion prononcée d'IFN- γ par les cellules T CD8 ⁺	xlii
4.5 La présence des cellules T CD8 ⁺ est nécessaire pour la protection à long terme des individus traités	xliii
4.6 Les pDC ne sont que faiblement impliquées dans les effets thérapeutiques.....	xliv
4.7 Les cellules NK sont essentielles à la synergie observée.....	xlv
4.8 L'activité cytotoxique des cellules NK est maximisée en présence des deux agonistes de TLR.....	xlv

4.9 La thérapie combinée permet d'atteindre de forts niveaux d'IFN- γ , IP-10, TNF- α et IL-12.....	xlvi
Chapitre 5 : Discussion	xlix
5.1 Le CpG ODN et le poly(I:C) agissent en synergie avec l'anti-HER2 <i>in vivo</i>	xlix
5.2 L'administration combinée de CpG/poly(I:C) et de trastuzumab offre des réponses systémiques	l
5.3 La thérapie combinée résulte en une amélioration de l'activité CTL <i>in vivo</i>	li
5.4 Le CpG ODN et le poly(I:C) induisent une production plus élevée d'IFN- γ par les cellules T CD8 ⁺	lii
5.5 Les cellules T CD8 ⁺ sont importantes pour la protection à long terme	liv
5.6 Les pDC ne contribuent que modestement à la thérapie.....	liv
5.7 La synergie observée est dépendante des cellules NK.....	lv
5.8 Les deux agonistes sont nécessaires afin de maximiser la cytotoxicité médiée par les cellules NK.....	lvi
5.9 La synergie induit de plus hauts niveaux d'IFN- γ , IP-10, TNF- α et IL-12	lvii
Chapitre 6 : Conclusions.....	lix
Bibliographie.....	lxiii
Annexe 1. Figures supplémentaires	lxxvi

Liste des tableaux

Tableau 1. Statistiques d'incidence et de mortalité de certains cancers du Canada	vii
Tableau 2. Description des quatre stades de cancer du sein	viii
Tableau 3. Description des trois grades possibles de cancer du sein selon le score accordé.....	ix

Liste des figures

Figure 1. Conformation et dimérisation des EGFR	xvi
Figure 2. Les voies signalétiques induites par HER2	xvii
Figure 3. Voies de signalisation empruntées lors de la stimulation des différents TLRs.....	xxix
Figure 4. La combinaison d'anti-HER2, de CpG ODN et de polyI:C induit le rejet des tumeurs HER2+	xxxix
Figure 5. La combinaison d'anti-HER2, de CpG ODN et de polyI:C induit le rejet des tumeurs HER2+	xxxix
Figure 6. Les souris CR sont protégées lors d'un challenge subséquent.	xl
Figure 7. La combinaison d'anti-HER2, de CpG ODN et de polyI:C induit des réponses systémiques.....	xl
Figure 8. L'administration d'anti-HER2, de CpG ODN et de polyI:C induit une plus forte cytotoxicité médié par les CTLs.	xli
Figure 9. L'administration de CpG ODN et de polyI:C induit une plus forte stimulation des cellules T CD8+ produisant de l'IFN- γ	xlii
Figure 10. La déplétion <i>in vivo</i> des cellules T CD8+ élimine les effets du CpG ODN et du polyI:C, en plus de la protection à long terme de la combinaison chez les tumeurs TUBO...	xliii
Figure 11. La déplétion <i>in vivo</i> des cellules T CD8+ réduit l'efficacité de la combinaison chez les tumeurs H2N100	xliv
Figure 12. La déplétion <i>in vivo</i> des pDC n'affecte que modestement l'efficacité du CpG ODN et du polyI:C, ainsi que la combinaison.....	xliv
Figure 13. La déplétion <i>in vivo</i> des cellules NK élimine les effets de l'anti-HER2 et réduit dramatiquement l'efficacité de la combinaison.	xlvi
Figure 14. La stimulation <i>in vitro</i> de cellules NK avec l'anti-HER2 et le CpG/polyI:C induit de plus hauts niveaux d'activité cytolytique chez ces cellules	xlvii
Figure 15. Les cellules immunitaires actives par l'anti-HER2, le CpG ODN et le polyI:C sécrètent plus de cytokines pro-inflammatoires.....	xlviii
Fig.Sup.1. Les deux agonistes sont nécessaires afin d'obtenir un effet maximal sur la croissance des tumeurs.....	lxxvi

Fig.Sup.2. Stratégie employée lors de l'analyse des cellules T CD8⁺ produisant de l'IFN- γ lxxvi

Fig.Sup.3. Stratégie employée lors de la confirmation des déplétions, ici suite à l'usage de l'anti-CD8 β lxxvi

Fig.Sup.4. Stratégie employée lors de la confirmation de la viabilité et de la pureté des cellules NK suite à l'enrichissement lxxvi

Fig.Sup.5. La stimulation *in vitro* des PBMC, dont les cellules NK ont été retirées, avec l'anti-HER2 et le CpG/polyI:C induit peu d'activité cytotoxique..... lxxvi

Fig.Sup.5. Stratégie employée lors de l'analyse des cellules NK en dégranulation..... lxxvi

Fig.Sup.6. La stimulation *in vitro* de PBMCs avec l'anti-HER2 et le CpG/polyI:C induit de plus hauts niveaux de dégranulation chez les cellules NK lxxvi

Liste des sigles

ADCC : cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante

ADN : acide désoxyribonucléique

AP : phosphatase alcaline

APAF-1 : facteur activateur de l'apoptose 1

APC : cellule présentatrice d'antigène

ARN : acide ribonucléique

BAD : promoteur de mort associée à Bcl-2

Bcl : protéine de lymphome de cellules B

Bcl-2 : protéine 2 de lymphome de cellules B

BRM : modulateur de réponse biologique

cDC : cellules dendritiques conventionnelles

Cdk : kinase cycline-dépendante

CDR : régions déterminant la complémentarité

CHO : cellules ovariennes de hamster chinois

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CpG ODN : oligonucléotides de motifs CpG

CTL : lymphocyte T cytotoxique

CR : répondeur complet (*complete responder*)

DAMP : patron moléculaire associé à un danger

DC : cellules dendritiques

DCIS : carcinome canalaire *in situ*

EGFR : récepteur de facteurs de croissance épithéliaux ; peut aussi faire référence à HER1

ELK : facteur de transcription « ELK »

EMCS : ester N-[ε-maleimidocaproyloxy]succinimide

ER : récepteur à l'œstrogène

ERDs : répresseurs du récepteur à l'œstrogène

ERK : kinase extracellulaire régulée par signal

FADD : protéine associée à Fas avec domaine de mort

FLICE : enzyme ressemblant à FADD convertissant l'interleukine 1 bêta

FLIP : protéine inhibitrice ressemblant à FLICE
FOS : facteur de transcription; homologue de l'oncogène viral d'ostéosarcome murin FBJ
HER1 : récepteur épithélial humain 1
HER2 : récepteur épithélial humain 2
HER3 : récepteur épithélial humain 3
HER4 : récepteur épithélial humain 4
HRP : peroxydase de raifort
IFN- γ : interféron gamma
IGF-IR : récepteur du facteur de croissance I ressemblant à l'insuline
I κ B : inhibiteur de kappa B
IL-12 : interleukine 12
IP-10/CXCL10 : protéine interféron-inductible 10
IRF3 : facteur de transcription régulant l'interféron 3
IRF5 : facteur de transcription régulant l'interféron 5
IRF7 : facteur de transcription régulant l'interféron 7
JAK 1/2: kinases Janus 1 et 2
JNK : kinase « Jun »
JUN : facteur de transcription « JUN »
KO : *knock-out*
LHRHs : agents hormonaux lutéinisants relâchant des hormones
mAb : anticorps monoclonal
MAPK : protéine kinase activée par mitogène
MAP2K : MAP kinase kinase
MAP3K : MAP kinase kinase kinase
MDSC : cellule suppressive myéloïde-dérivée
MEK : aussi nommé MAP2K; protéine kinase kinase mitogène-activée
MFI : intensité moyenne de fluorescence
MIP : protéine inflammatoire de macrophage
MMTV : virus de tumeur mammaire murine
MUC4 : mucine 4

MYC : facteur de transcription; homologue de l'oncogène viral du myélocytomatose aviaire
V-Myc

MyD88 : réponse primaire de la différenciation myéloïde 88

NF-κB : facteur nucléaire kappa B

NK : cellules *natural killer*

NOD : non-obese diabetic

NSG : NOD SCID gamma

OCT : température optimale de coupe (*optimal cutting temperature*)

PAMP : patron moléculaire associé à un pathogène

PARP : polymérase poly ADP-ribose

PBMC : cellule mononucléée du sang périphérique

pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes

poly(I:C) : acide polyinosinique-polycytidylique

PRR : récepteur à reconnaissance de patron

PTEN : homologue de phosphatase et tensine

PR : récepteur à la progestérone

RAF : aussi nommé MAP3K; protéine kinase kinase kinase mitogène-activée

RANTES/CCL5 : sécrété et exprimé par les cellules T normales, régulé lors de l'activation

Ras : GTPase « Ras »

RIP1 : protéine kinase sérine/thréonine 1 interagissant sur le récepteur

SCID : immunodéficiência combinée sévère

SDR : régions déterminant la spécificité

SERMs : modulateurs sélectifs de la réponse du récepteur à l'œstrogène

STAT3 : transducteur de signal et activateur de transcription 3

TAA : antigène associé à la tumeur

TCR : récepteur des cellules T

TIR : récepteur Toll/interleukine-1

TLR-3 : récepteur *Toll-like 3*

TLR-9 : récepteur *Toll-like 9*

TNF-α : facteur de nécrose tumorale alpha

T_{reg} : cellule T régulatrice

TRIF : adaptateur contenant un domaine TIR induisant l'IFN- β

TRAF2 : facteur 2 associé au récepteur TNF

VEGF : facteur de croissance endothéliale vasculaire

WT : espèce sauvage (*wild type*)

XIAP : protéine inhibitrice d'apoptose reliée au X

Liste des abréviations

e.g. : *exempli gratia* (latin pour « exemple »)

i.e. : *id est* (latin pour « c'est-à-dire »)

i.p. : intrapéritonéal(e)

i.t. : intratumoral(e)

i.v. : intraveineux(se)

s.c. : sous-cutané(e)

Remerciements

J'aimerais remercier tous ceux qui ont participé de loin ou de près à l'avancement de mon projet de recherche ainsi qu'à la rédaction de ce mémoire.

Tout d'abord, merci à mon directeur de recherche, le Dr. John Stagg, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et d'avoir participé activement à ma formation professionnelle et à l'avancement de mon projet pendant ces deux années.

Je tiens à souligner le travail incroyable effectuée par mes collègues au laboratoire, mais aussi au sein de l'Institut du Cancer de Montréal (ICM) et du Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM). Les collaborations faciles entre laboratoires de recherche ont été d'une aide précieuse. De plus, vos personnalités si diversifiées et agréables ont su rendre mon séjour à vos côtés des plus positifs.

Je remercie la généreuse participation du Dre. Isabelle Royal et du Dr. Jean-François Cailhier au comité de suivi de cette maîtrise, ainsi que celle de Pavel Chrobak à titre de parrain.

Enfin, merci à mes parents qui ont également contribué à leur façon en m'encourageant depuis longtemps à persévérer et me rendre aussi loin que possible dans tout ce que j'entreprends. Je tiens à vous remercier pour toute votre aide, morale ou matérielle, durant toutes mes études.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Historique des thérapies anti-cancéreuses

1.1.1. Chirurgies

La notion de «cancer» peut être retracée jusqu'à 3000 ans av. J.-C à l'aide d'écrits d'ancienne Égypte ayant survécu à la poussière du temps. La traduction d'un papyrus, nommé le «papyrus Edwin Smith» de par son acheteur en 1862, dévoila un texte de traumatologie écrit par des anciens Égyptiens chirurgiens [1]. Il y est décrit huit cas de tumeurs et ulcérations du sein où le traitement prescrit était de cautériser le sein à l'endroit où la masse était palpable. Le texte se conclut cependant en soulignant que cette maladie est incurable.

En 460-370 av. J.-C., en Grèce antique cette fois-ci, l'illustre médecin Hippocrate emploie pour la première fois une terminologie bien précise selon les cas. Lorsqu'une masse n'est pas accompagnée d'une ulcération, il la nomme «carcinos», alors qu'en présence d'ulcération, il la nomme «carcinoma» [1]. La racine *carcino* fait référence au crabe et fut probablement choisie en référence aux projections faites par la tumeur.

Au 2^e siècle ap. J.-C., un médecin Romain nommé Aulus C. Celsus écrivait qu'une masse excisée avec succès revenait toujours avec le temps [2]. Il traduisit également le mot «carcinos» en latin, ce qui donna le terme «cancer» pour la première fois [1]. Au même moment, un autre médecin et chirurgien Grec, nommé Galen, soulignait qu'un patient ayant une masse croissante était voué à en mourir [3]. Il utilisa le mot «oncos», c'est-à-dire «enflure» en grec, afin de décrire une tumeur. Pendant près de mille ans, les travaux de cet homme ancrèrent dans la mentalité populaire la théorie qu'un cancer était incurable. Ils avaient convaincu les gens que des traitements étaient futiles et même dangereux. En effet, l'excision chirurgicale d'une masse mettait la vie du patient en péril, principalement dû à la perte de sang importante. La mort était donc inévitable.

Au cours du 19^e siècle, l'anesthésie apparut dans le domaine médical et mena à un développement rapide des techniques d'opérations chirurgicales. Parmi celles-ci, le professeur William S. Halsted, de l'Université Johns Hopkins, proposa la mastectomie radicale chez les patientes atteintes d'un cancer du sein [4]. Cette idée faisait suite aux travaux de W. Sampson

Handley, un chirurgien londonien, qui croyait qu'un cancer s'étalait en envahissant le tissu adjacent au site d'apparition [5]. Halsted croyait ainsi qu'il était possible de guérir le cancer en excisant adéquatement le tissu atteint. Si une autre tumeur apparaissait, il s'agissait pour lui d'un tout nouveau cancer et non d'une dissémination. Alors qu'Halsted et Handley travaillaient sur ces chirurgies radicales, le chirurgien anglais Stephen Paget étudiait la notion de métastases et les facteurs qui déterminaient les organes qui seraient atteints. Il conclut avec une justesse surprenante que les cellules cancéreuses d'une première tumeur devaient emprunter la circulation sanguine afin d'envahir le corps, mais que seulement certains organes étaient propices à leur prolifération. Il fit d'ailleurs une analogie forte intéressante entre les métastases et des «graines voyageant avec le vent en toutes directions, mais qui ne peuvent survivre et croître qu'en sol fertile» [6].

1.1.2. Hormonothérapies

À la même époque, George T. Beatson s'intéressa aux relations entre les ovaires et la lactation. Il observa chez des lapines que le retrait chirurgical des ovaires menait à l'arrêt de production de lait. Cette découverte fut d'un grand intérêt, car elle démontrait le pouvoir qu'un organe avait sur l'activité d'un autre organe distant. Il décida d'étudier ces faits chez l'humain et découvrit qu'une ovariectomie chez des patientes atteintes d'un cancer du sein améliorait leur état de santé. Bien que l'hormone féminine produite par les ovaires, l'estrogène, ne fut identifiée que plus tard, cet homme venait de découvrir ses effets stimulateurs. Ses travaux menèrent éventuellement au développement de produits visant à réduire les niveaux d'estrogène, tel le tamoxifène et les inhibiteurs d'aromatases [7]. Cinquante ans plus tard, faisant suite à ces travaux, Charles Huggins observa des régressions importantes de cancers prostatiques chez les patients ayant subi une castration [8]. L'apparition de drogues inhibant les hormones masculines, *i.e.* les androgènes et la testostérone, offrirent des résultats bénéfiques aux patients.

1.1.3. Irradiation

Wilhelm Roentgen était un physicien du 18^e siècle qui entreprit des expériences sur les rayons ainsi que leur nature. Alors qu'il étudiait un rayonnement particulier, il décida d'analyser le pouvoir pénétrant de son faisceau avec divers objets. À sa grande surprise, alors qu'il plaçait un morceau de plomb devant le dit faisceau, il put apercevoir les os de sa main. Un an plus tard,

en 1896, il publia une photographie sur laquelle on pouvait voir les os de la main de sa femme ainsi que la bague qu'elle portait [9]. Il reçut le premier prix Nobel de physique en 1901 suite à la découverte de ce qu'il appela les «rayons X». L'usage de machines utilisant le radium, un élément radioactif, comme source de rayons X permit la naissance du diagnostic par radiation [9]. Peu de temps après, en France, il fut observé qu'une dose quotidienne de radiation offrait aux patients de meilleures chances de survie. La radiothérapie fut donc combinée au retrait chirurgical des tumeurs afin de réduire les risques de rechute. Cependant, quelques années plus tard, la communauté scientifique découvrit que les rayons pouvaient également mener au développement d'un cancer [9]. Les avancements en physique ainsi qu'en technologies au fil du temps permirent de mieux diriger les rayons émis et donnèrent naissance aux thérapies modernes. Ces dernières sont maintenant capables de cibler précisément la tumeur afin que les rayons n'atteignent pas les cellules normales et que les cellules tumorales, elles, reçoivent une dose maximale de radiation.

1.1.4. Chimiothérapies

Lors de la Première Guerre mondiale, les études effectuées sur les armes chimiques menèrent à la découverte de la «moutarde azotée», un dérivé du gaz moutarde. Ce produit s'avéra efficace dans le cadre du traitement du lymphome et fut la première étape menant au développement des agents alkylants, qui endommagent l'acide désoxyribonucléique (ADN) des cellules cancéreuses [10]. Peu de temps après, Sydney Farber découvrit que l'aminoptérine, un antagoniste de l'acide folique (vitamine B9), permettait de traiter efficacement des enfants atteints de leucémies aiguës [11]. Ce produit, agissant en bloquant la réplication de l'ADN, donna plus tard naissance au méthotrexate, qui est encore utilisé aujourd'hui. Il permit pour la première fois de guérir des cancers métastatiques. À partir de ce moment, plusieurs chercheurs centrèrent leur effort sur la découverte de nouvelles drogues qui affecteraient la biologie cellulaire du cancer et la notion de «chimiothérapie» fut instaurée. Il fut observé qu'une excision de la tumeur par chirurgie suivie d'une chimiothérapie permettait d'éliminer toutes cellules résiduelles qui auraient également échappé à la radiothérapie. Des études où l'on combina plusieurs drogues démontrèrent par la suite une efficacité surprenante envers des cancers à croissance rapide. Plusieurs types de cancer furent donc traités de cette manière afin de guérir les patients, ou du moins permettre de contrôler la prolifération de leur tumeur.

1.1.5. Immunothérapies

L'avancement technologique et le raffinement des méthodes d'analyse permirent à la communauté scientifique de mieux comprendre les procédés biologiques ainsi que les facteurs les régulant. Plusieurs notions firent leur apparition telles l'hématopoïèse, les réponses immunitaires innées et adaptatives, les processus contribuant à la carcinogenèse, etc. À titre d'exemple, les cytokines, comportant des interleukines, chimiokines, interférons et autres, furent découvertes. S'en suivit l'idée de recréer certains composés en laboratoire et de traiter des patients avec ces derniers afin de moduler des processus biologiques. Il devenait alors possible de cibler directement les cellules cancéreuses afin d'altérer leur croissance ou encore de stimuler l'immunité anti-tumorale du patient. La découverte de molécules spécifiques aux tumeurs, les antigènes tumoraux, ainsi que les avancés en biologie moléculaire soulevèrent la théorie qu'il serait possible de créer des anticorps ciblant des antigènes tumoraux. Les méthodes utilisant des recombinaisons ADN rendirent possibles cette production de masse d'anticorps spécifiques. Depuis, plusieurs sont utilisés couramment comme thérapie chez certains cancers et les scientifiques ne cessent leurs efforts afin d'en découvrir d'autres. Parmi les technologies en cours de développement, on retrouve également des vaccins comportant des antigènes tumoraux [12], des transferts adoptifs de cellules immunitaires [13] [14], des vaccins ADN [15] et autres.

L'arrivée des technologies modernes apporta avec elle une plus grande discrimination entre les cellules tumorales et les cellules normales chez les patients. Elle apporta ainsi également une augmentation de l'efficacité des traitements tout en réduisant les effets secondaires qui étaient observés avec les premières thérapies.

1.2 Cancer du sein

1.2.1 Caractéristiques et incidence

Au Canada, selon les statistiques anticipées pour 2015, le cancer du sein représentera 25,9% des 96 400 nouveaux cas de cancer et se classerait ainsi comme étant le plus commun chez les femmes adultes (*Tab.1*) [16]. Le nombre d'incidences s'est accru au début des années 1990 suite au développement des techniques de mammographie ainsi qu'à l'augmentation du

nombre de patientes examinées. Depuis, certaines fluctuations ont été observées sans avoir été associées précisément à certains événements. Par contre, il est fort probable qu'elles soient reliées à des phénomènes tels l'arrivée des menstruations à un plus jeune âge, l'allaitement, l'entrée en ménopause à un âge plus mature, l'utilisation populaire des contraceptifs oraux ainsi que des grossesses à un âge plus tardif. Bien que le nombre de patients ayant succombé à leur cancer aie augmenté avec le temps, la vitesse de croissance, elle, diminue depuis 1988 grâce aux nouvelles thérapies développées. La mortalité associée aux cancers du sein s'élèverait malgré tout à 13,6% pour l'année 2015 et représenterait le deuxième type de cancer le plus mortel après le cancer du poumon au pays [17].

Parmi les différentes manières de classer les types de cancer du sein, on retrouve celle les divisant en sous-groupes selon l'expression de certains récepteurs clés. Il s'agit des récepteurs de l'œstrogène (ER), de la progestérone (PR) et HER2 [18]. Ce classement a pour but de donner des informations importantes aux cliniciens afin de mieux choisir les traitements appropriés pour une certaine patiente. Il suffit d'effectuer une biopsie et de faire quelques coupes histologiques, qui seront par la suite traitées par histochimie afin de détecter le ou les récepteurs surexprimés. Grâce à ces évaluations, la tumeur de la patiente peut ainsi être associée à l'une des catégories suivantes :

- récepteurs endocrines positif (ER⁺/PR⁺)
- HER2 positif (HER2⁺)
- triple positif (ER⁺/PR⁺ et HER2⁺)
- triple négatif (aucun des trois récepteurs)

De tous les cancers du sein, 75% possèdent le récepteur ER et environ 65% de ceux-ci expriment également le récepteur PR. Les cellules mammaires normales sont dépourvues de ces deux récepteurs, mais leur transformation en cellules tumorales induit leur expression. Lorsqu'ils sont stimulés, tous deux transmettent un signal qui emprunte les voies MAPK, PI3K/Akt et NF-κB [19] [20]. Tel que décrit auparavant, ces voies de signalisation résultent en signaux de survie et prolifération, ce qui encourage la croissance de la tumeur.

Tableau 1. Statistiques d'incidence et de mortalité de certains cancers du Canada

Hommes		Femmes		Hommes		Femmes	
Nouveaux cas	100 500	Nouveaux cas	96 400	Morts	41 000	Morts	37 000
Prostate	23,9%	Sein	25,9%	Poumon	26,6%	Poumon	27,0%
Colorectal	13,9%	Poumon	13,5%	Colorectal	12,4%	Sein	13,6%
Poumon	13,5%	Colorectal	11,5%	Prostate	10,1%	Colorectal	11,5%
Vessie	6,1%	Utérus	6,5%	Pancréas	5,6%	Pancréas	6,2%
Lymphome non-Hodgkin	4,5%	Thyroïde	5,0%	Vessie	4,0%	Ovaire	4,7%

Les cancers exprimant HER2, quant à eux, représentent de 30 à 35% des cas totaux et sont associés à des patientes ayant des tumeurs plus agressives. Chez l'humain, les cellules saines comportent deux copies du gène *HER2*. Il arrive cependant qu'il y ait amplification du locus, ce qui résulte en plusieurs copies du gène dans la même cellule et donc une production accrue de la protéine HER2. Une surexpression de cette protéine mène ainsi à une forte stimulation des voies MAPK, JAK/STAT, PI3K/Akt et NF-κB via son hétérodimérisation avec HER3. De tous les cas de cancer du sein HER2⁺, il y en a environ 20% qui sont triple positifs [21]. Les voies de signalisation mentionnées sont donc stimulées par trois récepteurs différents à la fois, ce qui résulte en signaux de survie et de prolifération forts et soutenus au sein de la tumeur.

Les cancers du sein qualifiés de « triple négatifs » englobent 10 à 20% des cas, ce qui représente un peu plus d'une patiente sur 10 [22] [23]. Ils sont décrits comme plus agressifs que les autres types, car ils peuvent s'étendre à d'autres organes et sont fortement à risque de réapparaître après traitement. À titre comparatif, 77% des patientes atteintes de ce type de cancer survivent au moins 5 ans, alors que chez les autres la proportion atteint 93%. Il est également décrit que les cancers triple négatifs sont souvent d'un grade plus avancé (grade 3) lors du diagnostic. En plus, ce type de cancer du sein est majoritairement du genre « *basal-like* », c'est-à-dire ressemblant fortement aux cellules basales tapissant les canaux de lactation. Ce manque de différenciation empêche le système immunitaire de bien reconnaître le danger, ce qui associe

d'autant plus ce type de cancer à une forte agressivité. Les statistiques démontrent que ce sont en grande partie les femmes afro-américaines et hispaniques, âgées de 40 à 50 ans, qui sont à risque d'être touchées. De plus, les femmes possédant une mutation BRCA1 qui développent un cancer du sein avant 50 ans sont pratiquement toujours de type triple négatif [24].

1.2.2 Stades et grades

Divers tests permettent de récolter de plus amples détails sur l'état de la patiente et l'avancement de son cancer. En plus des biopsies, on peut penser à la tomographie (*PET scan*), la tomodensitographie (*CT scan*), l'imagerie aux rayons X ou aux échographies. En plus de l'évaluation des récepteurs présents dans une tumeur, les médecins basent leur pronostic sur ce qu'on appelle le stade et le grade.

Le stade d'un cancer permet aux médecins d'identifier l'état de la tumeur, c'est-à-dire si elle est à un stade précoce, localement avancé ou métastatique. On distingue les tumeurs en quatre stades selon leur taille, l'invasion des nœuds lymphatiques et la présence de métastases [25]. Différents scénarios peuvent faire partie du même stade selon leur facteur prédictif tel que décrit dans le *Tableau 2*.

Tableau 2. Description des quatre stades de cancer du sein

Stade	Scénario	Taille de la tumeur	Nœuds lymphatiques	Métastases
1	1	≤ 2 cm	négatif	aucun
	1	≤ 2 cm	négatif	aucun
2	2	entre 2 et 5 cm	négatif ou positif	aucun
	3	> 5 cm	négatif	aucun
3	1	peu importe	positif	aucun ou près de la clavicule
	2	> 5 cm	positif	aucun
	3	ulcérée	positif	aucun
4	1	peu importe	positif	oui

En résumé, le stade I reflète un stade précoce et non invasif du cancer. Les stades II et III regroupent les cancers de taille moyenne ou s'étend étendus dans les tissus adjacents, avec une possible infiltration des nœuds lymphatiques. Finalement, le stade IV est le pire des scénarios où la tumeur s'est étendue à d'autres parties du corps et a formé des métastases. Dans le cas du cancer du sein, les métastases affectent surtout les poumons, le cerveau, les os et le foie.

Lorsqu'on parle de grade, on fait plutôt référence à l'allure des cellules tumorales et leur agressivité. Les pathologistes utilisent majoritairement le système Nottingham, une version modifiée de l'échelle Bloom-Richardson [26], pour évaluer les cancers du sein. Cette échelle évalue trois caractéristiques des cellules tumorales au microscope, soit leur degré de différenciation, de croissance et leur potentiel invasif, et leur donne à chacun un score de 1 à 3 [25]. Le total final obtenu par l'addition des trois est ce qui détermine le grade de la tumeur (*Tableau 3*).

Tableau 3. Description des trois grades possibles de cancer du sein selon le score accordé

Grade	Score	Cellules	Croissance	Potentiel invasif
1	3-5	bien différenciées	faible	faible
2	6-7	modérément différenciées	modérée	modéré
3	8-9	peu ou pas différenciées	forte	grand

1.2.3 Traitements

En termes de chirurgie et d'irradiation, tous les sous-types sont traités relativement de la même manière. La différence entre leur traitement réside dans le choix de chimiothérapie [27]. Par exemple, une tumeur possédant les récepteurs ER et PR sont sensibles aux thérapies hormonales, alors qu'un autre étant triple négative n'en bénéficiera peu ou pas.

a) Cancer du sein ER+/PR+

Pour ce qui est des cas ER⁺ et PR⁺, les patients reçoivent des thérapies hormonales dans lesquelles on retrouve les modulateurs sélectifs de la réponse du récepteur à l'œstrogène (SERM),

les inhibiteurs d'aromatase, les répresseurs du récepteur à l'œstrogène (ERD) et les agents hormonaux lutéinisants relâchant des hormones (LHRH) [28]. Les SERMs agissent directement dans les tissus du sein en se liant aux récepteurs à l'œstrogène, ce qui a pour effet d'empêcher l'hormone de s'y lier et d'enclencher une cascade signalétique. Les SERMs peuvent être administrés par voie orale (pilules) autant chez les femmes pré-ménopausées que post-ménopausées. Les plus connus sont le Nolvadex[®] (tamoxifène) et le Fareston[®] (torémifène) [29]. Nolvadex[®] est employé pour réduire la probabilité de développer un cancer chez les patientes à haut risque ainsi que réduire les chances que le cancer soit invasif chez les patientes atteintes d'un carcinome canalaire *in situ* (DCIS). Les études cliniques effectuées ont démontré que les patientes sous ce médicament ont réduit leur risque de développer un cancer de 44% [30]. Nolvadex[®] est aussi employé chez les femmes ayant terminé leurs traitements préliminaires (chirurgie, irradiation et chimiothérapie).

