

L'adénovirus canin comme vecteur vaccinal recombinant et ses interactions avec des sous-populations de cellules dendritiques lymphatiques ovines

Céline Urien

► **To cite this version:**

Céline Urien. L'adénovirus canin comme vecteur vaccinal recombinant et ses interactions avec des sous-populations de cellules dendritiques lymphatiques ovines. Microbiologie et Parasitologie. 2011. <hal-01482731>

HAL Id: hal-01482731

<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01482731>

Submitted on 3 Mar 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la Vie et de la terre

MEMOIRE

Présenté par

Céline URIEN

Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

L'adénovirus canin comme vecteur vaccinal recombinant
et ses interactions avec des sous-populations de cellules
dendritiques lymphatiques ovines

Soutenu le 19 Octobre 2011

devant le jury suivant :

MCF Frederick Arnaud	Président
Dr Isabelle Schwartz-Cornil	Tuteur scientifique
Pr Bruno Canque	Tuteur pédagogique
Dr Vitour Damien	Rapporteur
Dr Sandra Olivier	Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Isabelle SCHWARTZ-CORNIL

Centre de Recherche INRA -Virologie et Immunologie Moléculaire
Domaine de Vilvert
78352 Jouy-en-Josas
isabelle.schwartz@jouy.inra.fr

Et de

Pr Bruno Canque

Laboratoire Développement du Système Immunitaire de l'Ecole Pratique des
Hautes Etudes

INSERM U944 et UMR Paris7/CNRS 7212

Institut Universitaire d'Hématologie (IUH) - Centre Hayem,

1 avenue Claude Vellefaux 75475 Paris cedex 10, France

bruno.canque@gmail.com

RESUME

Les adénovirus canins sont les adénovirus non primates les plus étudiés pour la vaccination et la thérapie génique, en particulier l'adénovirus canin de sérotype 2 (Cav2). Il a été démontré que le Cav2 déficient (Cav2-d) ne paraît pas capable de transduire efficacement les cellules dendritiques (CD) humaines dérivées de monocytes *in vitro*, ni de les activer, laissant présager sa faible immunogénicité. Cependant, dans une étude récente, l'utilisation d'un Cav2-d exprimant la glycoprotéine G de la rage a mis en évidence l'induction d'une bonne réponse immunitaire spécifique chez le mouton et chez la souris (Bouet-Cararo et al. 2011). Dans notre étude, nous démontrons que le Cav2-d codant pour des antigènes du virus de la bluetongue (BTV) induit une forte réponse spécifique des lymphocytes T CD8⁺, et à un degré moindre une réponse spécifique des lymphocytes T CD4⁺. Nous démontrons qu'il transduit *in vitro* les cellules lymphatiques ovines drainant la peau avec un tropisme préférentiel pour les CD classiques (CDc). Malgré le faible taux de transduction (<5%), nous démontrons qu'il active l'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 ainsi que l'expression de gènes codant l'IL12, l'IL-1 β , l'IL-2 et le TNF α . Les CD de la lymphe cutanée incluent 2 sous-populations majeures, les CD CD26⁺ et CD CD26⁻ : les CD CD26⁺ sont les plus efficaces pour l'induction d'une réponse T CD8⁺ à des antigènes endocytés. Nous démontrons que le Cav2-d transduit préférentiellement la sous-population de CD CD26⁺ ; par contre il induit une réponse transcriptomique associée à des signatures de gènes plus fortement impliqués dans la mise en place de la réponse immunitaire par la sous population de CD CD26⁻. Certains de ces gènes sont inclus dans la signature prédictive de l'efficacité de la vaccination anti-fièvre jaune chez l'homme, tels STK17A, JUN, BIRC3, C1QB, la famille des transporteurs de solutés et BAFF (Querec 2009). Ainsi, dans ce travail, nous démontrons que le Cav2-d induit *in vitro* un « profil génique d'immunogénicité » principalement dans un type particulier de CD dérivées de la peau ovine, les CD CD26⁻, ce qui ouvre la voie à l'évaluation de l'efficacité vaccinale par des méthodes *in vitro*. Cette approche pourrait être très informative si elle était

transposée à d'autres types d'adénovirus, chez d'autres espèces et à d'autres types de vaccins.