Les inhibiteurs d'aromatase, comme leur nom l'indique, agissent en bloquant l'action de l'enzyme aromatase. Cette dernière a comme rôle de convertir une enzyme androgène en petites quantités d'œstrogène. Lorsque l'aromatase est inhibée, il en découle alors de moins grandes quantités d'œstrogène pouvant stimuler les cellules cancéreuses. Les inhibiteurs les plus utilisés sont l'Arimidex[®] (anastrozole), l'Aromasin[®] (exemestane) et le Femara[®] (letrozole) [29]. À titre d'exemple, Arimidex[®] est donné comme première ligne de traitement chez les femmes ER⁺/PR⁺, mais est également employé chez celles pour qui le tamoxifène n'agit plus [31]. Suite à des études cliniques, l'Arimidex[®] a su améliorer la survie des patientes de 13% ainsi qu'améliorer de 21% le temps de récurrence [32]. Ces médicaments sont, comme les SERMs, donnés par voie orale. Cependant, ces produits sont seulement employés chez les femmes ménopausées, car ils ne peuvent empêcher les ovaires de produire de l'œstrogène. Chez ces femmes, cette hormone provient principalement des glandes surrénales et du tissu adipeux.

Les ERDs prennent également action dans le tissu mammaire même. Comparés au SERMs, qui créent un encombrement stérique, les ERDs se logent directement dans le récepteur de l'œstrogène. En plus d'empêcher l'hormone de s'y lier, ces agents induisent un changement de conformation du récepteur qui réduit l'efficacité du signal. De plus, il semble que les ERDs amènent une réduction du nombre de récepteurs à l'œstrogène à la surface des cellules cancéreuses. Le plus commun, le Faslodex[®] (fulvestrant), est employé chez les femmes ménopausées chez lesquelles les thérapies classiques (*i.e.* tamoxifène) ont échoué ou n'offrent

plus de bénéfice [29] [33]. Ce médicament est administré par injection intramusculaire, généralement dans la fesse. Lors d'essais cliniques randomisés, les patientes ayant reçu le Faslodex ont démontré une amélioration de 19% du taux de survie [34].

Finalement, les LHRHs amènent également une réduction des niveaux d'œstrogène, cependant ils y arrivent en bloquant sa synthèse par les ovaires. Les femmes non-ménopausées peuvent recevoir cette thérapie par voie sous-cutanée lorsque leur cancer est à un stage précoce [29]. Une fois les traitements arrêtés, les ovaires peuvent produire de l'œstrogène de nouveau. À titre d'information, ces femmes peuvent recevoir du Zoladex[®] (goseréline), du Lupron[®] (leuprolide) ou du Trelstar[®] (triptoréline). Le premier est souvent prescrit en combinaison avec le tamoxifène chez les femmes pré-ménopausées afin de réduire au maximum leurs niveaux d'œstrogène. Il est également employé chez les femmes ayant des métastases ou un cancer du sein récurrent, voir même à titre de traitement palliatif [35]. Le Zoladex[®] offre une réponse positive dans environ 33% des cas et même une réponse complète chez certaines patientes (9%) [36].

b) Cancer du sein HER2+

Chez les patientes ayant un cancer du sein HER2⁺ (incluant triple positif), les thérapies usent d'agents nommés « modulateurs de réponse biologique » (BRMs). Leurs buts sont de cibler les cellules tumorales afin de les tuer, les contrôler ou encore de changer leur comportement. Ils sont généralement prescrits chez les patientes à risque élevé et dans les cas de stades avancés ou métastatiques de cancer du sein. Un des BRMs fortement employés, l'Herceptin[®] (trastuzumab), est un anticorps spécialement créé afin de cibler les protéines HER2 à la surface des cellules tumorales et d'inhiber leurs signaux de croissance, menant ainsi à leur mort [29]. Les patientes soumises à cette thérapie reçoivent les doses d'anticorps par la voie intraveineuse. Dans la majorité des cas, l'Herceptin est prescrit à titre d'adjuvant et est combiné avec d'autres agents thérapeutiques de nature hormonale ou chimique. Dans d'autres cas, il est employé seul à titre de traitement de métastases jusqu'à ce qu'il y ait amélioration de l'état de santé [29] [37]. Les études cliniques ont démontré une amélioration de 44% de la survie globale des patientes ayant reçu une chimiothérapie combinée à l'Herceptin suite à leur chirurgie [38]. Dans un tel contexte, il y a cependant 15-20% d'entre elles qui ont une rechute. De plus, la majorité des patientes traitées

pour leurs métastases développent une résistance pendant leur première année de traitement à l'Herceptin [39].

Kadcyla[®] (T-DM1) allie le trastuzumab à une molécule d'emtansine (DM1), une drogue cytotoxique nouvellement développée dans le cadre du cancer. Le T-DM1 est également injecté de manière intraveineuse, mais est plutôt employé chez les patientes atteintes de métastases ayant déjà reçu une thérapie à l'Herceptin, en combinaison ou non avec une chimiothérapie [29]. L'emtansine est un agent dérégulateur de microtubules qui agit en inhibant la polymérisation de la tubuline. Lors d'études *in vitro*, il fut démontré que cet agent possède un potentiel anticancéreux plus élevé que d'autres bien connus tels le méthotrexate ou la daunorubicine. Sachant en plus que les cancers du sein humains sont particulièrement sensibles aux agents ciblant la tubuline (*e.g.* le paclitaxel et le docétaxel), il fut proposé de créer un conjugué composé d'un anticorps de trastuzumab (Herceptin[®]) et d'une molécule de DM1. Ainsi, l'anticorps transporte la drogue avec lui jusqu'à la cellule tumorale puis se lie au récepteur HER2. S'en suit une internalisation du conjugué, puis la protéolyse prenant place dans la vésicule permet au DM1 d'être libéré et d'entreprendre l'inhibition des tubules [40]. Par contre, lors d'essais cliniques de phases I et II, le T-DM1 s'est avéré sécuritaire mais aucunement bénéfique chez des patients atteints d'un cancer HER2⁺ métastatique [41]. Bien que certains de ceux-ci puissent avoir une réponse initiale, la majorité développe rapidement une résistance à la drogue. Bien que les détails n'aient pas été élucidés, il a été suggéré que cette résistance soit due à une mauvaise liaison de l'anticorps à sa cible, un manque d'internalisation, une dégradation inefficace ou encore à au rejet du DM1 dans le milieu extracellulaire via des pompes protéiques [42].

Perjeta[®] (pertuzumab) est un autre anticorps injecté par voie intraveineuse qui fut créé afin de cibler HER2. La différence avec son grand frère le trastuzumab réside dans l'épitope que chacun reconnaît. En effet, le trastuzumab se lie au sous-domaine IV alors que le pertuzumab se lie au sous-domaine II de la protéine HER2. Ce nouvel anticorps a été construit suite à l'hypothèse voulant qu'il soit possible d'augmenter l'effet enclenché par l'inhibition d'HER2 en combinant les deux agents. Des études *in vitro* et *in vivo* ont pu confirmer cette dernière hypothèse en soulignant la présence d'une synergie entre le trastuzumab et le pertuzumab [43] [44]. Les études cliniques ont plus tard permis de comparer les effets des combinaisons trastuzumab-docétaxel et pertuzumab-trastuzumab-docétaxel. Il a été démontré qu'une plus grande proportion des patientes ont une réponse complète lorsqu'elles sont traitées avec le

pertuzumab en plus des deux autres agents (39,3% versus 21,5%) [45]. Il y eu également un essai clinique de phase III, nommée « MARIANNE », qui tenta de combiner le pertuzumab au T-DM1 chez des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique ou localement avancé. Il s'avéra qu'un tel traitement n'offre pas de réponses supérieures à une thérapie classique combinant une chimiothérapie (docétaxel or paclitaxel) et le trastuzumab [46].

Faisant place à une autre approche, la drogue nommée Tykerb[®] (lapatinib) est un inhibiteur de tyrosine kinase qui empêche les cellules tumorales de croître et de se diviser. Administrée par voie orale, le lapatinib est offert aux patientes souffrant d'un cancer avancé ou métastatique suivant des thérapies classiques (*e.g.* anthracycline ou trastuzumab), ou encore les femmes post-ménopausées suivant des thérapies hormonales et pour qui il n'y a plus d'effet. L'ajout du lapatinib aux thérapies déjà en cours permet un regain de réponses bénéfiques chez ces patientes [47]. Cette drogue agit en inhibant HER1 et HER2 à la fois en se liant au site de liaison de l'ATP situés sur les kinases. Il n'est alors plus possible de phosphoryler et d'activer ces récepteurs, ce qui empêche l'induction de signaux intracellulaires [48]. La double action du lapatinib est avantageuse, car il y a une plus forte inhibition des signaux de prolifération.

c) Cancer du sein triple négatif

Les patientes atteintes d'un cancer triple négatif n'ont malheureusement pas autant de traitements approuvés que les autres. L'absence de cibles thérapeutiques spécifiques à la surface des cellules tumorales ne laisse qu'une option, soit la chimiothérapie. Les recherches effectuées à l'aide de différents modèles ont démontré que ce type de cancer est plus sensible aux chimiothérapies connues que les autres. Malheureusement, cette susceptibilité accrue n'est pas assez pour éviter à ces femmes de recevoir le pire pronostic de tous les types de cancer du sein. Plusieurs études ont été entreprises afin de découvrir des façons d'améliorer leur chance de survie. Parmi les molécules d'intérêt, les inhibiteurs de polymérase poly ADP-ribose (PARP), du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) et d'EGFR [49] ressortent. PARP est une enzyme qui entre en jeu lorsque l'ADN cellulaire est endommagé et doit être réparé. La théorie est qu'en inhibant PARP, les cellules tumorales endommagées par les chimiothérapies perdent leur capacité de réparation et sont donc plus susceptibles d'en mourir. Diverses études tentent de combiner des inhibiteurs PARP, comme l'iniparib et l'oraparib, aux chimiothérapies classiques

incluant la carboplatine et la gemcitabine [50] [51]. Une de ces études a même réussi à induire une réponse positive chez 36% des participants [52].

Dans un tout autre contexte, le VEGF est une molécule impliquée dans l'angiogenèse. Pour avoir accès à de l'oxygène et des nutriments, une tumeur recrute des facteurs spécifiques afin de créer de nouveaux vaisseaux sanguins qui lui fourniront. L'Avastin[®] (bevacizumab) est un anticorps qui cible le VEGF et l'empêche ainsi de lier son récepteur. Cela diminue la capacité de former un nouveau réseau vasculaire au sein de la tumeur [53]. Un cousin de l'Avastin[®], nommé Sutent[®] (sunitinib), fonctionne de la même manière. De manière *in vitro*, le sunitinib a su éliminer la croissance, la prolifération, la migration, la résistance à l'apoptose et l'angiogenèse de modèles de cancers triple négatifs humains [54]. Dans une étude clinique de phase II, cette drogue n'a cependant pas réussi à améliorer la survie des patientes lorsque comparé aux chimiothérapies classiques [55].

Les cancers du sein triple négatifs sont aussi reconnus pour exprimer une trop grande quantité d'EGFR/HER1. L'anticorps Erbitux[®] (cetuximab) a donc été développé dans un effort de couper les signaux de prolifération qui en découle normalement [56]. Les premiers résultats obtenus à l'aide d'études cliniques sont cependant mitigés : certaines patientes ont des réponses appréciables [57] alors que d'autres cas ne démontrent aucune différence [58]. Il est, en conclusion, nécessaire d'approfondir les recherches afin de trouver les cibles thérapeutiques les plus appropriées dans le cadre du cancer du sein triple négatif.

1.3 ErbB2/HER2

La protéine HER2 fait partie de la grande famille des récepteurs de facteurs de croissance épithéliaux (EGFR) humains, qui comprend au total quatre membres : HER1, HER2, HER3 et HER4. Ils sont formés de domaines extracellulaires, transmembranaires ainsi qu'intracellulaires. Plus spécifiquement, la partie extracellulaire de la protéine comporte quatre sous-domaines (I à IV). Ces récepteurs sont de type tyrosine kinase, signifiant qu'ils ont besoin de lier un ligand afin de pouvoir se dimériser et ensuite produire un signal. Dans le cas des EGFR, la reconnaissance d'un ligand mène à un changement de conformation permettant aux sous-domaines I et III d'interagir. Cette nouvelle forme de la protéine dévoile le sous-domaine II, qui est nécessaire à la

dimérisation par sa liaison au même sous-domaine d'un autre EGFR (*Fig.1*) [59]. Lorsque les deux récepteurs se joignent, il s'en suit une transphosphorylation des domaines intracellulaires qui mène au recrutement de molécules nécessaires à la cascade signalétique. Dans une cellule normale, il peut y avoir activation de cette voie de signalisation par homodimérisation, mais aussi par hétérodimérisation. Seul le récepteur HER3 ne peut pas former d'homodimères, car son domaine kinase est inactif. Pour avoir production d'un signal cellulaire, il est donc nécessaire qu'il se paire avec un des trois autres récepteurs. Une fois les portions intracellulaires transphosphorylées, les protéines intracellulaires recrutées vont activer quatre voies majeures reliées à la survie et à la prolifération de la cellule. Il s'agit des voies JAK/STAT, MAPK et NF- κ B (*Fig.2*) [60].

Dans le premier cas, la transphosphorylation des domaines intracellulaires mènent à l'activation des protéines JAK1/2 (kinases Janus 1 et 2) se trouvant tout près de la membrane. Une fois actives, ces dernières vont à leur tour activer du transducteur de signal et activateur de transcription 3 (STAT3) qui pourra alors migrer au noyau [61]. Parmi les gènes dont l'expression est régulée par STAT3, on retrouve des gènes anti-apoptotiques (survivines et membres de la famille Bcl (protéine de lymphome de cellules B)), ainsi que des gènes de croissance et prolifération (cycline D1, c-Myc) [62]. En ce qui concerne la voie MAPK (protéine kinase activée par mitogène), c'est la GTPase Ras qui est d'abord phosphorylée. Il y a ensuite une cascade d'activation des protéines RAF (MAP kinase kinase kinase), MEK (MAP kinase kinase) et ERK (kinase extracellulaire régulée par signal). La dernière active les facteurs de transcription ELK, MYC et JUN/FOS ciblant également des gènes de proliférations [63]. Finalement, dans le troisième scénario, les domaines intracellulaires actifs phosphorylent le complexe protéique TRAF2/RIP1/I κ B/NF- κ B [64]. Cette action mène au démantèlement du dit complexe, libérant par le même fait NF- κ B (facteur nucléaire kappa B). Cette protéine migre ensuite au noyau et induit l'expression de gènes de survie comme les membres de la famille Bcl ainsi que XIAP (protéine inhibitrice d'apoptose reliée au X) et FLIP (protéine inhibitrice ressemblant à FLICE) [65], des inhibiteurs de caspases.

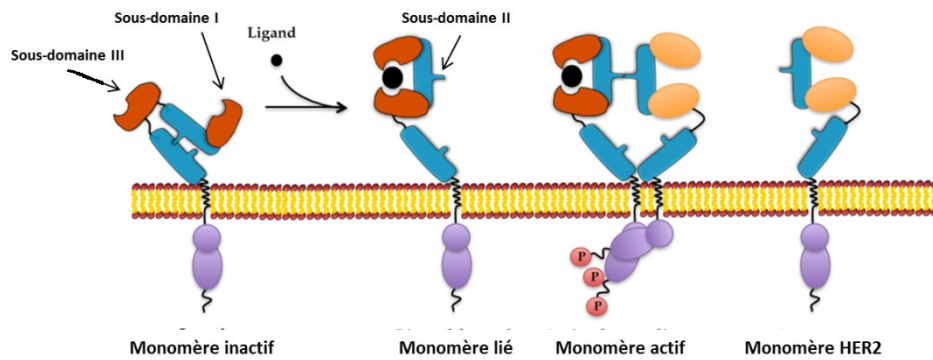


Figure 1. Conformation et dimérisation des EGFR

(Source : adapté de <http://www.intechopen.com/books/oncogene-and-cancer-from-bench-to-clinic/her2-driven-carcinogenesis-new-mouse-models-for-novel-immunotherapies>)

La particularité du récepteur HER2 réside dans le fait qu'il est toujours en conformation ouverte [59]. Nul ligand n'est nécessaire pour changer sa conformation et libérer le sous-domaine II. Aucun ligand n'est d'ailleurs connu pour le récepteur HER2. Son domaine de dimérisation étant toujours disponible, il devient aisé d'activer un autre récepteur et avoir une dimérisation suivie d'une transphosphorylation. Une surexpression d'HER2 par une tumeur rend la chose encore plus facile et confère ainsi un avantage à ces cellules. Le dimère le plus probable dans un contexte de cancer du sein est HER2 : HER3. Bien qu'HER3 est kinase-inactif, il est retrouvé sous une forme activée dans une grande proportion des cancers HER2⁺. Une des raisons établies est que HER3 permet d'activer directement la voie PI3K/Akt, alors que les dimères ne comportant pas ce récepteur ne le peuvent [59] [66]. Comme Akt permet l'activation des protéines NF- κ B et p53, ainsi que l'inhibition de JNK et du promoteur de mort associée à Bcl-2 (BAD), associées à l'apoptose [67] [68], il est intéressant et avantageux pour une tumeur de favoriser l'hétérodimère HER2 : HER3. Une autre raison, basée sur des essais cliniques, est qu'en présence d'un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant HER2, une cellule tumorale a comme réflexe d'augmenter son expression de HER3. La forte présence des deux récepteurs rend alors difficile de bloquer tous les dimères à la fois et de renverser leur phosphorylation [59].

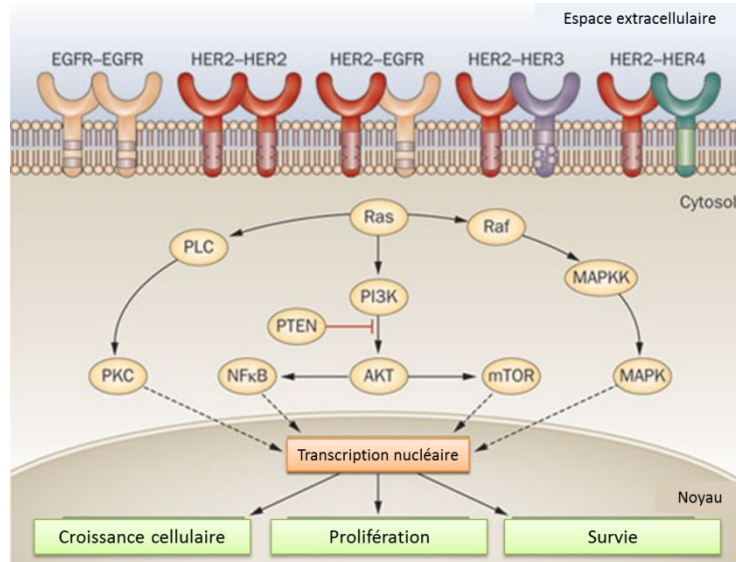


Figure 2. Les voies signalétiques induites par HER2

(Source : adapté de <http://www.nature.com/nrgastro/journal/v8/n7/>

fig tab/nrgastro.2011.81 F1.html)

1.4 L’Herceptin en détails

Tel que mentionné auparavant, le traitement du cancer du sein HER2⁺ s’effectue à l’aide du trastuzumab, commercialement connu sous le nom d’Herceptin[®]. Il est généralement employé à titre d’adjuvant en combinaison avec la doxorubicine et le paclitaxel suite au retrait chirurgical de la masse tumorale. Il s’agit d’un anticorps monoclonal produit à grande échelle chez un modèle recombinant fortement utilisé, les cellules CHO [69]. Bien que l’Herceptin ait grandement amélioré le traitement et le taux de survie des femmes atteintes d’un cancer du sein, nous faisons encore face à environ 15% de patientes résistantes ou développant une résistance au fil du temps [70]. De plus, cette thérapie demeure très dispendieuse avec un coût moyen, au Canada, de 50 000\$ par patiente traitée [71]. Plusieurs efforts sont donc investis dans le développement de meilleurs anticorps, de thérapies combinées ou d’adjuvants permettant d’augmenter les réponses anti-tumorales et, si possible, réduire le nombre de traitements et les coûts associés.

1.4.1 Modèle de production

Tel que mentionné ci-haut, le trastuzumab provient de la construction d’un clone recombinant à l’aide de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO). Les cellules de

mammifères sont un moyen de production de protéines fort utile, voir même préférable si l'on souhaite avoir des protéines correctement assemblées, structurées et modifiées post-traductionnellement. Les cellules CHO s'avère être le modèle le plus fiable en pharmacologie à des fins de production industrielle d'agents thérapeutiques. Les raisons expliquant ceci sont très simples. Premièrement, la culture de ces cellules pour la récolte de protéines a déjà été bien établie et les coûts associés sont similaires aux cultures bactériennes, c'est-à-dire peu coûteux. Deuxièmement, la demande sans cesse croissante d'agents thérapeutiques a apporté avec elle les récentes avancées chez ce qu'on appelle les « omiques » (*omics*), rassemblant la protéomique, la génomique, la transcriptomique et la métabolomique. De ce fait, les nouvelles technologies ont su améliorer les méthodes de construction de lignées cellulaires, menant entre autres à une productivité et qualité optimales du système d'expression des cellules CHO [72].

La plupart du temps, lorsqu'on souhaite produire des immunoglobulines, on cherche à combiner des gènes murins codant pour le site de liaison à l'antigène et des gènes humains codant pour la structure de l'anticorps. On se retrouve alors avec une immunoglobuline dite « chimérique » et, dans ce cas-ci, de par ses structures partiellement humaines, également décrite comme « humanisée ». De manière plus précise, il faut cibler les gènes V(D)J régulant respectivement les régions variables, de diversité et de jonction [73] [74]. Avant d'introduire une séquence de gènes dans notre clone, il faut d'abord savoir quelle séquence ADN permet d'obtenir l'anticorps ayant la plus forte spécificité et affinité avec notre protéine cible. Trois méthodes sont couramment utilisées afin de cribler les anticorps : l'ajout de régions déterminant la complémentarité (CDR), l'ajout de régions déterminant la spécificité (SDR) et le brassage de chaînes.

Dans le premier cas, plusieurs petits cadres de lecture, comportant des chaînes invariables humaines mais des CDR murins, sont insérés dans une bibliothèque de phages qui sont employés dans technique appelée « exposition par phage » (*phage-display*) [75]. Le principe de cette technique est que chaque phage contient une séquence ADN codant pour un anticorps spécifique. Cette séquence est associée aux gènes d'une protéine de capsid du phage, ce qui implique que l'anticorps est exprimé à la surface de ce dernier. Lorsque plusieurs phages sont créés, on peut effectuer leur criblage en les mettant en présence de notre antigène d'intérêt et en sélectionnant ceux qui s'y lient le mieux (*Fig.4A*). On peut alors isoler ces phages et séquencer leur ADN afin de découvrir les gènes menant à leur immunoglobuline respective [75]. Cependant, bien que la

spécificité envers notre épitope soit préservée, on n'obtient pas d'humanisation à 100% puisque les CDR sont d'origine murine. Il demeure alors une certaine probabilité de reconnaissance par le système immunitaire humain.

La deuxième méthode, l'ajout de SDR, est justement employée afin de réduire le potentiel immunogénique de notre anticorps. Les SDR sont des régions faisant partie des CDR et qui interagissent directement avec l'épitope. En insérant des SDR murins bien spécifiques comportant des résidus protéiques permettant de maintenir la conformation du CDR, on obtient un anticorps avec une plus forte proportion d'origine humaine et, donc, une immunogénicité plus faible. La technique d'exposition par phage suivi d'un criblage est également de mise lorsqu'on emploie cette méthode [75].

Finalement, la dernière méthode mentionnée permet d'obtenir une immunoglobuline totalement humaine. En effet, le brassage de chaînes, tel que son nom l'indique, permet d'échanger les chaînes légères et lourdes d'origine murine par des chaînes humaines (*Fig.4D*). Dans un premier lieu, toujours dans une bibliothèque de phages, c'est la chaîne légère de l'anticorps qui est remplacée. Les anticorps ayant une forte spécificité et affinité envers notre épitope de choix sont sélectionnés. Ce sont ensuite leur chaîne lourde qui est échangée par une chaîne humaine. De nouveau, les anticorps subissent un criblage et seuls les meilleurs sont retenus. Cette méthode de brassage est particulièrement intéressante, car elle mime le processus naturel de construction d'anticorps par lequel les plasmocytes « testent » chacune des chaînes avant d'obtenir l'immunoglobuline finale. De plus, la production de plusieurs différents isotypes d'anticorps est essentielle dans le cadre de traitement à long terme, car les patients finissent par produire une réponse immune dirigée contre l'anticorps de traitement [76].

1.4.2 Mécanismes d'action

Les mécanismes d'action du trastuzumab impliquent des effets directs et indirects sur les cellules tumorales surexprimant HER2. Dans un premier lieu, l'anticorps se lie au sous-domaine IV de la protéine et prévient la dimérisation de cette dernière avec un autre EGFR. Il en résulte une baisse des signaux intracellulaires regroupant, rappelons-le, les voies JAK/STAT, MAPK, PI3K/Akt et NF- κ B [77]. Les cellules ont donc un arrêt de leur cycle de croissance en phase G1 et l'inhibiteur p27^{kip1} de kinase cycline-dépendante (Cdk) est activé [78]. Cet arrêt de signaux de prolifération et de survie mène inévitablement à l'apoptose des cellules via la répression de la

protéine Bcl-2 [79]. Logée au niveau de la mitochondrie, Bcl-2 prévient normalement l'apoptose en liant le facteur activateur de l'apoptose 1 (APAF-1) ainsi qu'en contrôlant la perméabilité de la membrane mitochondriale. Sa répression résulte ainsi en son retrait de la membrane, ce qui permet au cytochrome *c* et APAF-1 d'aller activer les pro-caspases 8, 9 et 10 [80] [81] [82] [83], trois protéines majeures impliquées dans l'initiation de l'apoptose. Leurs actions combinées mènent alors à l'activation de la caspase 3, requise pour la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN [84].

Une hypothèse veut que la reconnaissance d'HER2 par l'anticorps mène également à son internalisation puis à sa dégradation. Ceci serait possible via le recrutement et l'activation de la ligase ubiquitine c-Cbl menant à une protéolyse [85]. Bien qu'on ne sache pas encore comment cette enzyme est induite lors de la reconnaissance d'HER2 par le trastuzumab, il est dit que le récepteur serait poly-ubiquitiné par c-Cbl et mènerait à sa forte dégradation.

De manière indirecte, le trastuzumab agit en recrutant autant l'immunité innée qu'adaptative suite à l'opsonisation des cellules tumorales. Les patientes ayant été traitées avec cet anticorps ont démontré une plus grande infiltration lymphocytaire, mais également de plus hauts niveaux de cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (ADCC). Cette infiltration est un facteur important dans le cadre du traitement du cancer du sein HER2⁺, tel que démontré par diverses études. Lors de l'analyse de plusieurs biopsies, une forte expression de gènes associés aux lymphocytes a été associée à un plus faible taux de récurrence chez les patientes [86]. Une autre étude fut menée afin de déterminer les facteurs moléculaires en jeu, par exemple l'angiogenèse, l'apoptose, les niveaux de réponses immunitaires, etc. Il fut découvert, chez les tumeurs HER2⁺, que le degré d'invasion des tumeurs est le processus moléculaire le plus important lors du pronostic [87]. Lors d'un essai clinique nommé « FinHER », il fut observé qu'une infiltration de lymphocytes augmente les effets thérapeutiques du trastuzumab. Plus en détails, cette étude indique que pour chaque augmentation de 10% d'infiltration du tissu, il y a une diminution du risque de récurrence de 18% [88]. De multiples études ont su souligner l'importance de cette cytotoxicité via l'utilisation de souris sans récepteur Fc fonctionnel ou cellule NK (*natural killer*), ou encore avec interféron gamma (IFN- γ) neutralisé [70] [89]. Toujours dans les premières actions de l'immunité, des études de déplétion ont permis de dévoiler l'importance des cellules dendritiques (DC) et de leurs réponses IFN de type I. En effet, des souris ne possédant pas de DC ou alors ayant le récepteur IFNAR1 bloqué ne réagissent plus

aussi bien au trastuzumab [70]. Puisque la production des IFN de type I est régulée par les TLRs, les réponses de souris génétiquement modifiées afin de ne pas exprimer la protéine adaptatrice MyD88 furent étudiées. Il s'avéra que ces animaux n'avaient pas les capacités de bien répondre à la thérapie anti-HER2. Mais encore, les TLR sont exprimés sur d'autres types cellulaires comme les monocytes/macrophages. La déplétion de ces cellules, via le ciblage de CD11b et l'utilisation de *clodrolip* (clodronate encapsulé dans des liposomes) [90], conclut que les effets du trastuzumab dépendent de celles-ci. De plus amples études de déplétion démontrèrent l'importance de la présence des cellules T CD8⁺. Leur production d'IFN- γ ainsi que leur importance au sein de l'immunité mémoire sont au cœur des effets thérapeutiques du trastuzumab [70].

Parmi les recherches effectuées au sujet de l'anticorps anti-HER2, une réduction de l'angiogenèse fut également pointée comme un mécanisme d'action important. Effectivement, le trastuzumab a su réduire la densité vasculaire au sein des tumeurs et, *in vitro*, la migration des cellules endothéliales. Ceci fut expliqué par une réduction de la production de facteurs pro-angiogéniques (*i.e.* VEGF, IL-8), alors que celle de facteurs anti-angiogéniques (*i.e.* TSP-1) est augmentée [91].

1.4.3 Mécanismes de résistance

Bien qu'une thérapie anti-HER2 offre des effets bénéfiques chez certaines patientes, il semble que les cellules tumorales aient plus d'un tour dans leur sac. Tel que mentionné un peu plus tôt, l'inhibition d'HER2 mène à la surexpression d'HER3 à la surface cellulaire [59]. En agissant ainsi, la tumeur permet donc de garder une stimulation soutenue des voies de prolifération et de survie, incluant PI3K/Akt. De la même manière, les cellules tumorales peuvent augmenter leur expression de la mucine 4 (MUC4) qui, de par sa grosseur, crée un encombrement stérique près de HER2 qui empêche l'anticorps de rejoindre sa cible [92] [93]. Il en résulte également une inhibition de la reconnaissance immunitaire, ce qui mène ultimement à une inhibition de l'apoptose, une progression tumorale et à de possibles métastases [94]. MUC4 agit aussi en tant que ligand du récepteur HER2, activant ainsi les voies de prolifération et de survie. Suivant cette théorie, une lignée cellulaire mutante n'exprimant pas MUC4 fut décrite comme étant plus sensible au trastuzumab. Notons par contre que les niveaux d'expression d'HER2 ne sont pas corrélés d'aucune manière aux niveaux d'expression de MUC4.

Le recrutement du récepteur IGF-IR (récepteur du facteur de croissance I ressemblant à l'insuline) afin d'activer les voies PI3K/Akt et MAPK est également une manière de faire. En effet, il a été observé que les tumeurs trastuzumab-résistantes exprimaient plus fortement ce récepteur et, qui plus est, IGF-IR est capable d'interagir avec HER2 et de le phosphoryler [95] [96]. Les voies de signalisation sont donc activées de deux manières. L'inhibition d'IGF-IR, via un anticorps ou un inhibiteur de tyrosine kinase, permet de ramener la sensibilité au trastuzumab [97]. La stimulation du récepteur IGF-IR est aussi reliée à la répression de p27^{kip1}, l'inhibiteur de Cdk, ce qui souligne l'activation de la prolifération des cellules. Si on réduit l'expression de cette protéine à l'aide d'oligonucléotides anti-sens ou encore d'ARN interférents, l'effet du trastuzumab est également perdu, ce qui souligne l'importance de p27^{kip1} dans le cadre de cette thérapie [98] [99].

Les patientes atteintes d'un cancer du sein peuvent également avoir perdu l'expression de l'homologue de phosphatase et tensine (PTEN), un suppresseur de tumeurs. Chez diverses lignées cellulaires, l'absence de PTEN a été associée à une phosphorylation et signalisation de la voie PI3K/Akt, bloquant ainsi l'effet du trastuzumab. En conséquence, les patientes avec cette déficience ont une réponse très faible à la thérapie anti-HER2. L'utilisation d'inhibiteurs de la voie PI3K/Akt, *in vitro* et *in vivo*, permet de retrouver une sensibilité à l'agent thérapeutique [100]. Cela renforce la théorie que PTEN joue un rôle important dans la résistance au trastuzumab.

Fait intéressant, HER2 est une protéine qui peut être clivée en deux fragments par les métalloprotéinases. Le domaine extracellulaire est libéré et se retrouve en circulation dans le sang [101] [102] [103]. Le deuxième fragment, c'est-à-dire le domaine membranaire, se retrouve à avoir une activité kinase encore plus élevée que le récepteur HER2 d'origine [104]. En plus d'acquiescer cette forte activité encourageant la prolifération, le fragment en circulation est reconnu par le trastuzumab [102] et limite donc le nombre d'anticorps atteignant les cellules tumorales. Il a été démontré que les patientes ayant de hauts niveaux sériques de ce domaine extracellulaire ont un moins bon pronostic [105] [106]. Par contre, en liant le récepteur HER2, le trastuzumab empêche les métalloprotéinases d'atteindre leur cible [107] et permet ainsi de réduire les niveaux de fragments relâchés. En clinique, les femmes ayant les meilleures réponses à l'anticorps ont également été celles qui ont vu leurs niveaux sériques d'HER2 clivés réduire [108] [109]. La

présence de formes tronquées d'HER2 est donc un important facteur de résistance au trastuzumab.

1.5 Immunomodulation

1.5.1 Points de contrôle immunitaire

a) CTLA-4

En temps normal, les lymphocytes T ont besoin de deux grands signaux pour s'activer. Le premier provient de la reconnaissance, par le récepteur des cellules T (TCR), d'un peptide lié à un complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le deuxième provient de l'interaction entre leur molécule CD28 et une molécule B7 présente sur la seconde cellule, qui augmente les signaux de survie et de prolifération. Il existe par contre un autre récepteur ressemblant à CD28 qui se nomme CTLA-4 (ou CD152) et qui peut également interagir avec ce ligand. À l'inverse, cette liaison induit un signal négatif au sein de la cellule et instaure un état d'anergie, c'est-à-dire une incapacité de proliférer [110]. Il a été observé que l'expression de CTLA-4 est augmentée suite à l'activation d'un lymphocyte, ce qui mène à une compétition pour la molécule B7 [111]. Ce genre d'interaction immunosuppressive est appelé un « point de contrôle immunitaire ». Il s'agit en effet d'une manière dont s'est doté le système immunitaire afin de contrôler l'intensité et la durée des réponses dans le but de protéger les tissus sains et éviter une auto-immunité [112].

Chez la souris, l'usage d'un anticorps bloquant CTLA-4 en monothérapie permet de réduire la vitesse de croissance et même faire régresser plusieurs types de tumeurs : ovaires, cerveau, vessie, fibrosarcome, etc. Les animaux ayant complètement rejeté leur masse tumorale développèrent également une immunité mémoire. Notons par contre que chez d'autres modèles expérimentaux, une thérapie anti-CTLA-4 n'eut aucun effet bénéfique. C'est le cas chez le mélanome, le carcinome mammaire, le lymphome ou encore le cancer du poumon [113]. Lors d'essais cliniques employant l'ipilimumab (anti-CTLA-4 humanisé), il sembla y avoir une corrélation entre l'efficacité de cette thérapie et le niveau d'immunogénicité des tumeurs. En effet, il est dit que les cancers reconnus comme étant fortement immunogène sont ceux qui bénéficient d'un traitement anti-CTLA-4 [114]. Également, il a été observé que ce traitement était

plus efficace chez les plus petites tumeurs [115]. L'ipilimumab fut d'ailleurs approuvé pour le traitement du mélanome en 2011 [116]. Lorsque combiné à d'autres traitements, que ce soit un vaccin, une chimiothérapie ou une irradiation, l'anti-CTLA-4 permet d'augmenter les effets thérapeutiques de ces derniers. Il semble donc important qu'une réponse immunitaire soit déjà présente pour que l'anticorps soit efficace. Chez le cancer du sein plus spécifiquement, par contre, des études pré-cliniques ont démontré qu'une monothérapie d'anti-CTLA-4 n'avait aucun ou sinon très peu de bénéfices [113]. Plusieurs s'intéressent donc présentement à son emploi en combinaison avec d'autres thérapies.

b) PD1 et PD-L1/2

Un autre point de contrôle auquel s'intéresse la communauté scientifique est la molécule PD1. PD1 est une autre protéine ressemblant à CD28 et qui, tout comme CTLA-4, possède un rôle suppressif. À l'aide de ses ligands, PD-L1 et PD-L2, PD-1 permet de contrôler la tolérance périphérique et de protéger les tissus non-endommagés [117]. Malheureusement, certains pathogènes et cancers ont su prendre avantage de cette voie signalétique afin de réduire les réponses immunitaires. En effet, il fut découvert que plusieurs cancers expriment PD-1 suite à l'apparition de cytokines pro-inflammatoires dans leur microenvironnement. Cette résistance est expliquée par le fait que PD-L1 est contrôlé par un oncogène, plus spécifiquement PTEN. Puisque cette protéine est mutée chez plusieurs cancers, il en découle une expression de PD-L1 qui offre aux cellules tumorales un avantage. De plus, il a été observé que les cellules T_{reg} exprimant de forts niveaux de PD-1 ont un potentiel élevé d'immunosuppression [118].

En études pré-cliniques, l'inhibition de PD-1 à l'aide d'un anticorps augmenta la fréquence ainsi que le nombre absolu de CTL antigène-spécifiques. Il fut également observé qu'une plus grande proportion de ces cellules dégranulent lorsque mises en présence de cellules tumorales. Des analyses plus détaillées démontrèrent une augmentation de production de cytokines, incluant l'IL-2, l'IL-10, l'IFN- γ et le TNF- α . Certains découvrirent que l'anti-PD-1 agit en augmentant la prolifération des CTLs plutôt qu'en réduisant leur mortalité [119]. En clinique, le nivolumab (anti-PD-1 humanisé) employé chez plusieurs cancers solides avancés eu un taux de succès de 31%. De plus, la même étude indique que cet anticorps induisit moins d'effets secondaires que l'anti-CTLA-4 [120]. Le nivolumab fut officiellement approuvé en 2014 pour le traitement du cancer du poumon ainsi que du mélanome [121]. En parallèle, PD-L1 fut

également l'objet de certaines recherches. Son inhibition démontra lui aussi un fort potentiel. Chez un modèle de cancer du sein HER2⁺, l'ajout d'un anti-PD-L1 à un vaccin permit à la moitié des animaux de rejeter leur tumeur [122]. De la même façon que l'anti-PD-1, l'inhibition de PD-L1 mène à de meilleures réponses de la part des lymphocytes T CD8⁺. Suite au traitement, ces cellules auraient une meilleure capacité de production de cytokines, un plus large répertoire d'épitopes spécifiques ainsi qu'une mémoire à long terme [123]. Chez le cancer du sein triple négatif, un type difficile à traiter, l'usage d'un anti-PD-L1 permit à 19% des patientes à l'étude d'avoir des réponses bénéfiques. Certaines ont même eu des réponses complètes grâce à cette thérapie [124]. Ensemble, PD-1 et PD-L1 ont donc un grand potentiel dans le cadre des immunothérapies.

1.5.2 Récepteurs *Toll-like*

Les cellules immunitaires circulant dans notre corps ont pour but de détecter et tuer les cellules anormales ou les pathogènes. Pour y arriver, elles ont recours à divers « détecteurs de danger » incluant les récepteurs à reconnaissance de patron (PRR), qui reconnaissent des patrons moléculaires bien précis : les DAMPs (associés à un danger) et les PAMPs (associés à un pathogène). Que ce soit de l'ADN, de l'ARN, des protéines, des sucres, etc., les PRR reconnaissant un patron précis enclenchent l'activation des cellules immunes afin d'avoir une attaque dirigée. Effectivement, dépendamment de la nature du danger, la réponse pourra être d'origine humorale ou cellulaire. S'il s'agit d'une infection par de gros pathogène, un parasite ou une bactérie par exemple, il y aura présence d'une sécrétion d'anticorps, recrutement du complément ainsi que sécrétion de macromolécules antimicrobiennes. S'il s'agit plutôt d'une infection par un pathogène intracellulaire, comme c'est le cas des virus, l'immunité cellulaire sera exploitée via les phagocytes, les lymphocytes T cytotoxiques ainsi que de multiples cytokines [125].

Au sein de la grande famille des PRR, les TLR sont d'importants récepteurs de signature microbienne ou de danger. Bien qu'ils ne soient pas très nombreux, ensemble ils reconnaissent un vaste répertoire de pathogènes humains et marqueurs de dommages tissulaires. Puisque ce sont les premiers récepteurs engagés lors d'un signal de danger, les TLR sont des outils cruciaux lorsque vient le temps d'enclencher une réponse immunitaire. La communauté scientifique s'est donc également intéressée à leur sujet dans le cadre des immunothérapies contre le cancer.

a) TLR-3

Le TLR-3 est situé à l'intérieur des endosomes des cellules et son rôle est de reconnaître des acides nucléiques, plus précisément l'ARN double brin normalement associé à une infection virale. Lorsqu'activé, le récepteur enclenche une cascade signalétique en commençant par l'activation de la protéine adaptatrice TRIF (adaptateur contenant un domaine TIR induisant l'IFN- β). En aval, ce sont les MAPKs, NF- κ B et IRF3 (facteur de transcription régulant l'interféron 3) qui sont recrutés afin que la cellule immunitaire s'active et se mettent à produire des cytokines pro-inflammatoires, incluant de l'IFN de type I [126].

Afin d'exploiter cette production de facteurs pro-inflammatoires, divers analogues d'ARN double brin furent créés. C'est le cas de l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly(I:C)), une molécule bien étudiée de nos jours et déjà employée à titre d'adjuvant dans des essais cliniques de thérapies anti-cancéreuses. Cet analogue induit entre autres une maturation stable des DC, qui peuvent alors produire de l'IFN- γ , du TNF- α , de l'interleukine 12 (IL-12), des interférons de type I, etc [127]. Il est aussi intéressant de souligner que des chimiokines, des molécules attirant les cellules immunitaires, figurent parmi les facteurs induits. MIP-1 (protéine inflammatoire de macrophage 1), RANTES et IP-10 (protéine interféron-inductible 10) [128], qui attirent les monocytes/macrophages, les lymphocytes T et les cellules NK [129] [130] [131], sont des produits de la stimulation du TLR-3. Lors d'études sur le cancer du poumons, des chercheurs ont découvert que le poly(I:C) induit un haut niveau de recrutement de DC matures, menant à des réponses Th1 et Th17. Leur production d'IFN de type I a également été associée à l'induction de réponses efficaces de la part des lymphocytes T cytotoxiques [132]. Chez la souris, il a aussi été observé que le poly(I:C) peut agir directement sur les lymphocytes T CD8⁺ en améliorant leurs réponses antigène-spécifique [133]. En ce qui concerne les cellules NK, leur expression du TLR-3 ainsi que son activité demeurent controversées. De plus en plus d'études confirment que ces cellules expriment un TLR-3 actif, mais certaines soulignent que la présence de cytokines accessoires, tel l'IL-12, soit nécessaire [134]. D'autres études ont plutôt observé que leur TLR-3 peut répondre directement à une stimulation par le poly(I:C). Plus précisément, il y a augmentation de leurs fonctions cytotoxiques, augmentation de l'expression de CD69 à leur surface et production de plusieurs cytokines comme l'IL-6, l'IL-8, l'IL-1 β , l'IFN- γ et le TNF- α . Cette activation serait indépendante de la présence d'IFN de type I ainsi que de la présence d'APC [135]. Chez le lymphome, une combinaison de rituximab (anti-CD20) et de poly(I:C) a su

induire plus fortement de l'ADCC et donc améliorer les réponses anti-tumorales [136]. Chez le cancer du sein, l'usage de poly(I:C) en essais cliniques a permis aux patientes de réduire leurs risques de développement de métastases [137]. Chez un modèle murin, le même traitement a également été lié à une réduction dans la fréquence de cellules suppressives myéloïde-dérivées (MDSC) ainsi qu'à l'inhibition de leurs fonctions immunosuppressives [138]. Finalement, de manière plus directe, il semble qu'un traitement au poly(I:C) puisse induire l'apoptose des cellules tumorales via leur propre TLR-3. En effet, cet agoniste mène à la production d'IFN de type I, une molécule anti-cancéreuse, au sein-même de la tumeur [139] [140].

b) TLR-9

À l'instar du TLR-3, le TLR-9 reconnaît des acides nucléiques, plus précisément des motifs ADN CpG non-méthylés qui sont normalement associés aux infections bactériennes. Ce récepteur se retrouve à l'intérieur des endosomes des cellules immunitaires. Comme la grande majorité des TLR (exception faite des TLR-3 et TLR-4), le TLR-9 fait appel à la molécule adaptatrice MyD88 lorsqu'il est stimulé. Il y a alors phosphorylation des protéines PI3K, NF- κ B, IRF5 (facteur de transcription régulant l'interféron 5) et IRF7 (facteur de transcription régulant l'interféron 7) qui mènent à l'activation de la cellule et à la production de cytokines pro-inflammatoires. Les actions combinées de NF- κ B et IRF7 mènent également à la production d'IFN de type I [126].

Des oligonucléotides de motifs CpG (CpG ODN) sont des molécules employées lorsqu'on souhaite stimuler le TLR-9 et induire une sécrétion de facteurs immunitaires. Cette macromolécule est elle aussi présentement en essais cliniques à titre d'adjuvant dans le cadre de traitements anti-cancéreux. Le CpG ODN est décrit comme agissant surtout sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), qui se mettent alors à produire de l'IFN- γ , du TNF- α , de l'IL-12, des interférons de type I, MIP-1 et de l'IP-10 [141]. En plus, la stimulation des NK via leur propre TLR-9 mène à l'activation de leurs fonctions cytotoxiques ainsi qu'à une sécrétion d'IFN- γ de leur part [142]. Chez les patients atteints d'un cancer sanguin et traités avec des CpG ODN (monothérapie), plusieurs effets bénéfiques furent observés. Les cellules T CD8⁺ et NK furent activées et les niveaux d'IFN- α s'élevèrent. Chez le mélanome, la stimulation du TLR-9 fut associée à une augmentation des niveaux d'IL-6, d'IL-12 et d'IP-10, ainsi qu'à une infiltration de la tumeur par les lymphocytes T CD8⁺. Lorsqu'employé en combinaison avec le

rituximab, le CpG ODN offrit à 32% des patients atteints d'un lymphome d'obtenir de bonnes réponses anti-tumorales. Il fut observé que les niveaux de cytokines étaient dose-dépendants pour ce qui est des protéines MCP-1 et 2, ainsi que de l'IP-10 [143]. Chez le cancer du poumon, l'addition de CpG ODN au paclitaxel augmenta dramatiquement le pourcentage de survie des patients [144]. Fait intéressant, des études combinant le CpG ODN et l'IFN- α ont observé une synergie entre les deux produits qui se traduisait par une augmentation de la cytotoxicité en plus d'une activation accrue des cellules NK [143].

Lorsqu'on se tourne vers les effets directs d'une telle thérapie sur les cellules tumorales, les résultats sont mitigés. Certaines recherches concluent que le CpG ODN n'induit pas directement l'apoptose des cellules tumorales, mais plutôt qu'il permet de recruter et activer les cellules effectrices [145]. D'autres, à l'inverse, ont réussi à induire la mort de cellules provenant d'un carcinome hépatique humain [146]. Certains décrivent une production d'IL-6 par les cellules cancéreuses lorsqu'elles sont mises en présence de CpG ODN. Cet IL-6 aurait pour effet de stimuler la prolifération des cellules T en plus de leur production d'IFN- γ [147]. D'autres encore ont découvert un mécanisme d'apoptose TLR-9-indépendant chez les patients atteints du syndrome de Sézary. Cette mort cellulaire implique une interaction entre le CpG ODN et le récepteur KIR3DL2 présent à la surface des cellules T malignes. Il a alors internalisation du dit récepteur, ce qui active les caspases [148].

La littérature décrit également une synergie entre les TLR-3 et TLR-9 résultant en une voie signalétique unique non observé de manière individuelle [149]. En effet, la stimulation simultanée des cellules immunitaires avec du poly(I:C) et du CpG ODN enchaîne une cascade impliquant plus de protéines qu'une stimulation avec un seul d'entre eux. Une production plus élevée d'IFN de type I, mais surtout d'IFN- γ , TNF- α et IL-12 est ce qu'on obtient de cette synergie [150]. Les niveaux les plus hauts d'IFN- α sont atteints lorsqu'il y a costimulation des TLR-3 et 9 à la fois [151]. Chez les macrophages et les DC, une double stimulation mène à une plus forte production de cytokines via l'activation d'un plus grand nombre de gènes (773) versus le CpG ODN (190) ou le poly(I:C) (574) employés seuls. La magnitude de l'activation de ces gènes est également 5,9 plus élevée, tel qu'observé par la quantité d'ARN au sein des cellules [152]. La combinaison des deux agonistes de TLR est donc très intéressante à titre d'adjuvants.

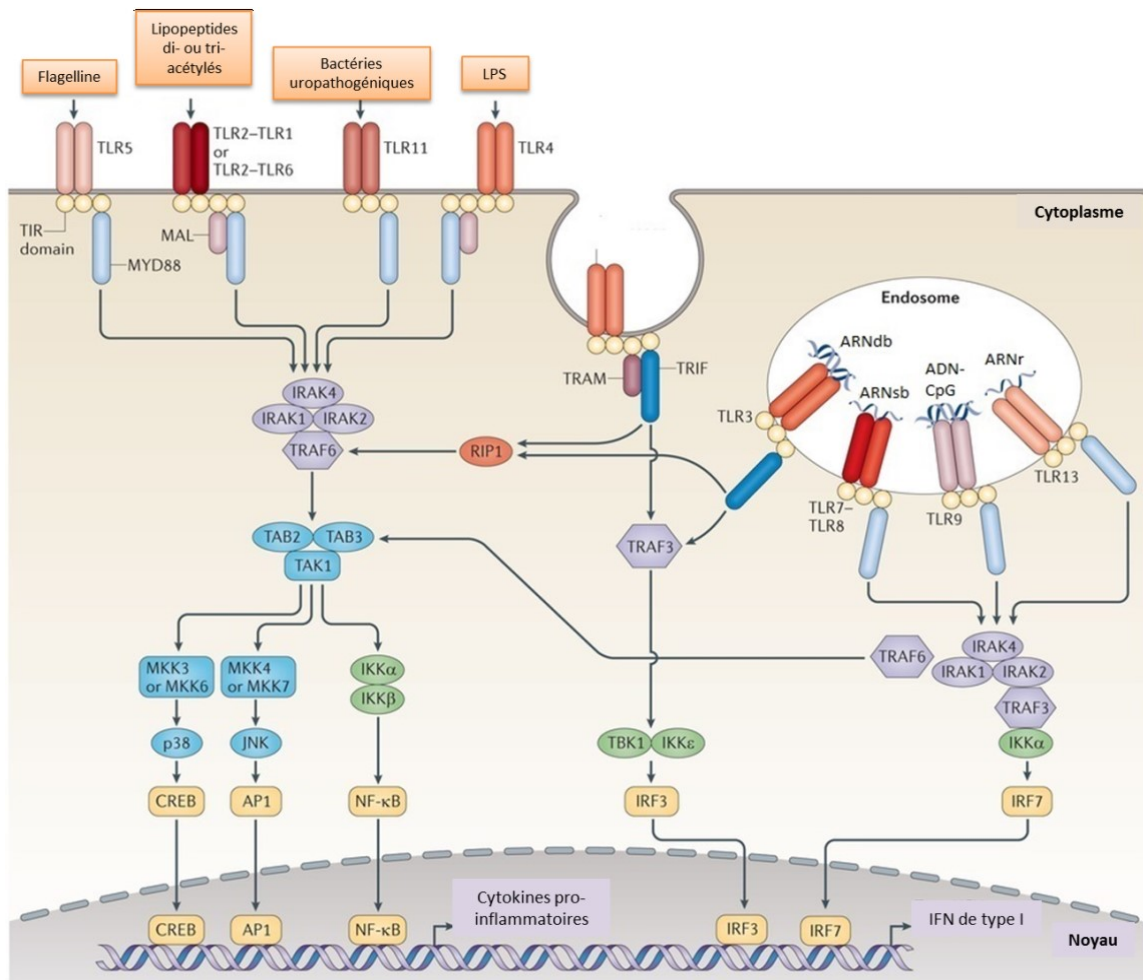


Figure 3. Voies de signalisation empruntées lors de la stimulation des différents TLRs
 (Source : adapté de http://www.nature.com/nri/journal/v13/n6/fig_tab/nri3446_F1.html)

Chapitre 2 : Hypothèse et objectifs

2.1 Hypothèse

Sachant que les agonistes de TLR créent un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, c'est-à-dire qu'ils induisent la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires, l'hypothèse centrale de ce projet est que l'utilisation de CpG ODN et de poly(I:C) permettra d'augmenter les réponses anti-tumorales induites par le trastuzumab. L'observation d'une telle synergie ouvrirait la porte à un nouveau traitement du cancer du sein HER2⁺ combinant ces agents. Sachant que le trastuzumab dépend de la présence de lymphocytes T CD8⁺ ainsi que des cellules NK, il a été soulevé qu'un traitement combiné le serait également. De plus, l'injection de CpG ODN et de poly(I:C) devrait activer les pDC et donc induire une forte production de cytokines et chimiokines. Le résultat devrait donc être l'activation prononcée des cellules immunitaires ainsi que leur recrutement au microenvironnement de la tumeur, le tout permettant d'obtenir de plus fortes réponses anti-tumorales.

2.2 Objectifs du projet

Le premier objectif de la présente étude est de combiner le trastuzumab à un ou d'autres produits afin d'augmenter les effets anti-tumoraux *in vivo*. La présente étude s'intéresse plus particulièrement à la combinaison de trastuzumab, de CpG ODN et de poly(I:C). Des modèles murins de tumeurs HER2⁺ seront donc employés afin d'évaluer les effets thérapeutiques d'une telle thérapie. Advenant la découverte d'un traitement efficace, le deuxième objectif est de caractériser les mécanismes d'action impliqués grâce à des modèles *in vitro* et *in vivo*. Diverses sous-populations d'intérêts, telles les lymphocytes T CD8⁺, les cellules NK, les pDC, etc., seront étudiées plus en détails afin de déterminer leur contribution. Une analyse des facteurs pro-inflammatoires produits sera également effectuée.

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

3.1 Traitement des tumeurs transplantées et immunité mémoire

Les modèles murins sont particulièrement intéressants de par leur côté pratique (faible coût, reproduction rapide, homologie génétique avec l'humain, etc.), mais également car nous pouvons modifier leur génome et induire des changements bien spécifiques. De nos jours, plus de 50 modèles de souris transgéniques ont été générés en ciblant des protéines particulières associées au cancer du sein comme ER, PR et HER2, mais également d'autres telles Wnt, p53, Ras, TNF- α , etc [153] [154]. À titre d'exemple, nous avons maintenant accès aux lignées cellulaires MAC51 (ER⁺), H2N113 et H2N67 (HER2⁺), ainsi que 4T1 (triple négatif). Un de ces modèles transgéniques, aujourd'hui bien connu, comprend l'insertion d'une cassette ADN contenant les gènes de la protéine *neu*/ErbB2 sous le contrôle du promoteur constitutivement actif du virus de tumeur mammaire murine (MMTV). Cette activation soutenue est expliquée par une substitution d'une valine vers un acide glutamique dans le domaine transmembranaire de la protéine. Il en découle une production exagérée de la protéine au niveau des glandes mammaires mimant l'effet de l'amplification du locus comportant l'oncogène HER2 chez l'humain. De plus, les tumeurs MMTV-*neu* subissent des mutations sporadiques dans le domaine extracellulaire de *neu*, telles des délétions, insertions ou mutations ponctuelles, qui activent la protéine [155]. Les signaux de survie et de prolifération étant fortement accentués, les animaux développent des tumeurs spontanées entre l'âge de 5 à 10 mois et, dans certains cas, même des métastases [154]. La pathologie des tumeurs MMTV-*neu* se rapproche donc énormément de celle observée chez l'humain. C'est à partir de ce modèle murin MMTV-*neu*/ErbB2 que les lignées cellulaires H2N100 RC5 et TUBO, employées lors de ce projet de recherche, ont été établies *in vitro* [156] [157].

Dans le cadre du traitement des tumeurs murines, la première étape sera de décongeler des cellules H2N100 et TUBO. Ce sont donc deux lignées cellulaires surexprimant la protéine HER2. Elles seront mises en culture quelques jours afin d'avoir une expansion suffisante. Ensuite, elles seront récoltées dans une solution saline isotonique (PBS) puis injectées de manière sous-cutanée sur le flanc droit de souris Balb/c WT femelles. Lorsque les tumeurs seront établies et de taille appréciable (\approx 10 jours), les animaux seront redistribués dans les cages afin d'avoir des

moyennes de taille (cm²) semblables avant les divers traitements. Les souris portant des tumeurs trop petites ou trop grandes, chose déterminée selon la moyenne plus ou moins l'écart-type, seront éliminées. Le nombre total d'animaux restant sera divisé en quatre groupes. Le premier recevra des injections d'un anticorps contrôle sans effet (IgG2a sans spécificité, clone 2A3), le deuxième, de trastuzumab (IgG2a anti-HER2, clone 7.16.4), le troisième, d'agonistes TLR (CpG ODN et poly(I:C)) et le quatrième, de trastuzumab en combinaison avec les agonistes TLR. Les traitements seront faits aux quatre jours, pour un total de quatre injections afin d'assurer une action efficace sur le système immunitaire des animaux. Les anticorps seront injectés de manière intrapéritonéale (*i.p.*) alors que les agonistes TLR seront injectés de manière intratumorale (*i.t.*). La taille des tumeurs, mesurée selon la longueur et la largeur à l'aide d'un pied à coulisse, sera évaluée trois fois par semaine pendant 30 jours. Advenant que les traitements mènent au rejet des tumeurs, défini comme l'absence de lésions macroscopiques, les souris recevront une nouvelle injection des cellules tumorales sur le flanc opposé. Cette étape permettra de déterminer si les traitements permettent au système immunitaire de développer une immunité mémoire. En effet, si aucune tumeur n'apparaît, c'est que les cellules auront été efficacement reconnues et lysées.