MOTS CLES : ovin – cellules dendritiques – adénovirus canin – transcriptomie - vaccin – puce à ADN

SOMMAIRE

INTRODUCTION

1. Les mécanismes de l'immunogénicité des vaccins

1.1. Les acteurs cellulaires

1.1.1. La présentation antigénique par les CPA

1.1.1.1. La présentation CMH I directe et croisée et l'induction des lymphocytes T CD8⁺

1.1.1.1. La présentation CMH II et l'induction des lymphocytes T CD4⁺

1.1.1. Les CD et leurs sous-populations

1.1.1. L'activation des CD par les vaccins et leurs adjuvants

1.1.1.1. Les adjuvants à effet indirect sur la CD

1.1.1.1. Les ligands de TLR

1.1.1.1. Les virus recombinants

1.1.1.1. Méthodes d'avenir

1.1.1. Les effecteurs

1.1.1.1. Les lymphocytes T *helper*

1.1.1.1. Les lymphocytes cytotoxiques

1.1.1.1. Les lymphocytes B producteurs d'anticorps

1.1. La signature transcriptomique

1. Les vecteurs adénovirus

1.1. Organisation et structure des adénovirus

1.1.1. Structure des adénovirus

1.1.1. Les adénovirus humains du sous groupe C et B

1.1.1. Les adénovirus canins

1.1. Utilisation vaccinale des adénovirus

1.1. Interaction des adénovirus avec les CD

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP	Analyse en Composante Principale
AdHu	Adénovirus Humain
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
ADNc	Acide DesoxyriboNucléique complémentaire
ANOVA	ANalysis Of VAriance
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein
Batf-3	BAsic leucine zipper Transcription Factor, ATF-like 3
BCL6	B Cell Lymphoma-6
BCR	B Cell Receptor
BDCA	Blood Dendritic Cells Antigen
BTV	BlueTongue Virus
CADM1	Cell Adhesion Molecule 1
CAR	Coxsackie and Adenovirus Receptor
Caspases	Cysteine-ASPartic proteASES
Cav	Adénovirus Canin
Cav2-d	Adénovirus Canin de sérotype 2 <i>défectif</i>
CCL	CC-Chemokine Ligand
CCR	CC-Chemokine Recepteur
CD	Cellules Dendritiques
CDc	Cellules Dendritiques classiques
CDinf	Cellules Dendritiques inflammatoires
CDmig	Cellules Dendritiques migrantes
CDres	Cellules Dendritiques résidentes
CEACAM	CarcinoEmbryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule
CFB	Complement Factor B
Clec9-A	C type lectin domain family 9, member A
CLIP	Class II-associated li Peptide
CMH I et II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I et II
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigènes
CpG-ODN	CpG OligoDeoxyNucleotides
CRTAM	Class I-restricted T cell-Associated Moelcule
CTL	Cyto Toxique Lymphocyte

CXCL	CXC-chemokine Ligand
CXCR	CXC-chemokine Receptor
DCIR2	Dendritic Cell Inhibitory Receptor-2
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Nonintegrin
DNase	DeoxyriboNuclease
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
Flt-3L	FMS-like tyrosine kinase 3 Ligand
FOXP3	Forklead box P3
GFP	Green Fluorescent Protein
Gr-1	Granulocyte antigen 1
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Histocompatibility Leukocyte Antigen
Id2	Inhibitor of DNA binding 2
IFN-I	InterFeroN type I
Ig	Immunoglobuline
IL	InterLeukine
IPA	Ingenuity Pathways Analysis
IRAK-4	Interleukin-1 Receptor–Associated Kinase 4
IRF	Inteferon Regulatory Factor
IU	Unité internationale
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
KO	Knock-Out
LCs	Langerhans Cell(s)
LDL	Low Density Lymph
LPS	Lipopolysaccharide
MPL	MonoPhosphoryl Lipide A
MVA	Modified Vaccine Ankara
MyD88	Myeloid Differentiation primary-response protein 88
NALP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NF- κ B	Nuclear Factor <i>kappa</i> B
NK	Natural Killer
NLRP3	NOD-like receptor family, pryin domain containing 3
NOD	Nucleotide-binding domain