3.2 Effets locaux ou systémiques

Afin de déterminer si les effets de cette thérapie sont observés seulement de manière locale, une deuxième cohorte de souris recevra des cellules tumorales sur les deux flancs, menant ainsi à l'apparition de deux tumeurs chez un même animal. Les anticorps ainsi que les agonistes TLR seront injectés selon le protocole habituel, mais seule la tumeur du flanc droit de ces souris recevra le CpG ODN et le poly(I:C).

Le trastuzumab, grâce à sa voie d'introduction, devrait avoir un effet systémique et donc observable sur les deux tumeurs établies. L'activation des APC, induite par les agonistes TLR et la relâche d'antigènes tumoraux, devrait mener à leur maturation et migration vers les nœuds lymphatiques. À partir de ce moment, les lymphocytes présents dans ces organes lymphoïdes pourront être activés à leur tour et migrer vers les tumeurs. La tumeur secondaire, c'est-à-dire sur le flanc gauche, devrait également produire des signaux pro-inflammatoires suite à l'effet du trastuzumab. Les cellules immunitaires activées et en circulation devraient donc détecter des

signaux inflammatoires aux deux sites et être attirées vers ces derniers. Il devrait donc en résulter un effet systémique et une réduction de la taille des deux tumeurs.

3.3 Rôle des CTL

Le rôle des CTL sera évalué chez de nouveaux animaux. Suivant le protocole initial, une tumeur sera induite chez les souris et traitée aux temps décrits avec l'anticorps contrôle, le trastuzumab, le CpG ODN et le poly(I:C), ou la combinaison d'agents. Dix jours suivant le début des traitements, la rate de ces animaux sera récoltée et réduite en suspension cellulaire. Les globules rouges seront lysés et les cellules restantes seront divisées en deux populations. Une d'entre elles sera mise en incubation en présence du peptide immunodominant d'HER2 (TYVPANASL), mais l'autre non. Les splénocytes exposés au peptide auront alors chargé ce dernier à leur surface. Par la suite, les deux populations seront colorées à l'aide de deux concentrations différentes d'un colorant fluorescent, nommé eFluor450. Les cellules sans peptide seront traitées avec une faible concentration alors que celles exprimant le peptide seront traitées avec une forte concentration. Cette étape permettra plus tard de distinguer les cellules avec et sans peptide. Une fois colorées, les populations seront mélangées ensemble en respectant un ratio 1:1. Ce mélange cellulaire sera injecté de façon intraveineuse chez une cohorte de souris portant des tumeurs et ayant déjà été traitée selon les quatre thérapies à l'étude. L'emploi de splénocytes et non de cellules tumorales pour ce genre d'expériences est dû à trois raisons : 1) leur petite taille simplifie leur injection intraveineuse et réduit les chances de formation d'amas, 2) les cellules provenant de la rate expriment en majorité le CMH de classe I et 3) ces cellules migreront naturellement vers la rate de l'animal injecté, ce qui simplifie leur récolte par la suite. Après une période de 24 heures, les rates seront alors récoltées, réduite en suspension cellulaire puis analysées par cytométrie de flux.

Les souris prétraitées à l'aide des agents thérapeutiques devraient avoir des cellules immunitaires actives contre les cellules cancéreuses HER2⁺. Suite à l'introduction par voie sanguine de notre mélange cellulaire, il devrait alors y avoir reconnaissance des cellules portant le peptide HER2 par l'immunité des animaux, menant ainsi à leur lyse spécifique. Cette dernière changera alors inévitablement le ratio des cellules présentes dans notre mélange cellulaire. Ceci

se reflètera lors de l'analyse par cytométrie de flux. Le mélange initial aura un ratio 1:1 de cellules faiblement fluorescentes (sans peptide HER2) et de cellules fortement fluorescentes (portant le peptide HER2). L'analyse par cytométrie comportera alors deux pics de fluorescence correspondant chacun à 50% des événements fluorescents détectés. Chez les animaux traités avec le trastuzumab ou les agonistes TLR, le pic de fluorescence élevée devrait avoir diminué au profit du pic de faible fluorescence, car les cellules HER2⁺ auront été reconnues et lysées par l'immunité des souris. En d'autres mots, le pourcentage de cellules faiblement fluorescentes sera plus élevé. Puisque nous nous attendons à des réponses plus fortes et spécifiques chez les souris traitées avec la combinaison des agents thérapeutiques, nous nous attendons également à ce que le changement de proportion soit plus prononcé lors de l'analyse par cytométrie.

3.4 Rôle des lymphocytes T CD8⁺

Dans un premier temps, nous voulons déterminer la contribution des lymphocytes T CD8⁺ aux effets thérapeutiques de la combinaison de trastuzumab et d'agonistes TLR. Pour ce faire, deux cohortes d'animaux seront comparées : des souris immunocompétentes et d'autres immunodéprimées. Ces dernières recevront un anticorps anti-CD8 β avant les traitements afin de dépléter la population de cellules T cible. Deux ou trois souris seront sacrifiées à ce stade et leur rate sera analysée par cytométrie en flux. L'absence de lymphocytes T CD8 confirmera l'efficacité de notre déplétion. Suite à l'induction des tumeurs, chaque cohorte subira une redistribution des animaux ainsi qu'une division en quatre groupes de traitement. Il sera alors possible de suivre l'évolution des tumeurs en présence et en absence de lymphocytes T CD8 en parallèle. Dans un deuxième temps, nous allons induire des tumeurs et traiter les souris selon le protocole initial, puis nous allons récolter les nœuds lymphatiques drainants. Les cellules seront alors restimuler *ex vivo* à l'aide d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 avant d'être analysées par cytométrie de flux. Nous pourrons alors déterminer le pourcentage de cellules T CD8⁺ produisant de l'IFN- γ ainsi que leur intensité de fluorescence moyenne (MFI).

La présence des lymphocytes T CD8⁺ a déjà été démontrée comme étant cruciale dans le cadre d'un traitement au trastuzumab. Ces cellules sont non seulement impliquées dans la médiation des effets bénéfiques de l'anti-HER2, mais également importantes pour la protection à

long terme des animaux. Nous émettons donc naturellement comme hypothèse que la déplétion de cette population, en réduisant l'efficacité de l'anticorps, affectera l'évolution des tumeurs traitées avec la combinaison. Ceci se reflètera par une vitesse de croissance plus élevée des masses tumorales et une impossibilité pour les animaux de rejeter celles-ci. Lors de l'analyse des nœuds lymphatiques par cytométrie de flux, nous nous attendons à avoir plus de cellules CD8⁺ IFN- γ ⁺ suite au traitement combinant le trastuzumab et les agonistes TLR. L'anticorps induit une production d'interféron chez ces lymphocytes, qui sont également sensibles au poly(I:C). S'ajoute à cela la production massive de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires par les autres cellules immunitaires, qui devrait ainsi augmenter le nombre de cellules activées.

3.5 Rôle des pDC

De la même manière que pour la déplétion des lymphocytes T CD8⁺, deux cohortes de souris, immunocompétentes et immunodéprimées, seront comparées. Les pDC seront éliminées grâce à des injections d'un anticorps anti-PDCA1 avant le début des traitements, puis deux ou trois souris seront ici aussi sacrifiées afin de confirmer la déplétion par cytométrie. Il sera alors possible de déterminer si l'absence de cette population affecte ou non l'efficacité de chaque thérapie. Les pDC sont vues comme des éléments essentiels à une forte production de signaux pro-inflammatoires et il a été observé qu'une stimulation avec du CpG ODN a un effet particulièrement sur ces cellules. Nous nous attendons ainsi à ce que les animaux immunodéprimés réagissent moins bien aux agonistes TLR, ce qui réduira donc également l'efficacité de la combinaison.

3.6 Rôle des cellules NK

Il sera possible, toujours grâce à des animaux immunosupprimés, de comparer en parallèle les traitements en présence et absence de cellules NK. Dans ce cas-ci, nous utiliserons un anticorps anti-asialo-GM1 afin de pouvoir dépléter cette population avant de débiter les thérapies. De la même façon, deux ou trois souris seront sacrifiées avant le début des traitements afin de confirmer l'efficacité de l'anticorps déplétant. Par contre, leur capacité à effectuer de

l'ADCC sera également étudiée *in vitro*. Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser des cellules sanguines humaines (PBMC) afin de démontrer l'efficacité de notre régime thérapeutique également chez l'Homme. Suite à la décongélation et au repos des PBMC, des anticorps couplés à des billes magnétiques seront employés afin d'isoler les cellules NK de toutes les autres. Il s'agira d'une sélection négative afin de garder nos cellules d'intérêt complètement intactes, ce qui implique que les anticorps cibleront CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD123 et HLA-DR. La viabilité des cellules suite à la purification sera confirmée par cytométrie en flux.

En parallèle, des cellules de cancer du sein humain (SK-BR-3 et BT-474) seront aussi mises en culture. Ces cellules proviennent de biopsies coupées en petits morceaux puis mises dans une solution de digestion. Cette solution comprend généralement plusieurs enzymes permettant de dissocier les cellules tumorales (*e.g.* collagénase), ainsi que de dégrader les débris des cellules mortes (*e.g.* DNase). Après quelques heures de traitement, la suspension cellulaire peut être filtrée afin d'en retirer les amas [156] [158]. On doit aussi s'assurer d'en retirer les cellules sanguines, ce qui peut se faire à l'aide d'une solution de lyse (pour les globules rouges) et en effectuant une séparation par Percoll ou Ficoll (pour les leucocytes). Que l'on préfère l'un ou l'autre de ces produits, le principe demeure le même : on utilise deux gradients différents du produit, généralement 40% et 80%, afin qu'une centrifugation permette de séparer les deux populations selon leur densité. Les cellules tumorales, plus grandes et plus lourdes, se retrouvent au fond du tube alors que les leucocytes, plus petits, se retrouvent à la limite des deux gradients [159]. À ce moment, les cellules cancéreuses peuvent être soigneusement récoltées et mise en culture dans un milieu de croissance approprié et stérile. Les cellules subissent alors plusieurs passages rapprochés afin de réduire au maximum le nombre de fibroblastes présents. Les cellules cancéreuses ayant déjà subi une transformation, elles démontreront une croissance soutenue et constante.

Une fois les cellules NK obtenues à partir des PBMCs, ces cellules seront mises en culture avec l'une ou l'autre des lignées cancéreuses (SK-BR-3 et BT-474) à divers ratios, puis les cellules recevront l'un des quatre traitements à l'étude. Afin d'étudier la capacité des cellules NK à réagir aux agonistes, nous rajouterons deux conditions où chaque agoniste TLR sera employé seul en conjonction avec le trastuzumab. Après 5 heures de co-culture, une trousse commerciale sera utilisé afin de déterminer le pourcentage de cytotoxicité ayant été obtenu selon chaque condition.

Tel que décrit un peu plus tôt, un des mécanismes importants du trastuzumab est l'induction d'ADCC. Les cellules reconnaîtront les anticorps via leur récepteur Fc (FcR) mais, dans ce contexte, elles seront également stimulées par le CpG ODN via leur propre TLR-9. Dans la condition contrôle comportant un isotype, nous ne devrions naturellement pas observer d'ADCC alors que les cellules en présence de trastuzumab devraient réagir. L'ajout de CpG ODN aux anticorps permettra d'activer plus fortement les cellules NK, ce qui résultera en une plus grande proportion de cellules lysées. Puisqu'il s'agit de cellules purifiées, nous croyons que l'absence des autres populations ne permettra pas au poly(I:C) d'avoir un effet sur les cellules NK. La condition combinant l'anti-HER2 et le poly(I:C) offrira alors des résultats semblables à ceux de l'anticorps seul. L'absence de stimulation se reflètera également sur les cellules traitées avec tous les agents. Le pourcentage de cytotoxicité ne devrait alors pas dépasser celui obtenu en combinant le trastuzumab et le CpG ODN seulement.

3.7 Rôle de l'IFN- γ , du TNF- α , de l'IL-12 et de l'IP-10

Pour analyser les cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral, de nouveaux animaux furent employés afin d'obtenir des tumeurs. Suite à leur traitement selon le protocole original, les masses seront récoltées puis transformées en suspension cellulaire. Une trousse commerciale sera employée dans le but d'en extraire les ARNs, puis ceux-ci seront transformés en ADN complémentaire grâce à une étape de transcription inverse. Il sera alors possible

L'emploi des agonistes TLR à titre d'adjuvant est grandement intéressant dû à leur forte stimulation du système immunitaire. Le poly(I:C) et le CpG ODN sont tous deux de bons inducteurs de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Qui plus est, leur combinaison a su augmenter les signaux cellulaires grâce à une synergie, résultant en une plus grande quantité de facteurs sécrétés. Chaque agoniste, en combinaison avec le trastuzumab, devrait alors pouvoir augmenter les quantités de cytokines produites en comparaison à l'anticorps seul. Comme l'anti-HER2 mène à la relâche d'antigènes tumoraux rapidement, nous nous attendons tout de même à ce que les réponses immunitaires soient moins prononcées chez les animaux traités seulement avec les agonistes TLR. La combinaison des trois agents thérapeutiques, par contre, devrait résulter en une très forte production de cytokines, particulièrement d'IFN- γ .

3.8 Analyses statistiques

Le programme *Graphpad Prism 5*[®] sera employé afin d'effectuer les analyses statistiques. Le test *t* de Student sera appliqué lors de l'analyse des différences entre les groupes. Les valeurs *p* plus petites que 0,05 seront considérées comme significatives (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$).

Chapitre 4 : Résultats

4.1 Présence d'une synergie entre l'anti-HER2 et les agonistes TLR *in vivo*

La première étape fut de procéder à des injections d'anti-HER2 ainsi que d'agonistes de TLR3 et 9 chez deux modèles de cancer du sein HER2⁺. Il s'agit des cellules TUBO et H2N100 RC5. Les souris Balb/c portant des tumeurs furent séparés en 4 groupes suivant les différents traitements : une immunoglobuline sans spécificité, les anticorps anti-HER2, le CpG/poly(I:C) ou la combinaison d'agents. Les animaux traités avec les anticorps ou les agonistes TLR ont démontré une croissance tumorale plus faible que le groupe contrôle (Fig.1) et, dans le cas des H2N100 RC5, nous avons même observé une rechute (Fig.2). D'un autre côté, les animaux traités avec la combinaison d'agents ont su rejeter leur tumeur et sont demeurés sains jusqu'au dernier jour. La variabilité observée à l'intérieur de ce dernier groupe était également réduite et ce chez les deux modèles HER2⁺. Ces résultats indiquent que l'administration de CpG ODN et de poly(I:C) augmente les effets bénéfiques du trastuzumab.

Les souris employées lors de cette expérience servirent également à déterminer si une immunité mémoire s'était développée. Pour ce faire, les CR reçurent une nouvelle inoculation de cellules tumorales, mais sur le flanc opposé. Malgré un suivi de plus de 30 jours (Fig.3), aucune souris ne développa de tumeur. De plus, la tumeur primaire ne démontra aucun signe de rechute.

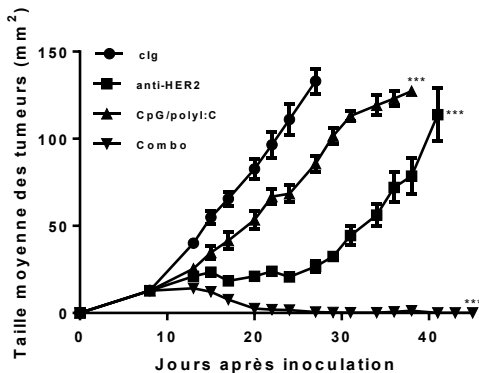


Figure 4. La combinaison d'anti-HER2, de CpG ODN et de polyI:C induit le rejet des tumeurs HER2⁺. Les cellules tumorales TUBO furent injectées dans des souris Balb/c WT, puis traitées aux jours 8, 12, 16 et 20 avec un des suivants: 100 µg d'Ig contrôle (2A3), 100 µg d'anti-HER2 (7.16.4), 25 µg chacun de CpG ODN et de polyI:C., ou l'anti-HER2 et les agonistes TLR ensemble. Les données représentées sont les moyennes ± SEM. n = 8 pour chaque groupe. (***) p < 0.0001 Combo vs. anti-HER2)

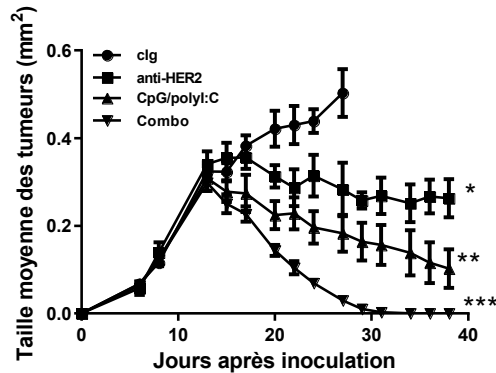


Figure 5. La combinaison d'anti-HER2, de CpG ODN et de polyI:C induit le rejet des tumeurs HER2⁺. Les cellules tumorales H2N100 RC5 furent injectées dans des souris Balb/c WT, puis traitées aux jours 8, 12, 16 et 20 avec des suivants: 50 µg d'Ig contrôle (2A3), 50 µg d'anti-HER2 (7.16.4), 25 µg chacun de CpG ODN et de polyI:C., ou l'anti-HER2 et les agonistes TLR ensemble. Les données représentées sont les moyennes ± SEM. n = 7 pour chaque groupe. (***) p < 0.0001 Combo vs. clg)

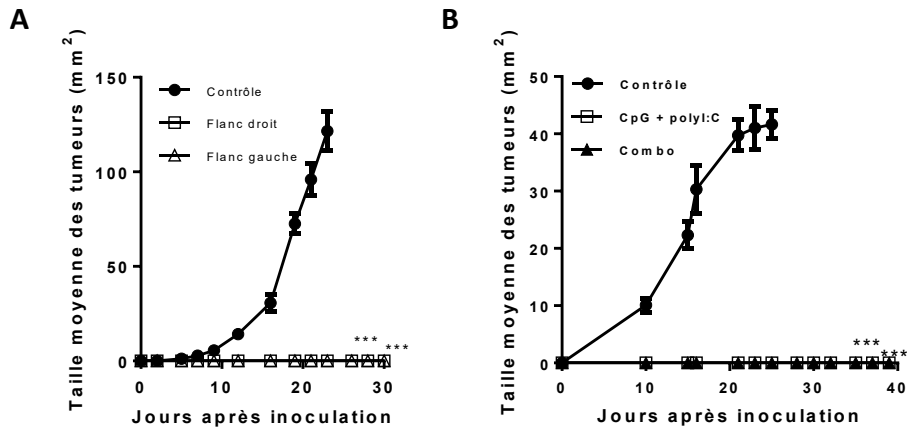


Figure 6. Les souris CR sont protégées lors d'un challenge subséquent. Les cellules TUBO (A) ou H2N100 (B) furent injectées chez les souris Balb/c WT ayant précédemment rejeté leur tumeur primaire. Des souris naïves furent utilisées à titre de contrôle. Les données représentées sont les moyennes \pm SEM. $n = 6$ pour chaque groupe. (***) $p < 0.0001$ vs. contrôle)

4.2 Des réponses systémiques sont atteintes avec la thérapie combinée

Puisque le CpG et le poly(I:C) sont administrés par voie *i.t.*, nous nous sommes demandé si les effets thérapeutiques sont simplement locaux ou alors systémiques. De nouveaux animaux furent ainsi inoculés sur les deux flancs avec des quantités égales de cellules tumorales. Une fois établies, les masses furent traitées avec l'anti-HER2, mais seul le flanc droit reçut des injections d'agonistes TLR. Fait intéressant, le CpG et le poly(I:C) eurent une effet bénéfique sur les deux tumeurs (Fig.4). En ce qui concerne la tumeur secondaire, la réponse immune associée à ces agonistes fut observée environ 10 jours, chose attendue considérant le site d'administration éloigné. Ces résultats démontrent la capacité d'induction de réponses immunitaires systémiques de la thérapie.

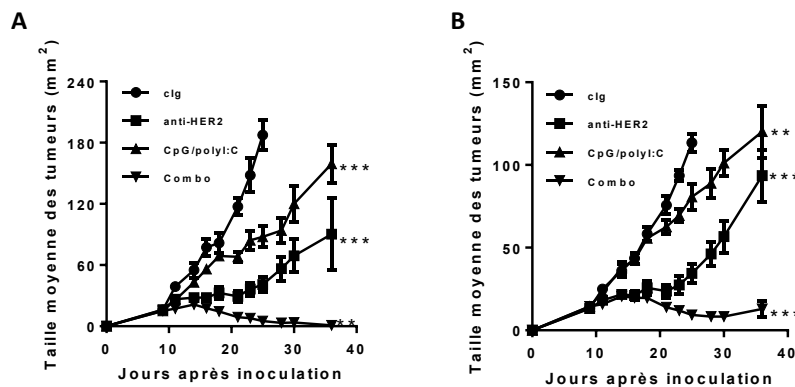


Figure 7. La combinaison d'anti-HER2, de CpG ODN et de polyI:C induit des réponses systémiques. Les cellules TUBO furent injectées dans les deux flancs de souris Balb/c WT et traitées aux jours 9, 14, 18 et 22 avec un des suivants: 100 μ g d'Ig contrôle (2A3), 100 μ g d'anti-HER2 (7.16.4), 25 μ g chacun de CpG ODN et de polyI:C., ou l'anti-HER2 et les agonistes TLR ensemble. Les agonistes de TLR furent injectés dans les flancs droits (A) (** $p = 0.0069$ Combo vs. anti-HER2 mAbs), mais pas dans les flancs gauches (B) (***) $p = 0.0069$ Combo vs. anti-HER2). Les données représentées sont les moyennes \pm SEM. $n = 8$ pour chaque groupe.

4.3 *In vivo*, la thérapie encourage l'activité des CTL

Un des possibles effets de la combinaison de trastuzumab et d'agonistes de TLR est la génération de lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Afin de déterminer cette théorie, des splénocytes ont été récoltés à partir de rates de souris naïves. Ces cellules furent divisées en deux populations. La première subit le chargement du peptide immunodominant d'HER2 à sa surface puis une coloration prononcée avec un fluorochrome. L'autre population cellulaire ne reçut aucun peptide et ne subit qu'une faible coloration avec le même fluorochrome (Fig.5A). Une fois ces étapes effectuées, les deux populations furent mélangées à un ratio de 1:1 puis injectées chez des souris ayant déjà reçu les divers traitements à l'étude. Après une période de 24 heures, ces animaux furent sacrifiés puis leur rate récoltée, car les splénocytes injectés furent naturellement dirigés vers cette organe. Leur analyse par cytométrie en flux dévoila une proportion plus faible de cellules portant le peptide HER2 chez les souris ayant été traitées avec les anticorps ou les agonistes de TLR (Fig.5B-E). Le calcul du pourcentage de lyse spécifique (Fig.5F) démontra que le CpG et le poly(I:C) semblent offrir de meilleures réponses que le trastuzumab.

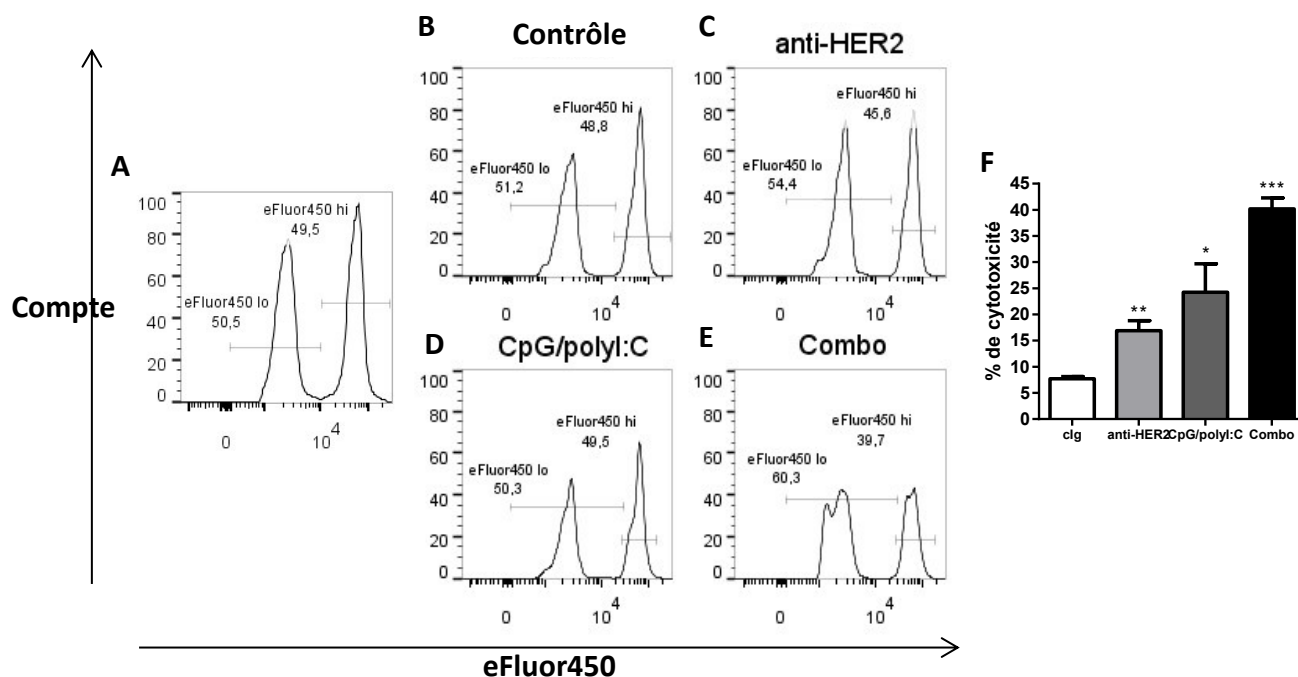


Figure 8. L'administration d'anti-HER2, de CpG ODN et de polyI:C induit une plus forte cytotoxicité médiée par les CTLs. Des cellules colorées avec l'eFluor450 (ratio 1:1) furent injectées dans des souris Balb/c prétraitées. Les histogrammes représentent le pourcentage de cellules de forte (avec peptide) et basse (sans peptide) fluorescence chez le contrôle non-transféré (A), les souris contrôles (B), les souris traitées avec l'anti-HER2 (C), les souris traitées avec le CpG ODN et le polyI:C (D), ou les souris traitées avec la combinaison (E). Les animaux traités à la fois avec l'anti-HER2 et les agonistes de TLR démontrent une plus forte cytotoxicité (F). Les données représentées sont les moyennes ± SEM. $n = 3-5$ pour chaque groupe. (** $p = 0.0092$ anti-HER2 vs. cIg; * $p = 0.0381$ CpG/polyI:C vs. cIg; *** $p = 0.0001$ Combo vs. cIg).

La thérapie combinée permet d'obtenir un pourcentage de lyse encore plus élevé que les traitements individuels. Ces résultats soulignent la capacité des agonistes d'augmenter les réponses antigène-spécifiques.

4.4 Les deux agonistes TLR induisent une sécrétion prononcée d'IFN- γ par les cellules T CD8⁺

Il a déjà été décrit qu'un des mécanismes d'action importants du trastuzumab est l'action des lymphocytes T CD8⁺ produisant de l'IFN- γ . Tel que mentionné précédemment, les agonistes de TLR-3 et TLR-9 induisent une production de chimiokines ayant le pouvoir d'attirer et activer les cellules T. De ce fait, des animaux furent traités selon les quatre thérapies à l'étude, puis leurs nœuds lymphatiques drainants furent récoltés. Les lymphocytes provenant de ces nœuds furent re-stimulés *ex vivo* à l'aide d'anticorps ciblant CD3 et CD28, puis analysés par cytométrie en flux. La comparaison des pourcentages de cellules T CD8⁺ produisant de l'IFN- γ (Fig.6A) indique que tous les traitements activent une plus grande proportion de lymphocytes T CD8⁺ versus le contrôle. Il semble cependant qu'aucune thérapie ne soit mieux qu'une autre. L'analyse de la MFI de chacune permet d'observer une différence là où les agonistes TLR ont été employés. En effet, on observe une fluorescence plus élevée chez les animaux traités avec le CpG et poly(I:C), suivi par ceux traités avec la thérapie combinée d'anti-HER2 et d'agonistes.

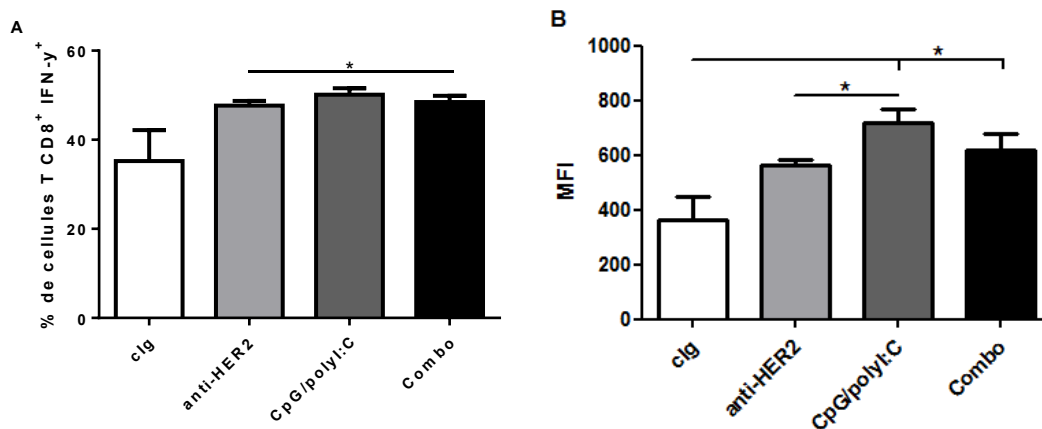


Figure 9. L'administration de CpG ODN et de polyI:C induit une plus forte stimulation des cellules T CD8⁺ produisant de l'IFN- γ . Des nœuds lymphatiques furent récoltés chez des souris Balb/c WT ayant été traitées aux jours 11, 14, 16 et 18 avec un des suivants: 100 μ g d'Ig contrôle (2A3), 100 μ g d'anti-HER2 (7.16.4), 25 μ g chacun de CpG ODN et de polyI:C., ou l'anti-HER2 et les agonistes TLR ensemble. Les nombres représentent les pourcentages moyens de cellules CD8⁺ IFN- γ ⁺ (A) (* p < 0.05 vs. 2A3) et l'intensité de fluorescence moyenne (MFI) (B) pour chaque groupe (* p = 0.0252 CpG/polyI:C vs. anti-HER2; * p < 0.05 vs. cIg). Les données représentées sont les moyennes \pm SEM. n = 4-5 pour chaque groupe.

4.5 La présence des cellules T CD8⁺ est nécessaire pour la protection à long terme des individus traités

Puisque la présence des lymphocytes T CD8⁺ est cruciale à la thérapie anti-HER2, il a été proposé que l'absence de ces cellules diminuerait l'efficacité des anticorps, donc également celle de la combinaison d'agents. Afin de confirmer cette hypothèse, une cohorte de souris subit une déplétion de leur population de cellules T CD8⁺ grâce à des injections d'anticorps ciblant la chaîne CD8 β de leur récepteur. Une fois la déplétion confirmée, les animaux furent alors traités selon le protocole initial. Fait surprenant, aucune différence ne fut observée jusqu'au jour 40 en ce qui concerne les tumeurs TUBO (Fig.7). Le suivi à long terme des souris permit par contre d'observer une rechute chez les souris immunodéprimées ayant reçu la combinaison, alors que les animaux immunocompétents demeurèrent protégés. Ces résultats soulignent de nouveau l'importance de cette population cellulaire. Chez les tumeurs H2N100 RC5, par contre, la déplétion des cellules T CD8⁺ affecta la croissance dès le départ. Les masses traitées avec le trastuzumab seulement démontrèrent une croissance continue, alors que celles traitées avec la combinaison d'agents se stabilisèrent. Il semble alors que la thérapie combinée soit efficace autant chez un modèle CD8-dépendant qu'un étant CD8-indépendant.

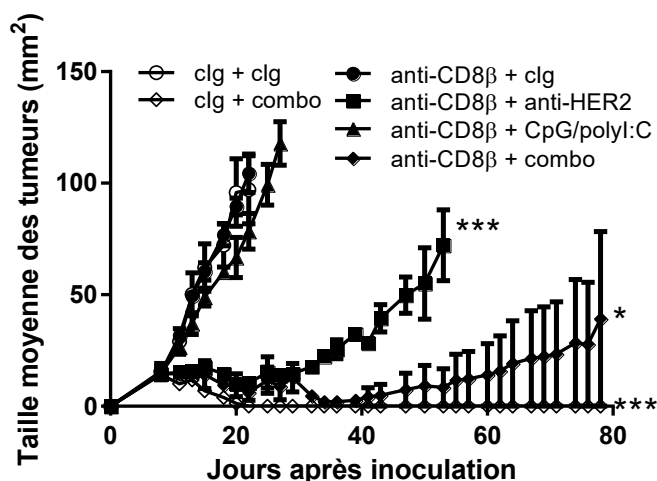


Figure 10. La déplétion *in vivo* des cellules T CD8⁺ élimine les effets du CpG ODN et du polyI:C, en plus de la protection à long terme de la combinaison chez les tumeurs TUBO. Les cellules TUBO furent injectées dans des souris Balb/c WT. Les animaux reçoivent l'anti-CD8 β (53.5.8) aux jours -1 et 0, puis une fois par semaine jusqu'à la fin. Aux jours 8, 12, 15 et 19, les souris reçoivent un des suivants : 100 μ g d'Ig contrôle (2A3), 100 μ g d'anti-HER2 (7.16.4), 25 μ g chacun de CpG ODN et de polyI:C., ou l'anti-HER2 et les agonistes TLR ensemble. Les données représentées sont les moyennes \pm SEM. $n = 4$ pour chaque groupe. (* $p = 0.0249$ anti-CD8 β + Combo vs. anti-CD8 β + anti-HER2; *** $p < 0.0001$ Combo vs. anti-CD8 β + anti-HER2)

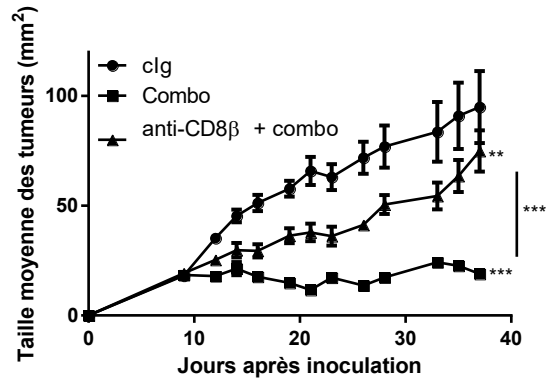


Figure 11. La déplétion *in vivo* des cellules T CD8⁺ réduit l'efficacité de la combinaison chez les tumeurs H2N100. Les cellules H2N100 furent injectées dans des souris Balb/c WT. Les animaux reçurent l'anti-CD8 β (53.5.8) aux jours -1 et 0, puis une fois par semaine jusqu'à la fin. Aux jours 9, 13, 16 et 20, les souris reçurent un des suivants : 50 μ g d'Ig contrôle (2A3), 50 μ g d'anti-HER2 (7.16.4), 25 μ g chacun de CpG ODN et de polyI:C., ou l'anti-HER2 et les agonistes TLR ensemble. Les données représentées sont les moyennes \pm SEM. $n = 10$ pour chaque groupe. (***) $p < 0.0001$ Combo vs. anti-CD8 β + Combo)

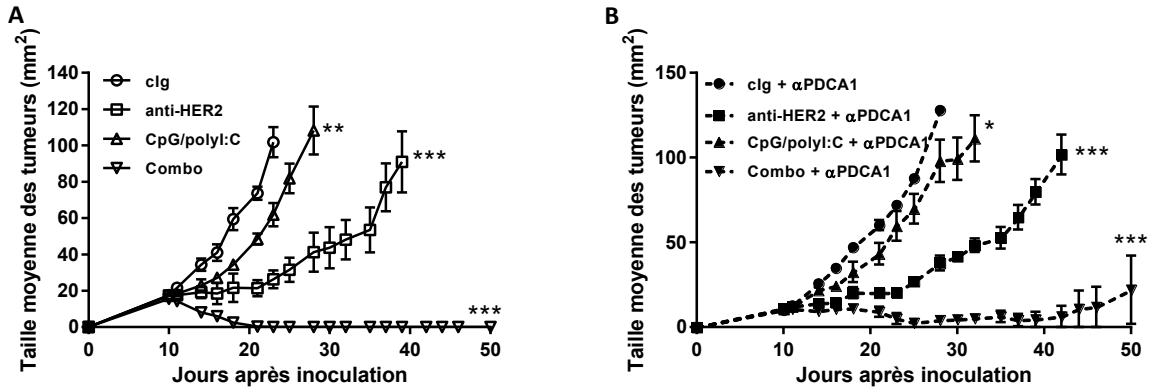


Figure 12. La déplétion *in vivo* des pDC n'affecte que modestement l'efficacité du CpG ODN et du polyI:C, ainsi que la combinaison. Les cellules TUBO furent injectées dans des souris Balb/c WT. Aux jours 10, 14, et 18, les souris immunocompétentes (A) et les souris déplétées (B) furent traitées avec un des suivants : 100 μ g d'Ig contrôle (2A3), 100 μ g d'anti-HER2 (7.16.4), 25 μ g chacun de CpG ODN et de polyI:C., ou l'anti-HER2 et les agonistes TLR ensemble. Les animaux déplétés reçurent l'anti-pDC (anti-PDCA1) aux jours -1, 0, 7, 14 et 21. (** $p = 0.0013$ Combo vs. anti-HER2; ** $p = 0.0017$ Combo + α PDCA1 vs. anti-HER2 + α PDCA1). Les données représentées sont les moyennes \pm SEM. $n = 4-5$ pour chaque groupe.

4.6 Les pDC ne sont que faiblement impliquées dans les effets thérapeutiques

Les DC sont une importante population qui sert de pont entre les immunités innée et adaptative. Plus spécifiquement, les pDC sont une sous-population produisant de grandes quantités de cytokines et chimiokines lorsque stimulées via leur TLR-9. Dans le but de déterminer leur contribution à la synergie observée *in vivo*, un groupe de souris reçut des injections d'un anticorps déplétant ciblant PDCA1, une protéine retrouvée à la surface des pDC.

Le suivi des tumeurs suivant les traitements de trastuzumab et/ou d'agonistes de TLR, ici représenté dans la Fig.9, révèle que l'absence de ces cellules n'affecte que légèrement l'efficacité de la thérapie combinée. Les tumeurs des animaux immunodéprimés ont démontré une régression respectable malgré tout, mais aucun rejet ne fut observé. Effectivement, ces tumeurs ont pu échapper au système immunitaire des souris sur le long terme.

4.7 Les cellules NK sont essentielles à la synergie observée

Comme il a déjà été démontré que l'activité anti-tumorale du trastuzumab dépend des cellules NK chez la souris, nous nous sommes demandé si la thérapie combinant l'anti-HER2 et les agonistes de TLR en était aussi dépendante. Tel que démontré à la Fig.10B, les souris immunocompétentes traitées avec des anticorps anti-HER obtinrent de meilleures réponses que les souris immunodéprimées, mais toutes les tumeurs se remirent à croître suite à l'arrêt des traitements. Cela confirme la théorie initiale voulant que la présence des cellules NK soit nécessaire au trastuzumab afin d'observer de l'ADCC. Les animaux recevant les injections de CpG et poly(I:C) démontrèrent une évolution semblable en présence ou non de cellules NK, mais seules les souris immunocompétentes réussirent à rejeter leur tumeur suite à une thérapie combinée (Fig. 10C-D). De plus, à l'opposé du trastuzumab employé seul, les animaux immunocompétents traités avec les anticorps et les agonistes réussirent à rejeter complètement leur masse tumorale. Ils demeurèrent également sains pendant plusieurs semaines suivant le dernier traitement. Ces résultats suggèrent que les cellules NK tiennent un rôle important au sein de la synergie observée lors de la combinaison du trastuzumab au CpG et poly(I:C).

4.8 L'activité cytotoxique des cellules NK est maximisée en présence des deux agonistes de TLR

Tel que mentionné ci-haut, la thérapie au trastuzumab dépend des cellules NK. Ceci est en partie dû au fait que les anticorps anti-HER2 induisent de l'ADCC au sein des tumeurs. Nous savons également que les cellules NK ont la capacité d'être directement stimulées par le CpG ODN via leur propre TLR-9. Cela signifie que leur stimulation, directe et indirecte, devrait mener à une activation prononcée de leurs fonctions cytolytiques. Dans le but d'évaluer cette hypothèse, des cellules NK purifiées furent mises en culture en présence de cellules tumorales, de

trastuzumab et des agonistes de TLR. Un plus grand pourcentage de cytotoxicité fut atteint quand du CpG ou du poly(I:C) était présent dans la co-culture (Fig.11A-B), mais aucune différence

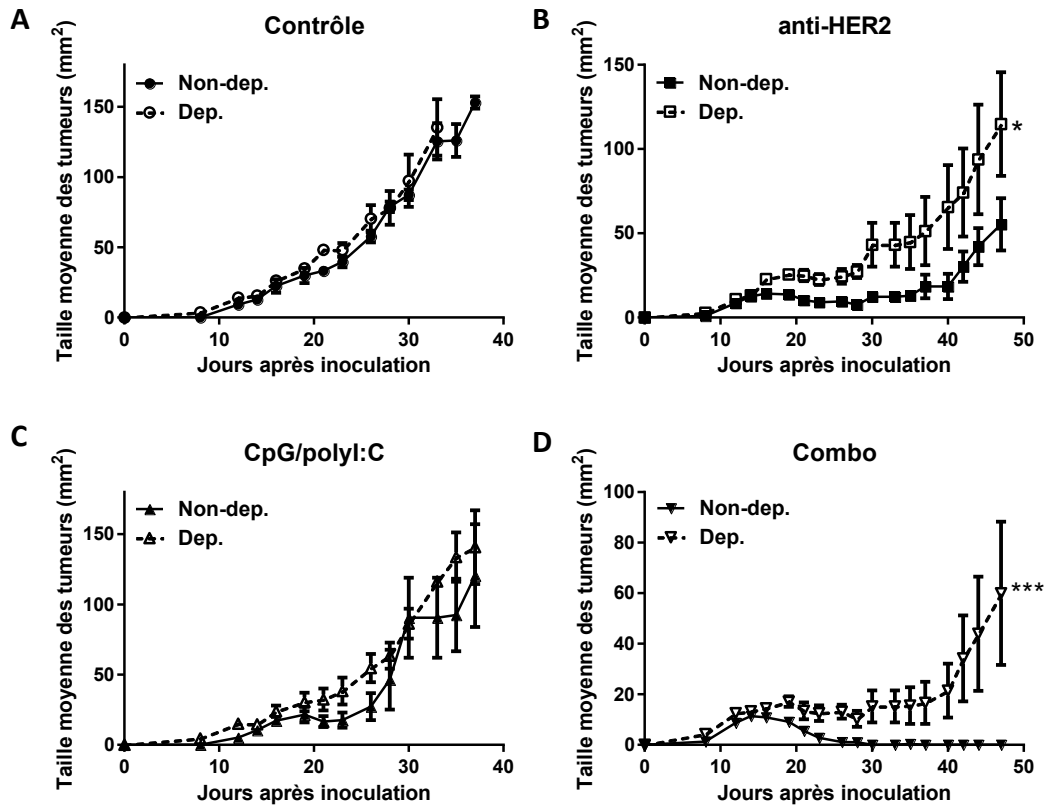
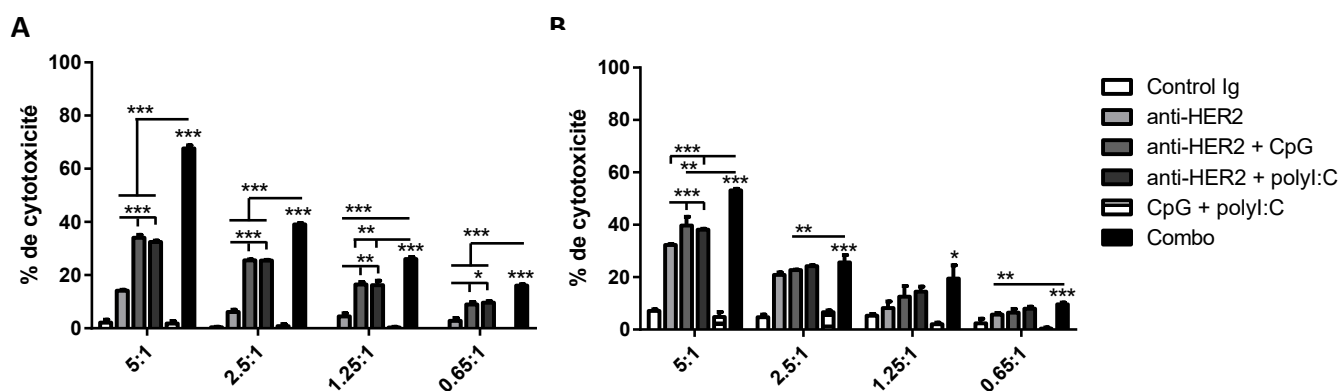


Figure 13. La déplétion *in vivo* des cellules NK élimine les effets de l’anti-HER2 et réduit dramatiquement l’efficacité de la combinaison. Les cellules TUBO furent injectées dans des souris Balb/c WT. Aux jours 10, 14, et 18, les souris immunocompétentes (A) et les souris déplétées (B) furent traitées avec un des suivants : 100 µg d’Ig contrôle (2A3)(A), 100 µg d’anti-HER2 (7.16.4)(B), 25 µg chacun de CpG ODN et de polyI:C. (C), ou l’anti-HER2 et les agonistes TLR ensemble (D). Les animaux déplétés reçurent l’anti-NK (anti-asialo-GM1) aux jours -1, 0, 7, 14, 21 et 28. Les données représentées sont les moyennes ± SEM. $n = 4$ pour chaque groupe. (* $p = 0.0412$; *** $p < 0.0001$)

significative ne fut observée entre les deux agonistes. Fait intéressant, quand tous deux étaient ajoutés à la culture, les cellules NK devinrent plus efficaces en termes de lyse des cellules SK-BR-3 et BT-474. En comparaison, les autres cellules normalement présentes dans la population de PBMC démontrèrent peu ou pas de cytotoxicité dirigée, même en présence de tous les agents thérapeutiques à la fois. Les cellules NK sont donc cruciales à la thérapie combinant le trastuzumab, le CpG ODN et le poly(I:C) de par leur capacité à effectuer de l’ADCC.

4.9 La thérapie combinée permet d'atteindre de forts niveaux d'IFN- γ , IP-10, TNF- α et IL-12

Nous savons maintenant que le TLR-3 et le TLR-9 ont la capacité d'agir en synergie afin d'augmenter l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Puisque la combinaison de trastuzumab et d'agonistes de TLR mena à une seconde synergie, nous voulions déterminer si les niveaux de cytokines seraient touchés. Un PCR quantitatif fut donc effectué sur de l'ARN extrait des tumeurs afin d'évaluer l'expression de certains gènes d'intérêt. Tel qu'illustré à la Fig.12, les niveaux d'IFN- γ étaient 12 fois plus élevés chez les souris traitées avec la thérapie combinant le trastuzumab, le CpG ODN et le poly(I:C). Cette cytokine était également en quantité 4 fois plus élevée chez les animaux traités avec les agonistes seulement. Les niveaux de la chimiokine IP-10 étaient 3 fois plus élevés et ceux de TNF- α , 5 fois plus élevés lors d'une thérapie combinée. L'IFN- β a été retrouvé en quantités semblables chez tous les groupes alors que l'IFN- α était surtout retrouvé chez les souris traitées avec le trastuzumab et le poly(I:C), ou avec la combinaison de tous les agents. L'IL-12 était dix fois plus élevé chez les animaux ayant reçu le trastuzumab en combinaison avec le CpG et le poly(I:C). Des quantités plus importantes d'IL-12 étaient également présentes chez les souris ayant été traitées avec le trastuzumab et le CpG ODN ainsi que celles traitées avec les deux agonistes.



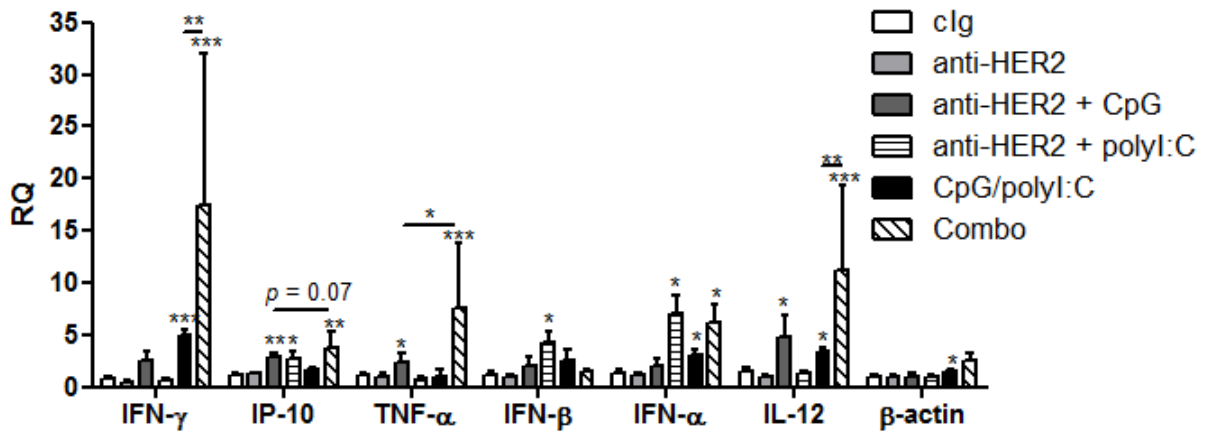


Figure 15. Les cellules immunitaires actives par l'anti-HER2, le CpG ODN et le polyI:C sécrètent plus de cytokines pro-inflammatoires. Les cellules TUBO furent injectées dans des souris Balb/c WT et traitées aux jours 8, 12, et 16 avec un des suivants: 100 μ g d'Ig contrôle (2A3), 100 μ g d'anti-HER2 (7.16.4), 25 μ g chacun de CpG ODN et de polyI:C., ou l'anti-HER2 et les agonistes TLR ensemble. Les tumeurs furent récoltées au jour 18 afin d'en extraire l'ARN. Les données représentées sont les moyennes \pm SEM. $n = 8$ pour chaque groupe.

Chapitre 5 : Discussion

5.1 Le CpG ODN et le poly(I:C) agissent en synergie avec l'anti-HER2 *in vivo*

L'addition des deux agonistes de TLR au trastuzumab permet aux souris de combattre leur tumeur rapidement et même de l'éliminer. De plus, la variabilité observée au sein du groupe était moindre que dans les autres. Les animaux démontrèrent également une immunité mémoire efficace lors de la deuxième injection de cellules tumorales sur le flanc opposé. Parmi les actions prédites de la thérapie combinant le trastuzumab ainsi que le CpG ODN et le poly(I:C), la première fut évidemment l'arrêt des signaux de croissance et prolifération suite au blocage d'HER2. Les voies MAPK, JAK/STAT, PI3K/Akt et NF- κ B ne sont plus stimulées et les cellules tumorales entrent en apoptose. La présence des anticorps à la surface des cellules amène également les cellules NK à s'activer et procéder à de l'ADCC, une action importante lors d'une thérapie anti-HER2. Des études ont également démontré que cette thérapie affecte le ratio de cellules T_{reg} et de cellules Th17. Il semblerait que le nombre de cellules T_{reg} circulant soit diminué alors que celui des cellules Th17 soit augmenté, ce qui est lié à une meilleure réponse inflammatoires. En effet, les T_{reg} inhibent normalement les réponses immunitaires souhaitées alors les cellules Th17 sécrètent des facteurs pro-inflammatoires dont l'IL-17, l'IL-23 et le TNF- α [160] [161].

L'ajout des agonistes de TLR-3 et TLR-9 contribue à améliorer les signaux pro-inflammatoires via l'activation et le recrutement des DC au sein de la tumeur. Ces cellules, une fois matures, produisent de grandes quantités de cytokines, incluant de l'IFN- γ , de l'IFN de type I et du TNF- α . Ce cocktail de molécules agit à son tour en activant et en attirant les autres types de cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral. Les cellules NK font partie des cibles, ce qui permet d'en augmenter leur activité en lien à l'anticorps. On compte également les molécules IP-10 et RANTES parmi les produits des DC, des chimiokines attirant les cellules T activées et produisant potentiellement de l'IFN- γ . L'IL-12, quant à lui, mène à la différenciation des lymphocytes T en effecteurs Th1. Fait intéressant, le CpG ODN et le poly(I:C) peuvent avoir une action directe sur certaines populations cellulaires. Par exemple, le poly(I:C) est capable de stimuler les lymphocytes T via leur propre TLR-3, ce qui encourage leur expansion et de

meilleures réponses antigène-spécifiques. D'un autre côté, le CpG ODN peut activer les TLR-9 à la surface des cellules NK et induire leur activation. Elles peuvent alors participer à l'ADCC, mais également à la production d'IFN- γ .

Lorsque les souris étaient traitées avec du trastuzumab seulement, la croissance des tumeurs était ralentie (TUBO) voir même arrêtée (H2N100 RC5). Il n'y avait cependant aucun rejet lors de la durée de l'expérience. Curieusement, les animaux recevant les agonistes répondaient différemment selon la lignée cellulaire qui était employée. Les tumeurs établies à partir de cellules TUBO réagissent moins bien aux CpG/poly(I:C) qu'à l'anti-HER2. À l'inverse, les tumeurs H2N100 RC5 répondent mieux aux agonistes qu'au trastuzumab. Puisque les cellules TUBO expriment de plus hauts niveaux d'HER2 que les H2N100, tel que vu par cytométrie de flux, l'hypothèse émise a été qu'elles sont plus susceptibles à l'activité des cellules NK. Finalement, les tumeurs traitées avec la combinaison de trastuzumab et de CpG/poly(I:C) ont régressé beaucoup plus rapidement et ont démontré moins de variabilité que les autres groupes.

Les animaux ayant pu rejeter leur tumeur précédemment avaient été gardés pour une deuxième expérience. Afin de vérifier si notre thérapie permettait au système immunitaire des souris de créer une mémoire immune, ces animaux reçurent un *challenge*, c'est-à-dire une nouvelle injection de cellules cancéreuses. L'absence d'apparition d'une nouvelle tumeur ainsi que l'absence de rechute de la première permirent de conclure que les animaux avaient acquis une protection. Ils avaient donc été capables de bâtir une mémoire immunitaire robuste suite aux traitements.

5.2 L'administration combinée de CpG/poly(I:C) et de trastuzumab offre des réponses systémiques

Lors de la troisième expérience, l'administration locale d'agonistes de TLR permit d'obtenir des effets thérapeutiques bénéfiques même à un site distant. Les injections du CpG ODN et du poly(I:C) furent initialement faites de manière intratumorale suite aux études démontrant que c'était le seul moyen d'obtenir l'action désirée sur la masse cancéreuse [162] [163]. De ce fait, nous voulions savoir si les effets thérapeutiques de la combinaison d'agents étaient seulement locaux ou s'ils pouvaient atteindre des sites éloignés. Des animaux furent donc

inoculés, mais sur les deux flancs à la fois. Des deux tumeurs se développant, une seule recevait des injections de CpG/poly(I:C), plus précisément celle du flanc gauche. Tel qu'attendu, les anticorps anti-HER2, qui sont injectés de manière *i.p.*, eurent un effet similaire sur les deux flancs. Leur entrée en circulation dès le départ leur permet d'atteindre les cellules tumorales aux deux endroits sensiblement en même temps. Les résultats sont d'autant plus intéressants lorsqu'on réalise que les agonistes de TLR, injecté à un site, permettent d'augmenter l'activité anti-cancéreuse au deuxième site également.

Chez les deux cohortes de souris recevant les agonistes de TLR («CpG/polyI:C» et «Combo»), les effets thérapeutiques sont observés environ 8 jours plus tard au site secondaire. Sachant que le système immunitaire produit une réponse adaptative au bout de 7-10 jours, on déduit alors que ce délai est attribuable au temps requis pour les cellules d'être activées puis de reconnaître ce site distant. On peut alors résumer le tout en disant que les agonistes de TLR activent les cellules immunitaires, ce qui augmente la cytotoxicité au sein de la tumeur primaire et expose ainsi les antigènes associés à la tumeur (TAA) aux APCs. Ces dernières subissent alors une maturation, migrent au nœud lymphatique drainant et se mettent à produire des cytokines pro-inflammatoires. Les cellules effectrices, activées de cette manière, entrent alors dans la circulation sanguine afin de rejoindre les sites d'inflammation.

5.3 La thérapie combinée résulte en une amélioration de l'activité CTL *in vivo*

La thérapie combinant des injections de trastuzumab ainsi que de CpG ODN et poly(I:C) ont permis non seulement d'activer, mais également de recruter les lymphocytes T CD8⁺ de manière efficace. Tel que décrit un peu plus tôt, les cellules T CD8⁺ peuvent être stimulées de manière directe et indirecte par leur TLR-3 fonctionnel couplé à la présence d'une multitude de cytokines et chimiokines. Le but de la quatrième expérience fut donc de déterminer si l'ajout de CpG/poly(I:C) aux anti-HER2 mènerait à une cytotoxicité spécifique plus efficace. En injectant des splénocytes pulsés avec le peptide HER2 immunodominant (TYVPANASL) à des souris déjà traitées, il est possible d'évaluer l'activité des CTLs. En effet, suite à l'injection, les cellules reconnues par le système immunitaire sont lysées alors que les autres migrent naturellement vers

la rate de l'animal. La récolte de l'organe le lendemain permet donc une analyse du ratio de cellules ayant été détruites. Chez les souris ayant reçu le trastuzumab seulement, 16,9% de lyse spécifique fut observée alors que l'isotype contrôle n'en a démontré que 7,7%. Tel que la littérature le décrit, les animaux traités avec les agonistes CpG/poly(I:C) ont eu de meilleures réponses antigène-spécifiques, avec 24,3% de cytotoxicité. Notons que les tumeurs TUBO démontrent une plus grande sensibilité au trastuzumab *in vivo*, mais qu'ici nous observons une meilleure activité CTL avec les agonistes. Finalement, en combinant les anticorps et les agonistes, les souris atteignent 40,2% de lyse spécifique. Cela représente donc 23% de plus que le trastuzumab seul et 16% de plus que le traitement CpG/poly(I:C).