NSRS	N Sub nucleocacid Ring Structure
OVA	OVALbumine
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC	Perepheral Blood Monocluear Cells
pDC	Plasmacytoid Dendritic Cell
PFU	Plaque-Forming Unit
poly IC	Poly-cytidylique acide poly-inosinique
NK	Natural Killer
NLRP3	NOD-like receptor family, pryin domain containing 3
NOD	Nucleotide-binding domain
NSRS	N Sub nucleocacid Ring Structure
OVA	OVALbumine
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC	Perepheral Blood Monocluear Cells
pDC	Plasmacytoid Dendritic Cell
PFU	Plaque-Forming Unit
poly IC	Poly-cytidylique acide poly-inosinique
qRT-PCR	Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
RE	Réticulum Endoplasmique
RIG-1	Retinoid Inducible Gene 1
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RORgt	Retinoïd-related Orphan Receptor GammaT
Siglech	Sialic acid binding Ig-like lectin H
SIRP	Signal Regulatory Protein
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SVF	Sérum de Veau Foetal
TAP1/2	Transporter associated with Antigen processing
T-bet	Transcription factor T-beta
TBK1	TANK Binding Kinase 1
TCR	T Cell Receptor
TGF- _β	Transforming Growth Factor beta
TGN	Trans-Golgi Network
TLR	Toll Like Receptors
TNF- _α	Tumor Necrosis factor alpha
TRIF	Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter inducing interferon-beta

VLP	Virus Like Particles
YFV	Yellow Fever Virus

CHAPITRE I : INTRODUCTION

Le projet de recherche qui m'a été confié concerne l'étude de l'immunogénicité de vaccins recombinants dérivés de l'adénovirus canin chez le mouton par l'analyse de l'interaction entre ces vecteurs et les cellules dendritiques ovines. Pour poser le cadre des connaissances nécessaires à la présentation de mon projet, j'ai divisé l'introduction bibliographique du mémoire en 2 parties ; une partie sur l'immunogénicité des vaccins en général, et une autre sur les vecteurs adénoviraux en vaccination.

1. Les mécanismes de l'immunogénicité des vaccins

Différents acteurs cellulaires sont impliqués dans l'immunogénicité des vaccins : d'une part les cellules de l'immunité innée, c'est à dire les cellules dendritiques (CD), qui capturent et sont activées par les vaccins, et d'autre part les lymphocytes dits effecteurs et mémoires induits par les vaccins pour assurer la défense immune, c'est à dire les lymphocytes T CD4⁺, T CD8⁺ et les lymphocytes B. Dans cette partie, nous envisagerons les mécanismes de présentation des antigènes aux lymphocytes par les cellules présentatrices de l'antigène, les CD et leurs sous-populations, l'activation des CD par les vaccins, et les populations de lymphocytes induits par les vaccins et qui assurent la défense contre les pathogènes.

1.1. Les acteurs cellulaires

1.1.1. La présentation antigénique par les CPA

Les CD sont des cellules présentatrices d'antigène « professionnelles » (CPA). Elles ont un rôle central dans l'initiation de la réponse immunitaire, en assurant l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Dans les tissus, elles sont immatures et elles ont la capacité de capturer, d'apprêter et de présenter un antigène aux lymphocytes. Il est habituellement décrit que la capture de l'antigène entraîne leur maturation et leur migration vers les zones T du ganglion lymphatique drainant.