Nous aurions pu nous attendre à une plus grande lyse des cellules pulsées considérant que les souris réussissent à rejeter leur tumeur complètement. Cependant, certains détails ne sont pas à négliger. En premier lieu, la population de cellules employée au moment du chargement du peptide est mixte. Seules les cellules ayant efficacement capturé le peptide par pinocytose/endocytose et chargé ce dernier sur une molécule de CMH de classe I exprimeront le dit peptide à leur surface [164] [165]. En deuxième lieu, les cellules sont injectées et laissées en circulation pendant quelques heures alors que le suivi initial des souris se faisait sur plusieurs jours. Le système immunitaire n'a donc pas été en contact avec les cibles aussi longtemps lors de cette expérience. En troisième et dernier lieu, le peptide chargé est l'épitope immunodominant d'HER2. En temps normal, les APCs présentent plusieurs peptides différents provenant des cellules tumorales afin d'activer plusieurs lymphocytes T. Ici, la présence d'un seul peptide veut également dire qu'on active seulement les cellules T spécifiques à ce dernier, ce qui réduit l'ampleur de la réponse.

5.4 Le CpG ODN et le poly(I:C) induisent une production plus élevée d'IFN- γ par les cellules T CD8⁺

L'analyse plus détaillée des cellules T CD8⁺, suite aux stimulations de TLR, révéla que la proportion de lymphocytes produisant de l'IFN- γ était semblable parmi les traitements, mais que les cellules actives semblaient produire une plus grande quantité de cette cytokine. Nous savons déjà qu'une thérapie anti-HER2 dépend de la présence de cellules T CD8⁺ IFN- γ ⁺ et que les

agonistes de TLR permettent leur recrutement ainsi que leur activation. L'hypothèse de cette cinquième expérience était donc que la combinaison des trois agents mènerait à une plus grande population activée en plus d'une production plus élevée d'interféron par lymphocyte. Or, l'analyse des tumeurs par cytométrie en flux (*Sup.Fig.2*) nous révèle que tous les traitements augmentent le pourcentage de cellules T CD8⁺ IFN- γ ⁺ autour de 47-50%. En comparaison, l'anticorps contrôle démontre environ 35% d'événements positifs. À l'inverse de ce que l'on croyait, il n'y a donc pas plus de lymphocytes qui produisent de l'IFN- γ au sein des tumeurs traitées avec le trastuzumab et les agonistes de TLR. Nous nous sommes donc tournés vers la MFI afin de déterminer si les cellules avaient des niveaux intracellulaires plus élevés d'interféron. Il s'avère que les injections de CpG/poly(I:C), que ce soit en monothérapie ou en combinaison, induisent une plus forte production d'IFN- γ par cellule T. Par contre, seul le groupe de souris recevant les agonistes en monothérapie ont démontré une différence significative avec le trastuzumab. Il semble donc que l'ajout des agonistes de TLR ne permet pas d'augmenter la proportion de cellules T CD8⁺ IFN- γ ⁺, mais que les cellules stimulées aient la capacité de produire de plus grandes quantités d'interféron.

Si tel est le cas, il serait intéressant de procéder à une quantification de cette production, par exemple, par un essai ELISA. En effet, suite à une mise en culture de cellules T CD8⁺ purifiées en présence ou non des agents thérapeutiques, l'IFN- γ produit est sécrété dans le milieu. Il serait alors possible, après quelques heures, de récolter le surnageant de ces cellules et de l'analyser par ELISA de type « sandwich ». Il suffit de mettre un anticorps de capture (anti-IFN- γ) au fond des puits d'une plaque 96 puits, déposer le surnageant de chaque condition dans leurs puits respectifs et, finalement, ajouter un anticorps de détection (anti-IFN- γ – HRP). À l'aide d'une échelle appropriée, il est alors possible d'associer la densité optique de chaque puit à une concentration bien précise d'IFN- γ . Cette expérience permettrait alors de découvrir si la combinaison de trastuzumab et de CpG/poly(I:C) induit bel et bien une augmentation de la production d'interféron.

5.5 Les cellules T CD8⁺ sont importantes pour la protection à long terme

L'absence de lymphocytes T CD8⁺ n'empêcha pas les animaux de combattre leur tumeur à court terme, mais elle les empêcha de demeurer sains sur une longue période de temps. Puisque la présence des lymphocytes T CD8⁺ est cruciale à la thérapie au trastuzumab, une hypothèse a été émise voulant que la déplétion de ces cellules *in vivo* mènerait également à une diminution des effets de la combinaison. De ce fait, des souris furent traitées avec un anticorps ciblant la chaîne β du TCR avant de recevoir les cellules tumorales suivi des divers traitements à l'étude. Tel qu'attendu, les animaux déplétés et recevant la thérapie combinée, dans un contexte de tumeurs H2N100 RC5, n'eurent pas autant d'effets bénéfiques. Les souris immunocompétentes virent la taille de leur tumeur se stabiliser alors que celles-ci n'obtinrent qu'un ralentissement de croissance. Lorsqu'on observe les tumeurs TUBO cette fois, étonnamment, l'absence des cellules T CD8⁺ n'affecta aucunement l'évolution des tumeurs à court terme. Il s'avère donc que le traitement combinant l'anti-HER2 et les agonistes de TLR fonctionne autant dans un modèle CD8-dépendant que CD8-indépendant. Ce n'est qu'au jour 40 environ qu'une différence commença à apparaître entre les deux cohortes de souris. Les lymphocytes T sont, comme on le sait de nos jours, importants pour l'immunité mémoire et la protection à long terme contre le pathogène ou le danger rencontré. C'est ce qu'on observe grâce à cette même expérience dans laquelle un suivi prolongé fut effectué. En effet, les tumeurs des souris immunodéprimées, malgré leur élimination initiale, finirent par réapparaître alors que les souris WT (*wild type*) demeurèrent protégées.

5.6 Les pDC ne contribuent que modestement à la thérapie

Malgré un suivi à long terme, aucune différence ne fut observée entre la cohorte de souris immunocompétentes et la cohorte immunodéprimée. Une des théories veut que les agonistes de TLR induisent une forte production de cytokines pro-inflammatoires via l'activation des pDC. Plus précisément, il a été démontré que ces cellules sont non seulement les cibles principales d'une stimulation du TLR-9 [166], mais aussi qu'elles infiltrent les tumeurs solides [167]. Le CpG ODN employé lors de ce projet est de classe B, aussi appelé type K. Cette classe est

reconnue pour ses effets stimulants sur les pDC menant à l'activation des cellules NK et associée à une réponse Th1 [168]. La septième expérience fut donc de dépléter cette population cellulaire *in vivo* grâce à un anticorps anti-PDCA1 afin de voir si les traitements seraient moins efficaces. Il s'avère que l'absence de pDC n'ait pas autant d'effets que ce qu'on aurait pu croire. Une faible différence fut observée entre les souris WT et les souris immunodéprimées dans le cadre de la monothérapie CpG/poly(I:C). De ce fait, la combinaison de trastuzumab et d'agonistes de TLR n'en est que modestement affectée également. Bien que les animaux ne soient pas capables de rejeter leur tumeur entièrement, de bonnes réponses anti-tumorales sont obtenues.

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que le poly(I:C), lui, stimulerait plutôt les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) [169]. De plus, le potentiel de cet agoniste de TLR-3 a souvent été comparé à celui des différentes classes de CpG ODN. Le poly(I:C) est décrit comme ayant le meilleur potentiel d'activation des cellules NK, de l'activité cytolytique spécifique ainsi que de la production de cytokines [170] [171]. La stimulation du TLR-3 mène donc, au final, à une forte production de facteurs inflammatoires par les cDC, auquel s'ajoute l'activation d'autres cellules via leur propre TLR-3 et TLR-9. Il en résulte tout de même une forte stimulation immunitaire malgré l'absence des pDC.

5.7 La synergie observée est dépendante des cellules NK

Dans l'expérience suivante, des souris furent traitées avec un anti-asialo-GM1 afin de dépléter la population cellulaire NK. L'absence de ces dernières n'eut aucun effet sur l'évolution des tumeurs du groupe contrôle ainsi que la thérapie CpG/poly(I:C). Par contre, et comme on devait s'y attendre, les souris recevant les injections de trastuzumab virent leur masse croître plus rapidement. Comme il a déjà été mentionné, l'ADCC est un mécanisme central de la thérapie anti-HER2 et les cellules NK en sont les principaux acteurs. Sans cette population, les effets de l'anticorps se résument donc à l'arrêt des signaux de croissance et prolifération, et une plus faible proportion d'ADCC médié par les macrophages. La réduction des effets bénéfiques du trastuzumab mène inévitablement à la perte de l'effet thérapeutique de la combinaison d'anti-HER2 et CpG/poly(I:C). Tel qu'observé dans ce groupe de traitement, les animaux immunodéprimés n'ont plus la capacité de combattre et rejeter leur tumeur.

Ces résultats soulignent l'importance des cellules NK dans l'élimination des cellules cancéreuses et renforce l'idée que nous pouvons augmenter les effets thérapeutiques du trastuzumab via la stimulation de ces cellules. Rappelons que, suite à une stimulation des deux TLR, les DC sécrètent de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'IL-12, tous associés à l'expansion des cellules NK. Par le fait même, ces dernières se mettent également à produire des cytokines en plus de devenir plus efficace en termes de cytotoxicité spécifique [172] [173]. Ces effets immunostimulateurs sont d'autant plus encouragés par le TLR-9 à la surface des cellules NK-mêmes qui, par ses signaux intracellulaires, contribue à leur activation.

5.8 Les deux agonistes sont nécessaires afin de maximiser la cytotoxicité médiée par les cellules NK

Les essais d'ADCC effectués par la suite supportent l'idée du rôle central des cellules NK ainsi que de leur potentiel suite à une stimulation des TLR. En effet, lorsque du CpG ODN et du poly(I:C) sont ajoutés aux co-cultures, les cellules NK atteignent de meilleurs pourcentages de cytotoxicité. Si on combine le CpG ODN avec le trastuzumab, nous obtenons sensiblement les mêmes résultats que l'ajout de poly(I:C) aux anticorps (32-39%). Comme ce sont des cellules NK purifiées, il semble que ces dernières aient la capacité de répondre aux stimuli de leurs deux TLR et que les deux cascades signalétiques puissent améliorer les effets de l'anti-HER2. La stimulation des NK est normalement accompagnée de l'augmentation de l'expression de CD69 à leur surface, mais aussi à leur production d'IFN- γ , ce qui permet leur action cytotoxiques ciblant les cellules tumorales opsonisées [174]. Lorsqu'on ajoute à la fois du CpG ODN et du poly(I:C) aux anticorps, les signaux semblent agir en synergie et améliorer encore plus les fonctions des cellules NK. Le pourcentage de cytotoxicité, au ratio 5:1, grimpe à 53% chez les BT-474 et 68% chez les SK-BR-3. En revanche, la fraction négative des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) (cellules B, cellules T, monocytes...), n'atteignent au maximum qu'environ 18% de lyse spécifique suite à l'ajout des agonistes (*Sup.Fig.3*). Cela révèle encore une fois l'importance des cellules NK grâce à leur grande contribution en termes d'ADCC.

Une autre méthode d'analyse du statut d'activation des cellules NK consiste à étudier leurs niveaux de dégranulation. Lors de la sécrétion des granules cytolytiques par les cellules, la

molécule CD107a se retrouve exposée transitoirement à la surface. Cela en fait donc une bonne cible pour une analyse par cytométrie de flux, expérience qui fut tentée. En effet, nous avons effectué une mise en culture de cellules tumorales et de PBMC, puis les avons traitées selon les diverses options de thérapie. Le trastuzumab induit la dégranulation d'environ 32% des cellules NK alors que l'ajout de CpG ODN ou de poly(I:C) induit, respectivement, environ 41% et 47% (*Sup.Fig. 4-5*). La combinaison des trois agents ne put augmenter ce nombre qu'à 49% seulement, une différence bien décevante dans un contexte de synergie. Afin de tenter d'augmenter ce dernier pourcentage, nous tentâmes d'augmenter le temps de contact entre les cellules cibles et les effecteurs, passant de quatre heures d'incubation à cinq heures, mais sans succès. Il fut également proposé de modifier les concentrations des agonistes afin d'en voir les effets. Hélas, la comparaison de ces diverses quantités de CpG ODN et poly(I:C) n'eut aucun effet non plus. Il se pourrait alors que la synergie observée n'affecte pas la sécrétion de granules cytolytiques spécifiquement.

5.9 La synergie induit de plus hauts niveaux d'IFN- γ , IP-10, TNF- α et IL-12

Puisqu'une synergie est observée lors de l'engagement simultané des TLR-3 et TLR-9, nous voulions découvrir si l'expression de certaines cytokines clés en est augmentée. De ce fait, l'ARN des tumeurs des souris, suite aux traitements, fut analysé par PCR quantitatif. La thérapie combinant le trastuzumab et les agonistes de TLR induit une forte expression d'IFN- γ , IP-10, TNF- α et IL-12. Le premier a été retrouvé en quantité 12 fois plus élevée que les autres traitements, ce qui suggère une forte synergie entre les trois agents. Nous savons déjà que la thérapie anti-HER2 est associée à une production d'IFN- γ par les cellules T CD8⁺. L'incorporation de la stimulation de TLR, elle, mène à l'activation de ces cellules en plus des pDC, cDC et cellules NK, toutes des productrices d'IFN- γ . Cette sécrétion de cytokines est d'autant amplifiée sachant que ces populations cellulaires sont stimulées de façons directe et indirecte. Les niveaux d'IP-10 sont plus élevés chez les souris ayant reçu la combinaison comparés à celles traitées avec le trastuzumab seulement. La différence est moins importante lorsqu'on compare ce groupe aux deux autres combinant l'anti-HER2 avec le CpG ODN ou le

poly(I:C) ($p= 0.07$). Cette augmentation fut cependant confirmée comme étant statistiquement significative lors d'une autre expérience. Le TNF- α , de son côté, était en quantité cinq fois plus importante lorsqu'on traitait avec la thérapie combinée, indiquant clairement une augmentation dû à l'ajout des deux agonistes. Notons que les cytokines et chimiokines sécrétées par les DC contribuent à l'activation et au recrutement des autres cellules, ce qui les amène à produire de l'IFN- γ et du TNF- α à leur tour. Toujours en termes d'augmentation, l'IL-12 était au moins sept fois plus élevé que les autres groupes, soulignant encore une fois l'action du CpG ODN et du poly(I:C).

Les niveaux d'IFN- β , par contre, sont similaires au contrôle, ce qui est probablement dû à la date de récolte. Il est important de rappeler que les IFN de type I sont surtout produits en début de réponse par l'immunité innée [175] [176]. L'évolution vers une réponse spécifique réduit graduellement leurs niveaux. Comme les tumeurs ont été récoltées dix jours après le premier traitement, il est fort probablement que nous voyons le portrait de la réponse adaptative. Lorsqu'on s'attarde à l'IFN- α , on voit que les niveaux sont plus élevés que la majorité des groupes excepté les animaux traités à la fois avec l'anti-HER2 et le poly(I:C). Il se peut que, comme l'IFN- β , le temps spécifique de récolte ne soit pas le bon afin de voir une différence. Par contre, ces résultats pourraient également signifier que l'augmentation de cette molécule soit attribuable au poly(I:C) et que l'ajout de CpG ODN ne résulte pas en une synergie de ce côté. Ceci coïnciderait avec le fait que ce sont plutôt les classes A et C de CpG ODN qui sont reconnus comme de forts inducteurs d'IFN- α [171] [177].

Chapitre 6 : Conclusions

L'efficacité de la thérapie anti-HER2 repose sur l'arrêt des signaux de prolifération au sein de la tumeur, l'entrée des cellules en apoptose ainsi qu'à l'élimination de ces dernières par le système immunitaire. Parmi les mécanismes en jeu, la reconnaissance des cellules cancéreuses par le trastuzumab mène à l'activation des cellules NK. L'ADCC qui en résulte permet la relâche de TAA qui stimulent les cellules immunitaires via leur TLR et recrutent des cellules effectrices telles les lymphocytes CD8⁺ producteurs d'IFN- γ . Cette dépendance aux réponses de TLR peut être exploitée afin d'améliorer l'immunité anti-tumorale. Lors de ce projet, il nous a été possible de démontrer que l'utilisation de poly(I:C) et de CpG ODN, agonistes des TLR-3 et TLR-9 respectivement, permet d'activer et recruter des effecteurs majeurs dans le microenvironnement de la tumeur. La stimulation des cDC et pDC à l'aide des agonistes en plus de la présence des TAA encourage leur maturation ainsi que leur production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. De plus, d'autres compartiments cellulaires tels les cellules NK et les lymphocytes T peuvent être directement stimulés via leur propre TLRs.

La combinaison du trastuzumab avec le CpG ODN et le poly(I:C) résulte en une synergie qui permet une réponse anti-tumorale plus rapide et plus prononcée, et donc à un rejet total de la tumeur tel que vu chez la souris. De plus, cette réponse est systémique et induit une immunité mémoire contre les cellules cancéreuses, ce qui a permis aux animaux d'être protégés lors d'un *challenge* et de rejeter une tumeur secondaire distante. Ces deux qualités sont particulièrement importantes sachant que le cancer du sein HER2⁺ donne souvent naissance à des métastases. L'étude des mécanismes d'action permet de découvrir que le modèle TUBO est CD8-indépendant, alors que son homologue H2N100 avait été décrit comme CD8-dépendant. Malgré cette différence, la thérapie combinée s'avéra être aussi efficace chez l'un que chez l'autre. De plus, les CTLs ont démontré une meilleure capacité de lyse spécifique suite aux traitements anti-HER2, CpG ODN et poly(I:C). Malgré le fait qu'aucune différence n'ait été observée entre la monothérapie usant des agonistes et la combinaison, il semble que la stimulation du TLR-3 et TLR-9 induisent une plus forte production d'IFN- γ chez les cellules T. Tel qu'on pouvait s'y attendre, la présence des lymphocytes T CD8⁺ a également été d'une importance cruciale pour la création d'une immunité mémoire protégeant les animaux à long terme. À l'inverse, les pDC, de bonnes cibles pour les agonistes de TLR, avaient été un champ d'intérêt et se sont avérées n'être

que faiblement impliquées dans cette nouvelle thérapie. Bien que l'absence de ces cellules ait empêché le rejet total des tumeurs, de fortes réponses anti-tumorales ont été induites. Les cellules NK ont quant à elles démontré un haut potentiel suite à l'addition de CpG ODN et poly(I:C) au trastuzumab. Leurs fonctions cytotoxiques ont pu être enclenchées en premier lieu par leurs récepteurs Fc reconnaissant l'anti-HER2, mais également via leur stimulation directe et indirecte. Les essais d'ADCC ont révélé que chaque agoniste a le pouvoir d'encourager l'action des cellules NK contre leurs cibles, mais que la présence des deux permet de maximiser la cytotoxicité. L'ajout de CpG ODN et de poly(I:C) à titre d'adjuvants permet aux DCs d'activer et recruter les autres compartiments cellulaires, mais permet également de stimuler ces derniers directement. Le tout résulte en une synergie et une augmentation de la sécrétion d'IFN- γ , IP-10, TNF- α et IL-12 au sein des tumeurs, contribuant grandement aux réponses anti-tumorales.

Les mécanismes d'action n'ont cependant pas tous été élucidés. Par exemple, la cytométrie de flux nous a permis de découvrir que les cellules T produisant de l'IFN- γ ne sont pas retrouvées en une plus grande proportion, mais que chaque cellule active semble produire une plus forte quantité de cette cytokine. Or, pour confirmer cette théorie, il faudrait procéder à un ELISA afin de quantifier précisément les quantités d'IFN- γ produites selon les traitements. Dans la même veine, nous savons que l'IFN- γ et les réponses de type I sont importants lors de notre thérapie. Il serait donc intéressant d'effectuer les traitements dans un modèle de souris IFN- γ KO (*knock-out*) ou alors injecter des animaux avec un anticorps bloquant le récepteur IFNAR1. L'hypothèse voudrait que, de par leur importance, l'absence de la molécule ou des signaux associés diminuerait l'efficacité de la thérapie. De plus, comme nous induisons la sécrétion de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, il serait utile de comparer les niveaux d'infiltration lymphocytaire dans les tumeurs traitées. Si notre thérapie combinant l'anti-HER2 et les agonistes de TLR mène bel et bien au recrutement des divers compartiments, nous verrions alors beaucoup plus de cellules immunitaires à l'œuvre. Ces autres compartiments peuvent potentiellement inclure d'autres cellules importantes, mais non étudiées lors de ce projet. Par exemple, la stimulation des TLR ainsi que l'induction d'ADCC sont deux éléments pouvant également rejoindre les macrophages. Certaines études ont déjà démontré que la stimulation du TLR-9 présent chez cette population, via l'ajout de CpG ODN, les amène à produire de grandes quantités d'IFN de type I, d'IL-12, d'IL-6 et de TNF- α [178]. Une autre population de cellules pouvant répondre positivement à une stimulation du TLR-9 est les MDSC. Ces dernières sont présentes

dans la majorité des tumeurs, autant humaines qu'animales, et sont normalement induites par les facteurs pro-inflammatoires présents. Leur accumulation a été associée à l'inhibition des réponses anti-tumorales et donc à la progression des cancers [179]. Des études ont démontré que le CpG ODN a le pouvoir d'induire la transformation des MDSC monocytiques en macrophages de type M1, ce qui encourage l'élimination de la tumeur [180]. Un dernier exemple de cellules immunitaires pouvant être impliquées serait les cellules B. Souvent sous-estimées, leur présence dans le cancer du sein a pourtant été associée à un meilleur pronostic [181] [182]. En plus des structures lymphoïdes tertiaires organisées et adjacentes à la masse tumorale, leur infiltration dans cette dernière corrèle avec la présence de cellules T_{FH} . L'analyse de ces cellules B par cytométrie de flux a révélé qu'elles expriment les molécules de CMH ainsi que les molécules de co-stimulation (HLA, CD80/86, CD40) [183] [184]. Sachant que le CpG ODN mène également à la stimulation des lymphocytes B, il serait alors intéressant d'étudier leur rôle plus en détails.

Finalement, d'autres points devront être améliorés au niveau de la thérapie elle-même. En effet, lors de ce projet, les agonistes de TLR étaient injectés de manière intratumorale, une technique possible considérant l'emplacement des tumeurs. Or, chez les patients, la meilleure voie d'administration demeure par le sang. Afin de faciliter les procédures de traitement, certaines équipes ont commencé à combiner des molécules de transport avec des produits thérapeutiques. À titre d'exemple, il a eu l'apparition d'un conjugué trastuzumab-CpG, une structure possible via l'addition d'un pont sulfo-EMCS (ester N-[ϵ -maleimidocaproyloxy]succinimide) [185]. Le CpG ODN a aussi été conjugué à un anticorps anti-MUC1 [186], une combinaison agissant de deux manières contre la tumeur à l'instar du trastuzumab-CpG. D'autres équipes ont voulu exploiter les facteurs fortement utilisés par la tumeur de par sa prolifération. Il y eu développement des molécules EGF-poly(I:C) ainsi que TfPLL-poly(I:C), combinant respectivement un facteur de croissance et la transferrine à l'agoniste de TLR-3

Bibliographie

- [1] Société Américaine du Cancer, «The History of Cancer», 2015. [En ligne]. Available: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002048-pdf.pdf>. [Accès en 2015].
- [2] D. Winchester et D. Winchester, *Breast Cancer*, 2nd éd., B. Decker, Éd., Walsworth, 2006, pp. 2-4.
- [3] P. Alpini, *The Presages of Life and Death in Diseases*, vol. 1, London: G. Strahan and J. Clarke, 1746, p. 77.
- [4] I. Jatoi, M. Kaufmann et J. Petit, *Atlas of Breast Surgery*, Springer Science & Business Media, 2005, pp. 1-6.
- [5] W. McGuire, *Current Approaches to Therapy*, Springer Science & Business Media, 2012.
- [6] S. Leong, *Cancer Metastasis and the Lymphovascular System: Basis for Rational Therapy*, Springer Science & Business Media, 2007, pp. 119-127.
- [7] N. Ali, *Understanding Lung Cancer: An Introduction for Patients and Caregivers*, Rowman & Littlefield, 2014, p. 39.
- [8] P. C. Walsh et J. F. Worthington, *Dr. Patrick Walsh's Guide to Surviving Prostate Cancer*, 2nd éd., Grand Central Publishing, 2010.
- [9] E. M. Schlegel, *The Restless Universe : Understanding X-Ray Astronomy in the Age of Chandra and Newton*, Oxford University Press, 2002.
- [10] B. A. Teicher, *Cancer Therapeutics: Experimental and Clinical Agents*, Springer Science & Business Media, 1996.
- [11] S. Parker, *Kill or Cure: An Illustrated History of Medicine*, Penguin, 2013.
- [12] B. Dong, L. J. Minze, W. Xue et W. Chen, «Molecular insights into the development of T cell-based immunotherapy for prostate cancer».
- [13] C. L. Holmes-Liew, L. B. M. Holmes, P. Hopkins, D. Chambers, C. Smith et R. Khanna, «Adoptive T-cell immunotherapy for ganciclovir-resistant CMV disease after lung transplantation,» *Clinical & translational Immunology*, vol. 4, n° 13, 2015.
- [14] J. Bowers, M. Nelson, S. Kundimi, S. Bailey, L. Huff, K. Schwartz, D. Cole, M. Rubinstein et C. Paulos, «Dendritic Cells in Irradiated Mice Trigger the Functional Plasticity and Antitumor Activity of Adoptively Transferred Tc17 Cells via IL12 Signaling,» *Clinical Cancer Research*, vol. 21, n° 111, pp. 2546-2557, 2015.
- [15] D. O. Villarreal, N. Svoronos, M. C. Wise, D. J. Shedlock, M. P. Morrow, J. R. Conejo-Garcia et D. B. Weiner, «Molecular adjuvant IL-33 enhances the potency of a DNA vaccine in a lethal challenge model,» *Vaccine*, vol. 33, n° 135, pp. 4314-4320, 2015.
- [16] Gouvernement du Canada, Société Canadienne du Cancer, Statistiques Canada, Agence de Santé Publique du Canada et les Registres Provinciaux/territoriaux de Cancer du Canada, «Canadian Cancer Statistic», 2015. [En ligne]. Available: <http://www.cancer.ca/~media/cancer.ca/CW/cancer%20information/cancer%20101/Canadian%20cancer%20statistics/Canadian-Cancer-Statistics-2015-EN.pdf>. [Accès en 2015].
- [17] Société Canadienne du Cancer, Statistiques Canada et l'Agence Publique de Santé du Canada, «Canadian Cancer Statistics», 2013. [En ligne]. Available: <http://www.cancer.ca/~media/cancer.ca/CW/cancer%20information/cancer%20101/Canadian%20cancer%20statistics/canadian-cancer-statistics-2013-EN.pdf>. [Accès en 2015].
- [18] Breast Cancer Health Center, «Types of Breast Cancer: ER Positive, HER2 Positive, and Triple Negative», 2015. [En ligne]. Available: <http://www.webmd.com/breast-cancer/breast-cancer-types-er-positive-her2-positive>.