L'initiation de la réponse adaptative requiert des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺, qui reconnaissent respectivement, via leur récepteur « T Cell Receptor » (TCR), des peptides associés au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et de classe I (CMH I). Le CMH II est retrouvé uniquement à la surface des CPA. Le CMH I est retrouvé à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme.

1.1.1.1. La présentation CMH I directe et croisée et l'induction des lymphocytes T CD8⁺

Les défenses immunitaires de l'organisme vis-à-vis des agents pathogènes, notamment intracellulaires, reposent en partie sur la surveillance par les lymphocytes T CD8⁺. Cette surveillance est rendue possible par l'éducation des lymphocytes T CD8⁺ par les CD via un système d'apprêtement (processing) des antigènes sur le CMH I. Deux modes de présentation via le CMH I sont utilisés par la CD : la présentation directe et la présentation croisée.

Dans la voie de présentation directe, les protéines synthétisées par la CD dans le cytosol sont digérées par le protéasome en peptides qui sont transportés par les transporteurs TAP1/2 dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) où ils s'associent aux molécules de classe I du CMH néosynthétisées (Ana Rodriguez et al. 1999). Ce nouveau complexe utilisera le réseau transgolgien (TGN) pour migrer vers la membrane plasmique.

La présentation croisée désigne une voie d'apprêtement supplémentaire, propre aux CD. Dans ce mode de présentation, les antigènes sont internalisés par endocytose/phagocytose/pinocytose et utilisent des voies biologiques particulières pour avoir accès à l'apprêtement sur le CMH I dans le RE. Il y a alors communication entre la voie endosomale, lieu de l'acquisition des antigènes, et les compartiments impliqués dans leur processing, c'est à dire le cytosol et le RE. Dans ce cas, les antigènes sont dégradés partiellement dans l'endosome (ou le phagosome) et sont dirigés dans le cytosol via le canal Sec 61 où ils sont dégradés en peptides par le protéasome. Ils seront ensuite transportés par les transporteurs TAP 1/2 dans la lumière du RE où ils s'associeront aux molécules de classe I du CMH néosynthétisées et migreront vers la membrane plasmique (Ana Rodriguez et al. 1999). Dans un autre scénario possible, l'antigène peut être dégradé par les cathepsines dans l'endosome et chargé directement sur le CMH I (Lin et al. 2008). Il semble aussi qu'il existe un compartiment de fusion « RE-phagosome » où peut se faire le chargement des peptides sur le CMH I (Ackerman et al. 2006).

1.1.1.2. La présentation CMH II et l'induction des lymphocytes T CD4⁺

Une caractéristique majeure des CD est l'expression à leur surface de molécules du CMH II, dont le rôle est de présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4⁺ naïfs. A l'état immature, peu de molécules du CMH II sont retrouvées à la surface de la cellule car elles sont accumulées dans des vésicules endosomales tardives. Toujours à l'état immature, les CD ont une capacité d'endocytose importante mais une faible capacité de présentation antigénique. Lorsqu'une CD capture par phagocytose ou par endocytose un antigène exogène, il y a maturation de la CD : la capacité de capture antigénique de la cellule diminue rapidement au profit de la capacité d'assembler les complexes CMH II-peptide et de les présenter à sa surface (José A. Villadangos 2001). Les protéines exogènes sont dégradées partiellement en peptides au niveau de l'endosome précoce. Les vésicules d'endosome contenant les peptides dégradés fusionnent avec les vésicules contenant les molécules du CMH II. Dans ces vésicules, le CMH II nouvellement synthétisé ne porte pas encore de peptide, mais est stabilisé par la

protéine appelée «class II-associated li peptide» (CLIP) qui se fixe dans la gouttière de l'hétérodimère CMH II. La molécule de classe II non classique HLA-DM se fixe aux complexes CMH II-CLIP et catalyse le départ de CLIP permettant la liaison des peptides antigéniques exogènes. Une fois le complexe CMH II-peptide formé, les vésicules sont transportées à la membrane plasmique, fusionnent avec celle-ci, ce qui permet l'expression à la surface des CD de molécules du CMH II chargées en peptides exogènes (Watts 2004). La présentation du complexe CMH II-peptide aux lymphocytes T CD4⁺ naïfs peut avoir lieu.

1.1.2. Les CD et leurs sous-populations

Les toutes premières cellules de type dendritique ont été découvertes par Paul Langerhans en 1868 et ce n'est qu'en 1973 qu'elles sont définies en tant que sous population de CD et décrites comme étant les meilleures CPA professionnelles de l'organisme. Nous pouvons diviser les sous-populations de CD en 2 classes principales :

- Les CD plasmacytoïdes (pDC)
- Les CD « classiques » (CDc)

Les pDC ont été découvertes chez l'homme à la fin des années 50. Elles sont à l'origine d'une forte production des cytokines antivirales, les interférons de type I (IFN-I), lors de nombreuses infections virales (Colonna, Trinchieri, et al. 2004). Comme leur nom l'indique, les pDC ont un aspect plasmacytoïde. Elles perdent leur morphologie plasmacytoïde et développent des dendrites après activation. Elles expriment différents « Toll like Receptors » (TLR) dont TLR7 et TLR9 et produisent de très grandes quantités d'interféron α en réponse aux particules virales internalisées. L'activation de la cascade de signalisation du TLR7 ou du TLR9 se fait via la molécule MyD88 et conduit à l'activation fonctionnelle de facteurs de transcription, les facteurs régulateurs d'IFN (IRF) 3 et 7 et NF- κ B. Les formes actives d'IRF et du NF- κ B activent la transcription des gènes codant pour l'IFN- α , - β et d'autres cytokines ou chimiokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-12 (IL-12), le TNF- α et l'IL-6 (Liu et al. 2005)(Tailor et al. 2006).

Chez la souris, les pDC n'ont été caractérisées qu'en 2001. A l'état basal, elles ont été localisées dans les organes lymphoïdes (zones T des ganglions lymphatiques et de la rate), la moelle osseuse, le sang, le foie et le thymus. Lors d'une inflammation, les pDC murines sont aussi détectées dans les poumons, les plaques de Peyer et la peau. Elles portent les marqueurs B220, CD45RA, Gr1 (aussi nommé Ly6C), Siglech (Colonna, Trinchieri, et al. 2004).

Chez l'homme, les pDC ont été décrites dans le sang et résidentes dans le foie fœtal, la moelle osseuse et dans les organes lymphoïdes comme le thymus et les ganglions lymphatiques (Liu et al. 2005). Elles sont caractérisées par l'expression de différentes molécules CD4, CD45RA, ILT7, CD123 et par BDCA-2 et BDCA-4 qui sont restreintes aux pDC du sang et de la moelle osseuse (Colonna, Trinchieri, et al. 2004).

Chez le mouton, les pDC ont été, en grande partie, caractérisées par notre équipe. Elles sont retrouvées dans la lymphe afférente cutanée et aussi détectées dans le sang. Elles expriment le marqueur CD45RB (Pascale et al. 2008).

Les CDc constituent une population cellulaire hétérogène et complexe. Chaque espèce présente différentes sous-populations ayant des fonctions spécifiques (sécrétions, présentation antigénique...). Trois groupes principaux de CD peuvent être distingués en fonction de leur localisation anatomique et de leurs conditions de développement : 1) les CD dites résidentes (CDres) des organes lymphoïdes, qui sont constitutivement présentes dans ces organes, 2) les CD dites migrantes (CDmig), qui sont constitutivement présentes dans les surfaces de contact avec l'extérieur et migrent dans les organes lymphoïdes drainants, et 3) les CD dites inflammatoires (CDinf), qui ne se développent qu'en condition d'inflammation.