- [19] M. Marino, P. Galluzzo et P. Ascenzi, «Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription,» *Current Genomics*, vol. 7, n° 18, pp. 497-508, 2006.
- [20] A. Daniel, C. Hagan et C. Lange, «Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer,» *NIH*, vol. 6, n° 13, pp. 359-369, 2011.
- [21] Organisation Susan G. Komen, «Breast Cancer Subtypes», 2014. [En ligne]. Available: <http://ww5.komen.org/BreastCancer/SubtypesofBreastCancer.html>.
- [22] Organisation Susan G. Komen, «Triple-Negative Breast Cancer», Breast Cancer Organization, 2015. [En ligne]. Available: http://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/trip_neg.
- [23] Société du Cancer du Sein du Canada, «Types of Breast Cancer», 2014. [En ligne]. Available: <http://www.bcscc.ca/p/41/1/506/t/Breast-Cancer-Society-of-Canada---Types-of-Breast-Cancer>.
- [24] Organisation du Cancer du Sein, «Who Gets Triple-Negative Breast Cancer?», 2014. [En ligne]. Available: http://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/trip_neg/who_gets.
- [25] Fondation Canadienne du Cancer du Sein, «Staging and Grading Breast Cancer», 2015. [En ligne]. Available: <http://www.cbcf.org/central/AboutBreastCancerMain/Diagnosis/Pages/StagingGrading.aspx>.
- [26] J. Meyer, C. Alvarez, C. Milikowski, N. Olson, I. Russo, J. Russo, A. Glass, B. Zehnbaauer, K. Lister, R. Parwaresch et C. B. C. T. Resource, «Breast carcinoma malignancy grading by Bloom-Richardson system vs proliferation index: reproducibility of grade and advantages of proliferation index,» *Modern Pathology*, vol. 18, n° 18, pp. 1067-1078, 2005.
- [27] I. Lizarraga, M. Schroeder, R. Weigel et A. Thomas, «Surgical Management of Breast Cancer in 2010-2011 SEER Registries by Hormone and HER2 Receptor Status,» *Annals of Surgical Oncology*, 2015.
- [28] Organisation du Cancer du Sein du Canada, «Treatments for Hormone-Receptor-Positive Breast Cancer», 2014. [En ligne]. Available: http://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/hormone_status/treatment_hrpos.
- [29] Société Canadienne du Cancer, «Hormonal Therapy for Breast Cancer», 2015. [En ligne]. Available: http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/breast/treatment/hormonal-therapy/?region=on#Anti_estrogens.
- [30] U.S. Food and Drug Administration, «Highlights of Prescribing Information - Nolvadex», 2003. [En ligne]. Available: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020541s024s0251bl.pdf. [Accès en 2015].
- [31] U.S. Food and Drug Administration, «Highlights of Prescribing Information - Arimidex», 2009. [En ligne]. Available: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020541s024s0251bl.pdf. [Accès en 2015].
- [32] K. Travis, «Anastrozole Data Show Continued Delay in Relapse, But No Clear Survival Advantage,» *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 97, n° 12, pp. 86-87, 2005.
- [33] U.S. Food and Drug Administration, «Highlights of Prescribing Information - Faslodex», 2011. [En ligne]. Available: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/021344s0151bl.pdf. [Accès en 2015].
- [34] A. D. Leo, G. Jerusalem, L. Petruzzelka, R. Torres, I. Bondarenko, R. Khasanov, D. Verhoeven, J. Pedrini, I. Smirnova, M. Lichinitser, K. Pendergrass, L. Malorni, S. Garnett, Y. Rukazenzov et M. Martin, «Final overall survival: fulvestrant 500 mg vs 250 mg in the randomized CONFIRM trial,» *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 106, n° 11, p. 337, 2014.
- [35] U.S. Food and Drug Administration, «Highlights of Prescribing Information - Zoladex», 2010. [En ligne]. Available: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020578s028s029s0301bl.pdf. [Accès en 2015].
- [36] A. Dixon, J. Robertson, L. Jackson, R. Nicholson, J. Walker et R. Blamey, «Goserelin (Zoladex) in premenopausal advanced breast cancer: duration of response and survival,» *British Journal of Cancer*, vol. 62, n° 15, pp. 868-870, 1990.

- [37] U.S. Food and Drug Administration, «Highlights of Prescribing Information», 2010. [En ligne]. Available: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103792s5250lbl.pdf. [Accès en 2015].
- [38] S. Dawood, K. Broglio, A. Buzdar, G. Hortobagyi et S. Giordano, «Prognosis of Women With Metastatic Breast Cancer by HER2 Status and Trastuzumab Treatment: An Institutional-Based Review,» *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, n° 11, pp. 92-98, 2009.
- [39] R. Nahta et F. Esteva, «HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance,» *Breast Cancer Research*, vol. 8, n° 16, p. 215, 2006.
- [40] J. Lambert et R. Chari, «Ado-trastuzumab Emtansine (T-DM1): An Antibody-drug conjugate (ADC) for HER2-positive breast cancer,» *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 57, n° 116, pp. 6949-6964, 2014.
- [41] S. Girish, M. Gupta, B. Wang, D. Lu, I. Krop, C. Vogel, H. Burris, P. LoRusso, J.-H. Yi, O. Saad, B. Tong, Y.-W. Chu, S. Holden et A. Joshi, «Clinical pharmacology of trastuzumab emtansine (T-DM1): an antibody–drug conjugate in development for the treatment of HER2-positive cancer,» *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 69, n° 15, pp. 1229-1240, 2012.
- [42] M. Barok, H. Joensuu et J. Isola, «Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance,» *Breast Cancer Research*, vol. 16, n° 12, p. 209, 2014.
- [43] M. Pedersen, H. Jacobsen, K. Koefoed, A. Dahlman, I. Kjaer, T. Poulsen, P. Meijer, L. Nielsen, I. Horak, J. Lantto et M. Kragh, «Targeting Three Distinct HER2 Domains with a Recombinant Antibody Mixture Overcomes Trastuzumab Resistance,» *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 14, n° 13, pp. 669-680, 2015.
- [44] C. Ceran, M. Cokol, S. Cingoz, I. Tasan, M. Ozturk et T. Yagci, «Novel anti-HER2 monoclonal antibodies: synergy and antagonism with tumor necrosis factor- α ,» *BioMed Central Cancer*, vol. 12, p. 450, 2012.
- [45] L. Amiri-Kordestani, S. Wedam, L. Zhang, S. Tang, A. Tilley, A. Ibrahim, R. Justice, R. Pazdur et P. Cortazar, «First FDA Approval of Neoadjuvant Therapy for Breast Cancer: Pertuzumab for the Treatment of Patients with HER2-Positive Breast Cancer,» *Clinical Cancer Research*, vol. 20, n° 121, pp. 5359-5364, 2014.
- [46] Société Américaine d'Oncologie Clinique, «Phase III MARIANNE Trial Results», 2015. [En ligne]. Available: <http://am.asco.org/phase-iii-marianne-trial-results>. [Accès en 2015].
- [47] U.S. Food and Drug Administration, «Highlights of Prescribing Information - Lapatinib», 2007. [En ligne]. Available: <https://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/promacta.pdf>. [Accès en 2015].
- [48] M. Untch et H.-J. Lückb, «Lapatinib – Member of a New Generation of ErbB-Targeting Drugs,» *Breast Care*, vol. 5, pp. 8-12, 2010.
- [49] Organisation du Cancer du Sein, «Research on New Treatment for Triple-Negative Breast Cancer», 2014. [En ligne]. Available: http://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/trip_neg/new_research. [Accès en 2015].
- [50] J. O'Shaughnessy, L. Schwartzberg, M. Danso, K. Miller, H. Rugo, M. Neubauer, N. Robert, B. Hellerstedt, M. Saleh, P. Richards, J. Specht, D. Yardley, R. Carlson, R. Finn, E. Charpentier, I. Garcia-Ribas et E. Winer, «Phase III study of iniparib plus gemcitabine and carboplatin versus gemcitabine and carboplatin in patients with metastatic triple-negative breast cancer,» *Journal of Clinical Oncology*, vol. 32, n° 134, pp. 3840-3847, 2014.
- [51] A. Pierce, P. McGowan, M. Cotter, M. Mullooly, N. O'Donovan, S. Rani, L. O'Driscoll, J. Crown et M. Duffy, «Comparative antiproliferative effects of iniparib and olaparib on a panel of triple-negative and non-triple-negative breast cancer cell lines,» *Cancer Biology & Therapy*, vol. 14, n° 16, pp. 537-545, 2013.

- [52] M. Telli, K. Jensen, S. Vinayak, A. Kurian, J. Lipson, P. Flaherty, K. Timms, V. Abkevich, E. Schackmann, I. Wapnir, R. Carlson, P. Chang, J. Sparano, B. Head, L. Goldstein, B. Haley, S. Dakhil, J. Reid, A. Hartman, J. Manola et J. Ford, «Phase II Study of Gemcitabine, Carboplatin, and Iniparib As Neoadjuvant Therapy for Triple-Negative and BRCA1/2 Mutation-Associated Breast Cancer With Assessment of a Tumor-Based Measure of Genomic Instability: PrECOG 0105,» *Journal of Clinical Oncology*, vol. 33, n° 117, pp. 1895-1901, 2015.
- [53] V. Guarneri, M. Dieci, G. Bisagni, C. Boni, K. Cagossi, F. Puglisi, A. Pecchi, F. Piacentini et P. Conte, «Preoperative Carboplatin-Paclitaxel-Bevacizumab in Triple-Negative Breast Cancer: Final Results of the Phase II Ca.Pa.Be Study,» *Annals of Surgical Oncology*, vol. 22, n° 19, pp. 2881-2887, 2015.
- [54] E. Chinchar, K. Makey, J. Gibson, F. Chen, S. Cole, G. Megason, S. Vijayakumar, L. Miele et J. Gu, «Sunitinib significantly suppresses the proliferation, migration, apoptosis resistance, tumor angiogenesis and growth of triple-negative breast cancers but increases breast cancer stem cells,» *Vascular Cell*, vol. 6, p. 12, 2014.
- [55] J. Curigliano, X. Pivot, J. Cortés, A. Elias, R. Cesari, R. Khosravan, M. Collier, X. Huang, P. Cataruzolo, K. Kern et A. Goldhirsch, «Randomized phase II study of sunitinib versus standard of care for patients with previously treated advanced triple-negative breast cancer,» *Breast*, vol. 22, n° 15, pp. 650-656, 2013.
- [56] T. Smith et R. Cheyne, «Predicting tumour response to anti-HER1 therapy using medical imaging: a literature review and in vitro study of [18F]-FDG incorporation by breast cancer cells responding to cetuximab,» *British Journal of Biomedical Science*, vol. 68, n° 13, pp. 158-166, 2011.
- [57] H. Nechushtan, G. Vainer, H. Stainberg, A. Salmon, T. Hamburger et T. Peretz, «A phase 1/2 of a combination of cetuximab and taxane for "triple negative" breast cancer patients,» *Breast*, vol. 23, n° 14, pp. 435-438, 2014.
- [58] O. Trédan, M. Campone, J. Jassem, R. Vyzula, B. Coudert, C. Pacilio, J. Prausova, A. Hardy-Bessard, A. Arance, P. Mukhopadhyay, A. Aloe et H. Roché, «Ixabepilone alone or with cetuximab as first-line treatment for advanced/metastatic triple-negative breast cancer,» *Clinical Breast Cancer*, vol. 15, n° 11, pp. 8-15, 2015.
- [59] Genentech, «HER2 dimerization: a key component of oncogenic signaling in HER2+ breast cancer», 2015. [En ligne]. Available: <http://www.biooncology.com/research-education/hdis/her2-dimerization/>.
- [60] Cell Signaling, «ErbB / HER Signaling Pathway», [En ligne]. Available: <http://www.cellsignal.com/contents/science-pathway-research-tyrosine-kinase/erbb-her-signaling-pathway/pathways-erbb>.
- [61] J. S. Rawlings, K. M. Rosler et D. A. Harrison, «The JAK/STAT signaling pathway,» *Cell Science*, vol. 117, pp. 1281-1283, 2004.
- [62] S. Pensa, G. Regis, D. Boselli, F. Novelli et V. Poli, «STAT1 and STAT3 in Tumorigenesis: Two Sides of the Same Coin?,» Madame Curie Bioscience Database, 2009. [En ligne]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6568/>.
- [63] R. Seger et E. Krebs, «The MAPK signaling cascade,» *International Wound Journal*, vol. 11, n° 14, pp. 345-346, 1995.
- [64] M. Karin, «How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex,» *Oncogene*, vol. 18, n° 149, pp. 6867-6874, 1999.
- [65] R&D Systems, «NFkB Pathway», 2015. [En ligne]. Available: http://www.rndsystems.com/molecule_group.aspx?g=1768.
- [66] N. Sergina, M. Rausch, D. Wang, J. Blair, B. Hann, K. Shokat et M. Moasser, «Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3,» *Nature*, vol. 445, n° 17126, pp. 437-441, 2007.
- [67] J. Cui, M. Zhang, Y.-Q. Zhang et Z.-H. Xu, «JNK pathway: diseases and therapeutic potential,» *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 28, n° 15, pp. 601-608, 2007.

- [68] A. Kelekar, B. Chang, J.E.Harlan, S. Fesik et C. Thompson, «Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL,» *Molecular and Cellular Biology*, vol. 17, n° 112, pp. 7040-7046, 1997.
- [69] D. Bank, «Identification - Trastuzumab,» 2005. [En ligne]. Available: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00072>.
- [70] J. Stagg, S. Loi, U. Divisekera, S. Ngiow, H. Duret, H. Yagita, M. Teng et M. Smyth, «Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy,» *PNAS*, vol. 108, n° 117, pp. 7142-7147, 2011.
- [71] A. Drucker, C. Skedgel, K. Virik, D. Rayson, M. Sellon et T. Younis, «The cost burden of trastuzumab and bevacizumab therapy for solid tumours in Canada,» *Current Oncology*, vol. 15, n° 13, pp. 136-142, 2008.
- [72] T. Omasa, M. Onitsuka et W. Kim, «Cell engineering and cultivation of chinese hamster ovary (CHO) cells,» *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 11, n° 13, 2010.
- [73] C. T. Scott, «Mice with a human touch,» *Nature Biotechnology*, vol. 25, pp. 1075-1077, 2007.
- [74] M. Bruggemann, «Human antibody expression in transgenic mice,» *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, vol. 49, n° 13, pp. 203-208, 2001.
- [75] J. Kim et H. Hong, «Humanization by CDR grafting and specificity-determining residue grafting,» *Methods in Molecular Biology*, vol. 907, pp. 237-245, 2012.
- [76] G. Rojas, A.Talavera, Y. Munoz, E. Rengifo, U. Krengel, J. Augström, J. Gavilondo et E. Moreno, «Light-chain shuffling results in successful phage display selection of functional prokaryotic-expressed antibody fragments to N-glycolyl GM3 ganglioside,» *Journal of Immunological Methods*, vol. 293, n° 11-2, pp. 71-83, 2004.
- [77] J. Albanell, J. Codony, A. Rovira, B. Mellado et P. Gascón, «Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4,» *Advances in experimental medicine and biology*, vol. 532, pp. 253-268, 2003.
- [78] G. Valabrega, F. Montemurro et M. Aglietta, «Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer,» *Annals of Oncology*, vol. 18, n° 16, pp. 977-984, 2007.
- [79] M. Milella, D. Trisciuglio, T. Bruno, L. Ciuffreda, M. Mottolise, A. Cianciulli, F. Cognetti, U. Zangemeister-Wittke, D. D. Bufalo et G. Zupi, «Trastuzumab Down-Regulates Bcl-2 Expression and Potentiates Apoptosis Induction by Bcl-2/Bcl-XL Bispecific Antisense Oligonucleotides in HER-2Gene-Amplified Breast Cancer Cells,» *Clinical Cancer Research*, vol. 10, n° 122, pp. 7747-7756, 2004.
- [80] UniProt Organization, «Apoptosis regulator Bcl-2,» 2015. [En ligne]. Available: <http://www.uniprot.org/uniprot/P10415>.
- [81] P. Yang, J. Peairs, R. Tano, N. Zhang, J. Tyrell et G. Jaffe, «Caspase-8-mediated apoptosis in human RPE cells,» *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 48, n° 17, pp. 3341-3349, 2007.
- [82] J. Wang, H. Chun, W. Wong, D. Spencer et M. Lenardo, «Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling,» *PNAS*, vol. 98, n° 124, pp. 13884-13888, 2001.
- [83] X. Jiang et X. Wang, «Cytochrome c Promotes Caspase-9 Activation by Inducing Nucleotide Binding to Apaf-1,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, n° 140, pp. 31199-31203, 2000.
- [84] A. Porter et R. Jänicke, «Emerging roles of caspase-3 in apoptosis,» *Nature Review*, vol. 6, n° 12, pp. 99-104, 1999.
- [85] L. Klapper, H. Waterman, M. Sela et Y. Yarden, «Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2,» *Cancer Research*, vol. 60, n° 113, pp. 3384-3388, 2000.
- [86] G. Alexe, G. Dalgin, D. Scandfeld, P. Tamayo, J. Mesirov, C. DeLisi, L. Harris, N. Barnard, M. Martel, A. Levine, S. Ganesan et G. Bhanot, «High Expression of Lymphocyte-Associated Genes in Node-Negative HER2+ Breast Cancers Correlates with Lower Recurrence Rates,» *Cancer Research*, vol. 67, n° 122, pp. 10669-10676, 2007.

- [87] C. Desmedt, B. Haibe-Kains, P. Wirapati, M. Buyse, D. Larsimont, G. Bontempi, M. Delorenzi, M. Piccart et C. Sotiriou, «Biological Processes Associated with Breast Cancer Clinical Outcome Depend on the Molecular Subtypes,» *Clinical Cancer Research*, vol. 14, n° 116, pp. 5158-5165, 2008.
- [88] S. Loi, S. Michiels, R. Salgado, N. Sirtaine, V. Jose, D. Fumagalli, P. Kellokumpu-Lehtinen, P. Bono, V. Kataja, C. Desmedt, M. Piccart, S. Loibl, C. Denkert, M. Smyth, H. Joensuu et C. Sotiriou, «Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial,» *Annals of Oncology*, vol. 25, n° 18, pp. 1544-1550, 2014.
- [89] R. Nahta et F. Esteva, «HER2 therapy: Molecular mechanisms of trastuzumab resistance,» *Breast Cancer Research*, vol. 8, n° 16, p. 215, 2006.
- [90] S. Zeisberger, B. Odermatt, C. Marty, A. Zehnder-Fjällman, K. Ballmer-Hofer et R. Schwendener, «Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach,» *British Journal of Cancer*, vol. 95, n° 13, pp. 272-281, 2006.
- [91] X. Wen, G. Yang, W. Mao, A. Thornton, J. Liu, J. R. Bast et X. Le, «HER2 signaling modulates the equilibrium between pro- and antiangiogenic factors via distinct pathways: implications for HER2-targeted antibody therapy,» *Oncogene*, vol. 25, n° 152, pp. 6986-6996, 2006.
- [92] S. Price-Schiavi, S. Jepson, P. Li, M. Arango, P. Rudland, L. Yee et K. Carraway, «Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance,» *International Journal of Cancer*, vol. 99, n° 16, pp. 783-791, 2002.
- [93] P. Nagy, E. Friedländer, M. Tanner, A. Kapanen, K. Carraway, J. Isola et T. Jovin, «Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line,» *Cancer Research*, vol. 65, n° 12, pp. 473-482, 2005.
- [94] K. Carraway, S. Price-Schiavi, M. Komatsu, S. Jepson, A. Perez et C. Carraway, «Muc4/sialomucin complex in the mammary gland and breast cancer,» *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol. 6, n° 13, pp. 323-337, 2001.
- [95] Y. Lu, X. Zi, Y. Zhao, D. Mascarenhas et M. Pollak, «Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin),» *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 93, n° 124, pp. 1852-1857, 2001.
- [96] R. Nahta, L. Yuan, B. Zhang, R. Kobayashi et F. Esteva, «Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells,» *Cancer Research*, vol. 65, n° 123, pp. 11118-11128, 2005.
- [97] Y. Lu, X. Zi et M. Pollak, «Molecular mechanisms underlying IGF-I-induced attenuation of the growth-inhibitory activity of trastuzumab (Herceptin) on SKBR3 breast cancer cells,» *International Journal of Cancer*, vol. 108, n° 13, pp. 334-341, 2004.
- [98] F. Yakes, W. Chinratanalab, C. Ritter, W. King, S. Seelig et C. Arteaga, «Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action,» *Cancer Research*, vol. 62, n° 114, pp. 4132-4141, 2002.
- [99] X. Le, F. Claret, A. Lammayot, L. Tian, D. Deshpande, R. LaPushin, A. Tari et R. J. Bast, «The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n° 126, pp. 23441-23450, 2003.
- [100] Y. Nagata, K. Lan, X. Zhou, M. Tan, F. Esteva, A. Sahin, K. Klos, P. Li, B. Monia, N. Nguyen, G. Hortobagyi, M. Hung et D. Yu, «PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients,» *Cancer Cell*, vol. 6, n° 12, pp. 117-127, 2004.

- [101] Y. Lin et G. Clinton, «A soluble protein related to the HER-2 proto-oncogene product is released from human breast carcinoma cells,» *Oncogene*, vol. 6, n° 14, pp. 639-643, 1991.
- [102] J. Zabrecky, T. Lam, S. McKenzie et W. Carney, «The extracellular domain of p185/neu is released from the surface of human breast carcinoma cells, SK-BR-3,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, n° 13, pp. 1716-1720, 1991.
- [103] S. Pupa, S. Ménard, D. Morelli, B. Pozzi, G. D. Palo et M. Colnaghi, «The extracellular domain of the c-erbB-2 oncoprotein is released from tumor cells by proteolytic cleavage,» *Oncogene*, vol. 8, n° 111, pp. 2917-2923, 1993.
- [104] T. Christianson, J. Doherty, Y. Lin, E. Ramsey, R. Holmes, E. Keenan et G. Clinton, «NH₂-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer,» *Cancer Research*, vol. 58, n° 122, pp. 5123-5129, 1998.
- [105] R. Colomer, S. Montero, A. Lluch, B. Ojeda, A. Barnadas, A. Casado, B. Massutí, H. Cortés-Funes et B. Lloveras, «Circulating HER2 extracellular domain and resistance to chemotherapy in advanced breast cancer,» *Clinical Cancer Research*, vol. 6, n° 16, pp. 2356-2362, 2000.
- [106] M. Molina, R. Sáez, E. Ramsey, M. Garcia-Barchino, F. Rojo, A. Evans, J. Albanell, E. Keenan, A. Lluch, J. García-Conde, J. Baselga et G. Clinton, «NH₂-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer,» *Clinical Cancer Research*, vol. 8, n° 12, pp. 347-353, 2002.
- [107] M. Molina, J. Codony-Servat, J. Albanell, F. Rojo, J. Arribas et J. Baselga, «Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells,» *Cancer Research*, vol. 61, n° 112, pp. 4744-4749, 2001.
- [108] F. Esteva, C. Cheli, H. Fritsche, M. Fornier, D. Slamon, R. Thiel, D. Luftner et F. Ghani, «Clinical utility of serum HER2/neu in monitoring and prediction of progression-free survival in metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab-based therapies,» *Breast Cancer Research*, vol. 7, n° 14, pp. 436-443, 2005.
- [109] W. Köstler, B. Schwab, C. Singer, R. Neumann, E. Rücklinger, T. Brodowicz, S. Tomek, M. Niedermayr, M. Hejna, G. Steger, M. Krainer, C. Wiltshcke et C. Zielinski, «Monitoring of serum Her-2/neu predicts response and progression-free survival to trastuzumab-based treatment in patients with metastatic breast cancer,» *Clinical Cancer Research*, vol. 10, n° 15, pp. 1618-1624, 2004.
- [110] P. Noel, L. Boise et C. Thompson, «Regulation of T cell activation by CD28 and CTLA4,» *Advances in Experimental Medicine & Biology*, vol. 406, pp. 209-217, 1996.
- [111] X. Wang, C. Zheng, R. Giscombe et A. Lefvert, «Regulation of surface and intracellular expression of CTLA-4 on human peripheral T cells,» *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 54, n° 15, pp. 453-458, 2011.
- [112] D. Pardoll, «The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy,» *Nature Review*, vol. 12, pp. 252-264, 2012.
- [113] J. Grosso et M. Jure-Kunkel, «CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research,» *Cancer Immunity*, vol. 13, p. 5, 2013.
- [114] R. Ji, S. Chasalow, L. Wang, O. Hamid, H. Schmidt, J. Cogswell, S. Alaparthi, D. Berman, M. Jure-Kunkel, N. Siemers, J. Jackson et V. Shahabi, «An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab,» *Cancer Immunology*, vol. 61, n° 17, pp. 1019-1031, 2012.
- [115] Y. Yang, J. Zou, J. Mu, R. Wijesuriya, S. Ono, T. Walunas, J. Bluestone, H. Fujiwara et T. Hamaoka, «Enhanced induction of antitumor T-cell responses by cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 blockade: the effect is manifested only at the restricted tumor-bearing stages,» *Cancer Research*, vol. 57, n° 118, pp. 4036-4041, 1997.

- [116] Institut National du Cancer, «FDA Approval for Ipilimumab», 2013. [En ligne]. Available: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-ipilimumab>. [Accès en 2015].
- [117] H. Jin, R. Ahmed et T. Okazaki, «Role of PD-1 in regulating T-cell immunity,» *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 350, pp. 17-37, 2011.
- [118] J. He, Y. Hu, M. Hu et B. Li, «Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer,» *Scientific Reports*, 2015.
- [119] R. Wong, R. Scotland, R. Lau, C. Wang, A. Korman, W. Kast et J. Weber, «Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs,» *International Immunology*, vol. 19, n° 110, pp. 1223-1234, 2007.
- [120] M. Callahan et J. Wolchok, «At the Bedside: CTLA-4- and PD-1-blocking antibodies in cancer immunotherapy,» *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 94, n° 12, pp. 41-53, 2013.
- [121] U.S. Food and Drug Administration, «FDA expands approved use of Opdivo in advanced lung cancer», 2015. [En ligne]. Available: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm466413.htm>. [Accès en 2015].
- [122] E. Bozeman, S. He, Y. Shafizadeh et P. Selvaraj, «Therapeutic efficacy of PD-L1 blockade in a breast cancer model is enhanced by cellular vaccines expressing B7-1 and glycolipid-anchored IL-12,» *Human Vaccines & Therapeutics*, 2015.
- [123] B. Dai, L. Xiao, P. Bryson, J. Fang et P. Wang, «PD-1/PD-L1 Blockade Can Enhance HIV-1 Gag-specific T Cell Immunity Elicited by Dendritic Cell-Directed Lentiviral Vaccines,» *Molecular Therapy*, vol. 20, n° 19, pp. 1800-1809, 2012.
- [124] P. Wendling, «PD-L1 blockade breaks through triple-negative breast cancer,» *Oncology Practice*, 2015. [En ligne]. Available: <http://www.oncologypractice.com/home/article/pd-l1-blockade-breaks-through-triple-negative-breast-cancer/1f4ecfbf59461d0174241558706def90.html>. [Accès en 2015].
- [125] T. Mogensen, «Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses,» *Clinical Microbiology Review*, vol. 22, n° 12, pp. 240-273, 2009.
- [126] T. Kawai et S. Akira, «The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors,» *Nature Immunology*, vol. 11, n° 15, pp. 373-384, 2010.
- [127] Y. Shirota, H. Shirota et D. Klinman, «Intratumoral injection of CpG oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells,» *Journal of Immunology*, vol. 188, n° 14, pp. 1592-1599, 2012.
- [128] R. Dearman, M. Cumberbatch, G. Maxwell, D. Basketter et I. Kimber, «Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells,» *Immunology*, vol. 126, n° 14, pp. 475-484, 2009.
- [129] A. Koch, S. Kunkel, L. Harlow, D. Mazarakis, G. Haines, M. Burdick, R. Pope et R. Strieter, «Macrophage inflammatory protein-1 alpha. A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis,» *Journal of Clinical Investigation*, vol. 93, n° 13, pp. 921-928, 1994.
- [130] National Center for Biotechnology and Information, «CCL5 chemokine (C-C motif) ligand 5 [Homo sapiens (human)]», 2015. [En ligne]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=6352>. [Accès en 2015].
- [131] Centre National de Biotechnologie et Information, «CXCL10 chemokine (C-X-C motif) ligand 10 [Homo sapiens (human)]», 2015. [En ligne]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3627>. [Accès en 2015].
- [132] G. Forte, A. Rega, S. Morello, A. Luciano, C. Arra, A. Pinto et R. Sorrentino, «Polyinosinic-polycytidylic acid limits tumor outgrowth in a mouse model of metastatic lung cancer,» *Journal of Immunology*, vol. 188, n° 111, pp. 5357-5364, 2012.

- [133] M. Salem, C. Diaz-Montero, Y. Chen, S. EL-Naggar, A. Kadima, W. Gillanders et D. Cole, «The TLR3 agonist poly (I:C) acted directly on mouse CD8 T cells and augmented their antigen-specific responses upon adoptive transfer into naïve recipient mice,» *Journal of Immunology*, vol. 178, 2007.
- [134] J. Zimmer, *Natural Killer Cells: At the Forefront of Modern Immunology*, Springer Science & Business Media, 2010, p. 14.
- [135] K. Schmidt, B. Leung, M. Kwong, K. Zarembek, S. Satyal, T. Navas, F. Wang et P. Godowski, «APC-Independent Activation of NK Cells by the Toll-Like Receptor 3 Agonist Double-Stranded RNA,» *Journal of Immunology*, vol. 172, n° 11, pp. 138-143, 2004.
- [136] C. Nicodemus, L. Wang, J. Lucas, B. Varghese et J. Berek, «Toll-like receptor-3 as a target to enhance bioactivity of cancer immunotherapy,» *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 202, n° 16, p. 608, 2010.
- [137] B. Salaun, L. Zitvogel, C. Asselin-Paturel, Y. Morel, K. Chemin, C. Dubois, C. Massacrier, R. Conforti, M. Chenard, J. Sabourin, A. Goubar, S. Lebecque, M. Pierres, D. Rimoldi, P. Romero et F. Andre, «TLR3 as a biomarker for the therapeutic efficacy of double-stranded RNA in breast cancer,» *Cancer Research*, vol. 71, n° 15, pp. 1607-1614, 2011.
- [138] P. Forghani et E. Waller, «Poly (I: C) modulates the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells in a murine model of breast cancer,» *Breast Cancer Research & Treatment*, vol. 153, n° 11, pp. 21-30, 2015.
- [139] X. Zhao, M. Ai, Y. Guo, X. Zhou, L. Wang, X. Li et C. Yao, «Poly I:C-induced tumor cell apoptosis mediated by pattern-recognition receptors,» *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, vol. 27, n° 19, pp. 530-534, 2012.
- [140] X.-Q. Qin, N. Tao, A. Dergay, P. Moy, S. Fawell, A. Davis, J. Wilson et J. Barsoum, «Interferon- β gene therapy inhibits tumor formation and causes regression of established tumors in immune-deficient mice,» *PNAS*, vol. 95, n° 124, p. 14411–14416, 1998.
- [141] A. Krieg, «Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer,» *Oncogene Review*, vol. 27, n° 12, pp. 161-167, 2008.
- [142] S. Sivori, M. Falco, M. D. Chiesa, S. Carlomagno, M. Vitale, L. Moretta et A. Moretta, «CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: Induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells,» *PNAS*, vol. 101, n° 127, pp. 10116-10121, 2004.
- [143] B. Jahrsdörfer et G. Weiner, «CpG oligodeoxynucleotides as immunotherapy in cancer,» *Update on Cancer Therapeutics*, vol. 3, n° 11, pp. 27-32, 2008.
- [144] A. Krieg, «Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer,» *Oncogene*, vol. 27, pp. 161-167, 2008.
- [145] P. Olbert, A. Schrader, C. Simon, A. Dalpke, P. Barth, R. Hofmann et A. Hegele, «In vitro and in vivo effects of CpG-Oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) on murine transitional cell carcinoma and on the native murine urinary bladder wall,» *Anticancer Research*, vol. 29, n° 16, pp. 2067-2076, 2009.
- [146] Y. Zhang, A. Lin, C. Zhang, Z. Tian et J. Zhang, «Phosphorothioate-modified CpG oligodeoxynucleotide (CpG ODN) induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells independent of TLR9,» *Cancer Immunology*, vol. 63, n° 14, pp. 357-367, 2014.
- [147] M. Ruan, K. Thorn, S. Liu, S. Li, W. Yang, C. Zhang et C. Zhang, «The secretion of IL-6 by CpG-ODN-treated cancer cells promotes T-cell immune responses partly through the TLR-9/AP-1 pathway in oral squamous cell carcinoma,» *International Journal of Immunology*, vol. 44, n° 16, pp. 2103-2110, 2014.
- [148] B. Ghazi, N. Thonnart, M. Bagot, A. Bensussan et A. Marie-Cardine, «KIR3DL2/CpG ODN Interaction Mediates Sézary Syndrome Malignant T Cell Apoptosis,» *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 135, pp. 229-237, 2014.
- [149] R. Arsenault, M. Kogut et H. He, «Combined CpG and poly I:C stimulation of monocytes results in unique signaling activation not observed with the individual ligands,» *Cell Signaling*, vol. 25, n° 111, pp. 2246-2254, 2013.

- [150] T. Ghosh, D. Mickelson, J. Solberg, K. Lipson, J. Inglefield et S. Alkan, «TLR-TLR cross talk in human PBMC resulting in synergistic and antagonistic regulation of type-1 and 2 interferons, IL-12 and TNF-alpha,» *International Pharmacology*, vol. 7, n° 18, pp. 1111-1121, 2007.
- [151] D. Kim et S. Niewiesk, «Synergistic Induction of Interferon α through TLR-3 and TLR-9 Agonists Identifies CD21 as Interferon α Receptor for the B Cell Response,» *PLOS Pathogens*, vol. 9, n° 13, 2013.
- [152] D. Tross, L. Petrenko, S. Klaschik, Q. Zhu et D. Klinman, «Global changes in gene expression and synergistic interactions induced by TLR9 and TLR3,» *Molecular Immunology*, vol. 46, n° 113, pp. 2557-2564, 2009.
- [153] S. Mohibi, S. Mirza et V. Band, «Mouse models of estrogen receptor-positive breast cancer,» *Journal of Carcinogenesis*, vol. 10, p. 35, 2011.
- [154] P. Taneja, D. Frazier et K. Inoue, «MMTV mouse models and the diagnostic values of MMTV-like,» *National Institute of Health*, vol. 9, n° 15, pp. 423-440, 2009.
- [155] P. Taneja, D. Frazier, R. Kendig, D. Maglic, T. Sugiyama, F. Kai, N. Taneja et K. Inoue, «MMTV mouse models and the diagnostic values of MMTV-like sequences in human breast cancer,» *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 9, n° 15, pp. 423-440, 2009.
- [156] J. Stagg, J. Sharkey, S. Pommey, R. Young, K. Takeda, H. Yagita, R. Johnstone et M. Smyth, «Antibodies targeted to TRAIL receptor-2 and ErbB-2 synergize in vivo and induce an antitumor immune response,» *PNAS*, vol. 105, n° 142, pp. 16254-16259, 2008.
- [157] Institut National du Cancer, «Cell Lines - Model : BALB-neuT», 2013. [En ligne]. Available: https://cancermodels.nci.nih.gov/camod/ViewModelAction.do?unprotected_method=populateCellLines&aModelID=448. [Accès en 2015].
- [158] Affymetrix, «Cancer cell isolation kit», 2015. [En ligne]. Available: http://www.affymetrix.com/catalog/prod660071/USB/Cancer+Cell+Isolation+Kit#1_1.
- [159] S. Watkins, Z. Zhu, K. Watkins et A. Hurwitz, «Isolation of Immune Cells from Primary Tumors,» *Journal of Visualized Experiments*, vol. 64, p. 3952, 2012.
- [160] C. Horlock, B. Stott, P. Dyson, M. Morishita, R. Coombes, P. Savage et J. Stebbing, «The effects of trastuzumab on the CD4+CD25+FoxP3+ and CD4+IL17A+ T-cell axis in patients with breast cancer,» *British Journal of Cancer*, vol. 100, n° 17, pp. 1061-1067, 2009.
- [161] F. Jadidi-Niaragh et A. Mirshafiey, «Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis,» *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 74, n° 11, pp. 1-13, 2011.
- [162] D. Betting, E. Yamada, K. Kafi, J. Said, N. v. Rooijen et J. Timmerman, «Intratumoral but not systemic delivery of CpG oligodeoxynucleotide augments the efficacy of anti-CD20 monoclonal antibody therapy against B cell lymphoma,» *Journal of Immunotherapy*, vol. 32, n° 16, pp. 622-631, 2009.
- [163] J. Schettini, A. Kidiyoor, D. Besmer, T. Tinder, L. Roy, J. Lustgarten, S. Gendler et P. Mukherjee, «Intratumoral delivery of CpG-conjugated anti-MUC1 antibody enhances NK cell anti-tumor activity,» *Cancer Immunology*, vol. 61, n° 111, pp. 2055-2065, 2012.
- [164] A. Theofilopoulos et C. Bona, *The Molecular Pathology of Autoimmune Diseases*, CRC Press, 2002, p. 187.
- [165] C.-Y. Jiao, D. Delaroché, F. Burlina, I. Alves, G. Chassaing et S. Sagan, «Translocation and Endocytosis for Cell-penetrating Peptide Internalization,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, n° 149, p. 33957-33965, 2009.

- [166] S. Nierkens, M. d. Brok, Z. Garcia, S. Togher, J. Wagenaars, M. Wassink, L. Boon, T. Ruers, C. Figdor, S. Schoenberger, G. Adema et E. Janssen, «Immune adjuvant efficacy of CpG oligonucleotide in cancer treatment is founded specifically upon TLR9 function in plasmacytoid dendritic cells,» *Cancer Research*, vol. 71, n° 120, pp. 6428-6437, 2011.
- [167] M. Terlizzi, A. Popolo, A. Pinto et R. Sorrentino, «Plasmacytoid dendritic cells contribute to doxorubicin-induced tumor arrest in a mouse model of pulmonary metastasis,» *Journal of Immunotherapy*, vol. 37, n° 14, pp. 214-224, 2014.
- [168] B. Gungor, F. Yagci, G. Tincer, B. Bayyurt, E. Alpdundar, S. Yildiz, M. Ozcan, I. Gursel et M. Gursel, «CpG ODN nanorings induce IFN α from plasmacytoid dendritic cells and demonstrate potent vaccine adjuvant activity,» *Science Translational Medicine*, vol. 6, n° 1235, pp. 235-261, 2014.
- [169] C. Fujimoto, Y. Nakagawa, K. Ohara et H. Takahashi, «Polyriboinosinic polyribocytidylic acid [poly(I:C)]/TLR3 signaling allows class I processing of exogenous protein and induction of HIV-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes,» *International Immunology*, vol. 16, n° 11, pp. 55-63, 2004.
- [170] J. Vollmer, R. Weeratna, P. Payette, M. Jurk, C. Schetter, M. Laucht, T. Wader, S. Tluk, M. Liu, H. Davis et A. Krieg, «Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities,» *European Journal of Immunology*, vol. 34, n° 11, pp. 251-262, 2004.
- [171] S. Sivori, S. Carlomagno, L. Moretta et A. Moretta, «Comparison of different CpG oligodeoxynucleotide classes for their capability to stimulate human NK cells,» *European Journal of Immunology*, vol. 36, n° 14, pp. 961-967, 2006.
- [172] L. Sfondrini, M. Sommariva, M. Tortoreto, A. Meini, S. Piconese, M. Calvaruso, N. V. Rooijen, R. Bonecchi, N. Zaffaroni, M. Colombo, E. Tagliabue et A. Balsari, «Anti-tumor activity of CpG-ODN aerosol in mouse lung metastases,» *International Journal of Cancer*, vol. 133, n° 12, pp. 383-393, 2013.
- [173] J. Rodriguez, J. Marchicio, M. López, A. Ziblat, F. Elias, J. Fló, R. López, D. Horn, J. Zorzopulos et A. Montaner, «PyNTTTTGT and CpG Immunostimulatory Oligonucleotides: Effect on Granulocyte/Monocyte Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Secretion by Human CD56⁺ (NK and NKT) Cells,» *PLoS One*, vol. 10, n° 12, 1015.
- [174] K. Gorski, E. Waller, J. Bjornton-Severson, J. Hanten, C. Riter, W. Kieper, K. Gorden, J. Miller, J. Vasilakos, M. Tomai et S. Alkan, «Distinct indirect pathways govern human NK-cell activation by TLR-7 and TLR-8 agonists,» *International Immunology*, vol. 18, n° 17, pp. 1115-1126, 2006.
- [175] T. Thornley, N. Phillips, B. Beaudette-Zlatanova, T. Markees, K. Bahl, M. Brehm, L. Shultz, E. Kurt-Jones, J. Mordes, R. Welsh, A. Rossini et D.L.Greiner, «Type 1 IFN Mediates Cross-Talk between Innate and Adaptive Immunity That Abrogates Transplantation Tolerance,» *Journal of Immunology*, vol. 179, n° 110, pp. 6620-6629, 2007.
- [176] P. Lacy et J. Stow, «Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways,» *Blood*, vol. 118, n° 11, pp. 9-18, 2011.
- [177] J. Vollmer, R. Weeratna, P. Payette, M. Jurk, C. Schetter, M. Laucht, T. Wader, S. Tluk, M. Liu, H. Davis et A. Krieg, «Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities,» *European Journal of Immunology*, vol. 34, n° 11, pp. 251-262, 2004.
- [178] G. Lipford, S. Bendigs, K. Heeg et H. Wagner, «Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines,» *Immunology*, vol. 101, n° 11, pp. 46-52, 2000.
- [179] S. Ostrand-Rosenberg et P. Sinha, «Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer,» *Journal of Immunology*, vol. 182, n° 18, pp. 4499-4506, 2009.

- [180] H. Klinman et D. Shirota, «Effect of CpG ODN on monocytic myeloid derived suppressor cells,» *OncImmunology*, vol. 1, n° 15, pp. 780-782, 2012.
- [181] A. Khoder et a. al., «Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD,» *Blood*, vol. 124, n° 113, pp. 2034-2045, 2014.
- [182] Y. Zhang, R. Morgan, E. Podack et J. Rosenblatt, «B cell regulation of anti-tumor immune response,» *Immunologic Research*, vol. 57, n° 11-3, pp. 115-124, 2013.
- [183] S. Garaud, L. Buisseret, C. Gu-Trantien, J. Lodewyckx, H. Duvillier, L. Craciun, D. Larsimont et K. Willard-Gallo, «Characterization of B Cells Infiltrating Human Breast Cancer,» *Cancer Research*, vol. 75, 2014.
- [184] B. Nelson, «CD20+ B Cells: The Other Tumor-Infiltrating Lymphocytes,» *Journal of Immunology*, vol. 185, n° 19, pp. 4977-4982, 2010.
- [185] Z. Li, J. Jang, M. Lechner, P. Hu, L. Khawli, C. Scannell et A. Epstein, «Generation of tumor-targeted antibody-CpG conjugates,» *Journal of Immunological Methods*, vol. 389, n° 11-2, pp. 45-51, 2013.
- [186] J. Schettini, A. Kidiyoor, D. Besmer, T. Tinder, L. Roy, J. Lustgarten, S. Gendler et P. Mukherjee, «Intratumoral delivery of CpG-conjugated anti-MUC1 antibody enhances NK cell anti-tumor activity,» *Cancer Immunology*, vol. 61, n° 111, pp. 2055-2065, 2012.

Annexe 1. Figures supplémentaires

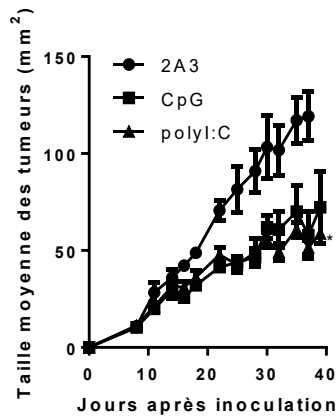


Fig.Sup.1. Les deux agonistes sont nécessaires afin d'obtenir un effet maximal sur la croissance des tumeurs. Les cellules TUBO furent injectées dans des souris Balb/c WT puis traitées aux jours 8, 11, 15 et 18 avec un des suivants: 100 µg d'Ig contrôle (2A3), 25 µg de CpG ODN ou 25 µg de polyI:C. Les données représentées sont les moyennes ± SEM. n = 4 pour chaque groupe.

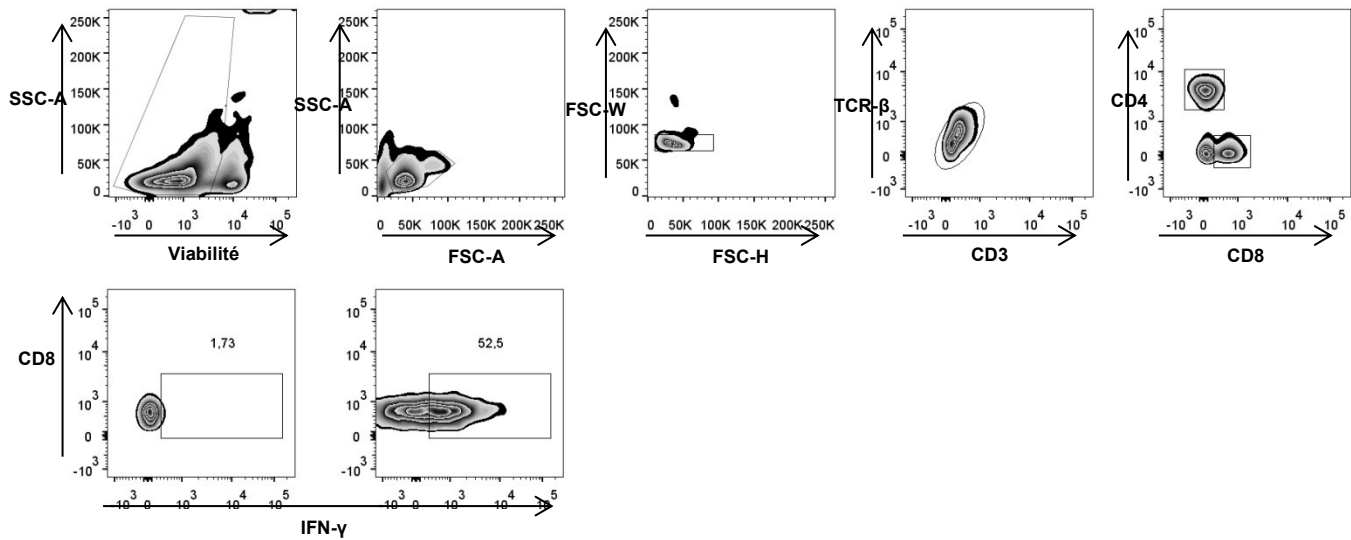


Fig.Sup.2. Stratégie employée lors de l'analyse des cellules T CD8+ produisant de l'IFN-γ. En ordre, les barrières incluent les cellules vivantes, les leucocytes, les cellules simples, les lymphocytes, les cellules T CD8+ et IFN-γ+.

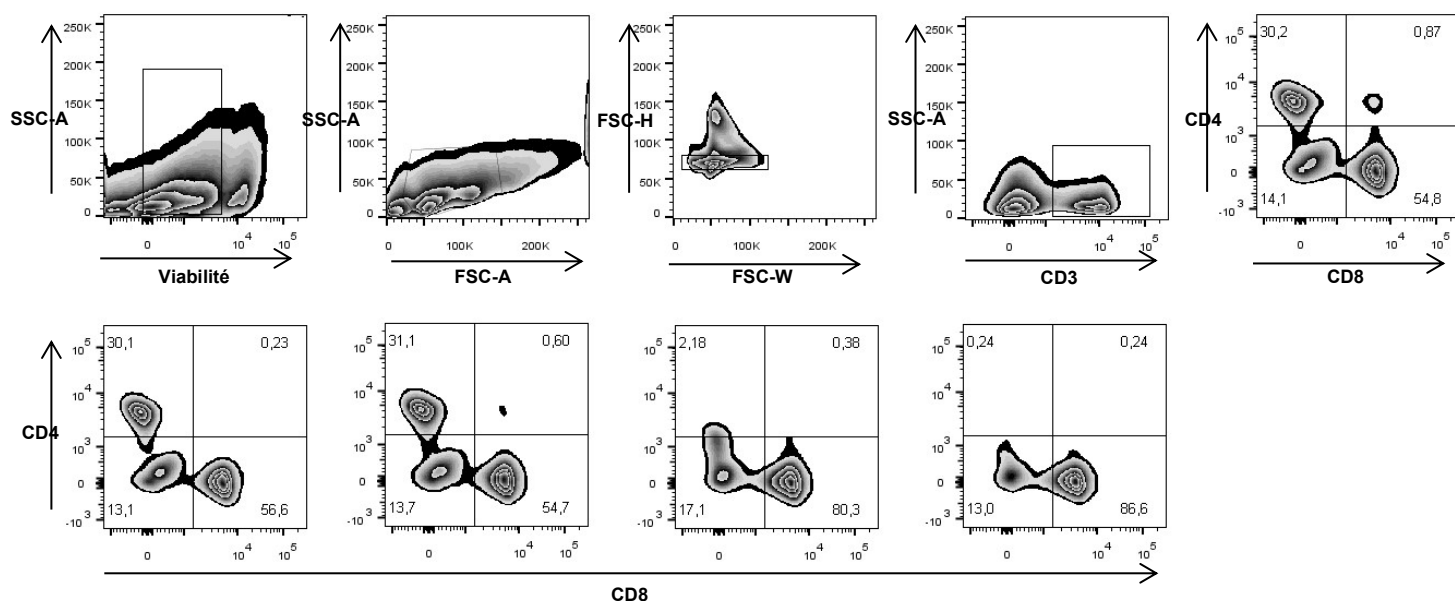


Fig.Sup.3. Stratégie employée lors de la confirmation des dépletions, ici suite à l'usage de l'anti-CD8 β . En ordre, les barrières incluent: les cellules vivantes, les leucocytes, les cellules simples, les cellules CD3+ et les cellules CD8+. Les trois premiers graphiques ont été obtenus à partir de rates de souris WT, alors que les deux derniers ont été obtenus à partir de rates de souris immunodprimées.

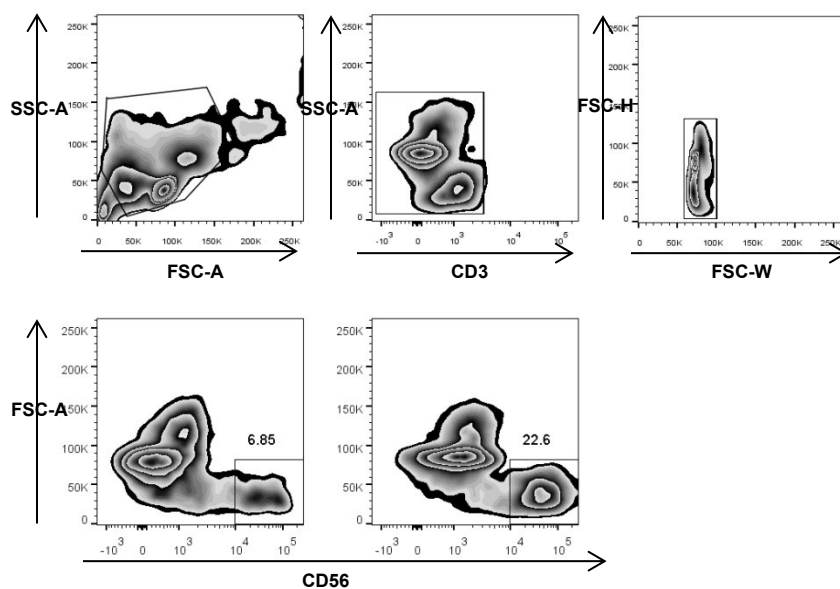


Fig.Sup.4. Stratégie employée lors de la confirmation de la viabilité et de la pureté des cellules NK suite à l'enrichissement. En ordre, les barrières incluent: les leucocytes, les cellules vivantes, les cellules simples et les cellules CD56+. Le graphique gauche du bas illustre les PBMC après purification, alors que le droit illustre les cellules NK suite à leur enrichissement.

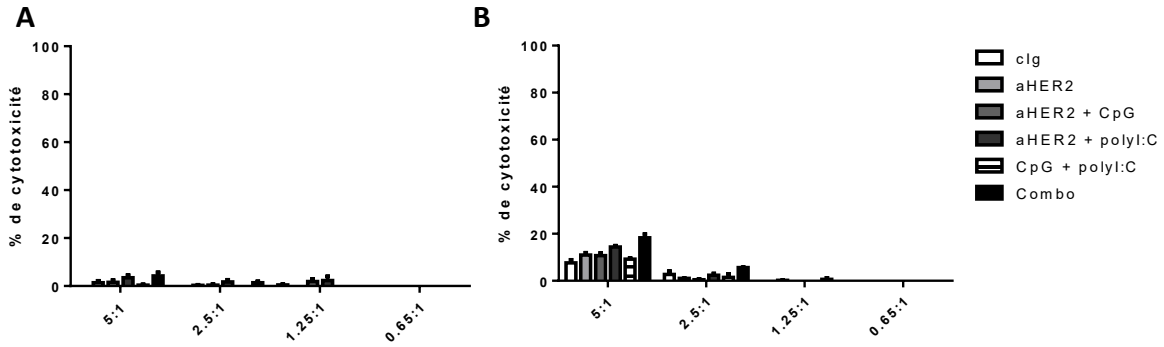


Fig.Sup.5. La stimulation *in vitro* des PBMC, dont les cellules NK ont été retirées, avec l'anti-HER2 et le CpG/polyI:C induit peu d'activité cytotoxique. Les cellules furent mises en culture 4 heures avec des cellules SK-BR-3 (A) ou BT-474 (B) à un ratio de 5:1, 2.5:1, 1.25:1 ou 0.65:1, ainsi qu'avec un des suivants: aucun anticorps, l'anti-HER2 (5 µg/ml), l'anti-HER2 et le CpG ODN (5 µg/ml), l'anti-HER2 et le polyI:C (5 µg/ml) ou encore tous les agents. Les données représentées sont les moyennes ± SEM. n = 4 pour chaque condition.

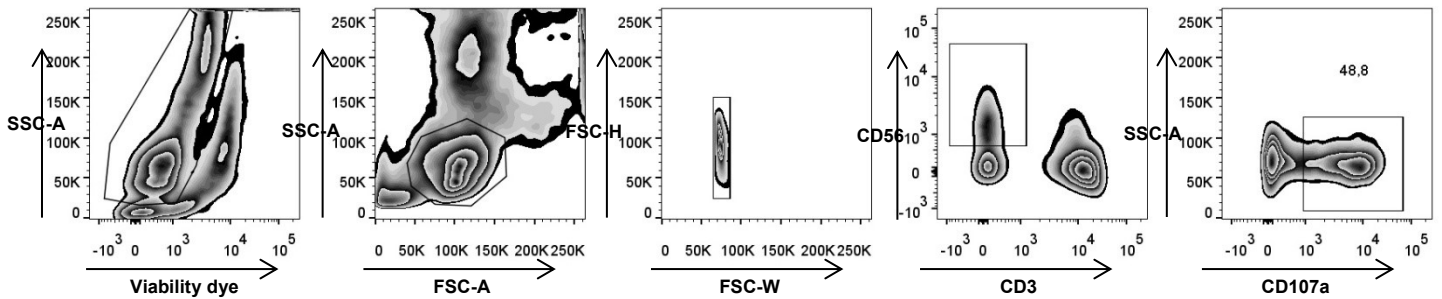


Fig.Sup.5. Stratégie employée lors de l'analyse des cellules NK en dégranulation. En ordre, les barrières incluent: les cellules vivantes, les leucocytes, les cellules simples, les cellules CD3- CD56+ et CD107a+.

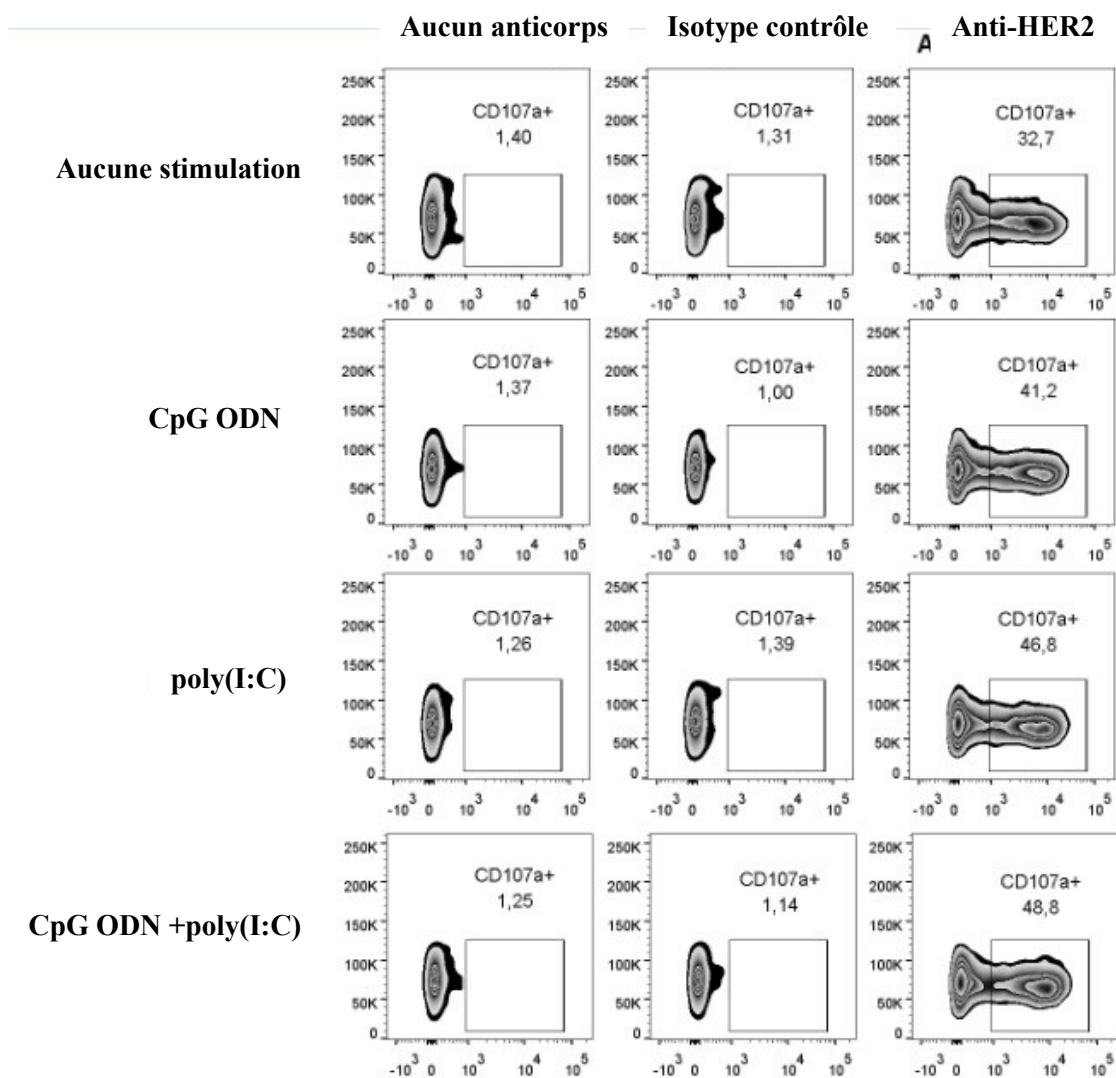


Fig.Sup.6. La stimulation *in vitro* de PBMCs avec l'anti-HER2 et le CpG/polyI:C induit de plus hauts niveaux de dégranulation chez les cellules NK. Des PBMCs humains furent mis en culture 4 heures avec des cellules BT-474 à un ratio de 10:1. 5:1. 2.5:1. 1.25:1 ou 0.65:1, ainsi qu'avec un des suivants: aucun anticorps, l'anti-HER2 (5 µg/ml), l'anti-HER2 et le CpG ODN (5 µg/ml), l'anti-HER2 avec le polyI:C (5 µg/ml) ou encore tous les agents. Les données représentées sont les moyennes ± SEM. $n = 4$ pour chaque condition. (***) $p=0.0001$ vs. anti-HER2; (***) $p=0.0004$ vs. anti-HER2; (*) $p=0.0189$ vs. anti-HER2; (*) $p=0.0362$ vs. anti-HER2)