Chez la souris, les CDc murines ont été caractérisées par une haute expression de la molécule CD11c. Différentes sous-populations de CDc ont été identifiées par l'expression de différents marqueurs à la surface de la cellule, CD4 et CD8 α , CD11b, CD24, SIRP et les lectines CD205, DCIR2 et CD207.

Dans les CDres murines, nous pouvons identifier les CDc CD8 α^+ CD11b $^-$ et

les CDc CD8 α ⁻ CD11b⁺ plus généralement appelées CD CD8 α ⁺ et CD CD11b⁺. Ces deux types cellulaires exercent des fonctions en partie distinctes. Les CD CD8 α ⁺ sont les plus efficaces pour l'activation des lymphocytes T CD8⁺ via la présentation croisée restreinte par le CMH I. Les CD CD11b⁺ sont plus efficaces pour l'activation des lymphocytes T CD4⁺ restreinte pour le CMH II. Les différentes propriétés assignées à ces deux sous-populations font d'elles des cibles potentielles pour orienter la réponse immunitaire pour la vaccination. Les lectines CD205 et DCIR2 sont des récepteurs endocytiques. La lectine CD205 est plus exprimée sur des CD CD8 α ⁺ tandis que DCIR2 est plus représentée à la surface des CD CD11b⁺. Il a été décrit *in vitro* et *in vivo* que l'utilisation d'anticorps chimériques anti-CD205 ou anti-DCIR2 couplés à l'ovalbumine (OVA) montre que les CD CD8 α ⁺ induisent préférentiellement la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ et qu'à l'inverse, les CD CD11b⁺ induisent principalement la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ (Dudziak et al. 2007). Un autre anticorps chimérique, anti-Clec9A (molécule appartenant à la famille des lectines de type C) est exprimé par la sous-population de CD CD8 α ⁺. Cet anticorps anti-Clec9A montre que l'administration *in vivo* de l'anticorps anti-Clec9A couplé à l'OVA induit une augmentation de la réponse des lymphocytes T CD4⁺ et des lymphocytes T CD8⁺ ainsi qu'une forte augmentation de la réponse humorale sans ajout d'adjuvant (Caminschi et al. 2008). Il est à noter que la protéine Clec9A est aussi exprimée par la sous-population de CD humaines BDCA-3⁺ mais pas sur les pDC (Caminschi et al. 2008).

Les CD CD8 α ⁺ présentent un profil d'expression moléculaire associé à des fonctions spécifiques. D'un point de vue transcriptomique et protéique, les CD CD8 α ⁺ sont enrichies en molécules impliquées dans l'apprêtement du CMH I.

La molécule CADM1 est une molécule d'adhésion exprimée à la membrane plasmique des cellules épithéliales et des neurones. Cette protéine est retrouvée à la fois sur la sous-population de CD CD8 α ⁺ murine et sur son homologue humaine BDCA-3⁺. CADM1 lie CRTAM une protéine de la famille des nectines présente sur les lymphocytes T CD8⁺ et les cellules « Natural Killer » (NK) et NK-T (Galibert et al. 2005). L'interaction de CADM1 avec CRTAM déclencherait la production d'IL-22 par les lymphocytes cytotoxiques (CTL) (Galibert et al. 2005).

D'autre part, des molécules de détection de motifs pathogènes sont différenciellement exprimées dans les CD CD8 α ⁺ et CD11b⁺. Par exemple les CD

CD8 α^+ ne sont pas activées par certains virus comme les virus sendai ou influenza. Ceci serait en rapport avec l'absence d'expression des « Retinoic like-Inducible Gene I (RIG-I) like receptors » (Buschow & Figdor 2010). Ainsi les sous-populations de CD peuvent interagir différemment avec les agents pathogènes et les vaccins.

Les CDmig murines se développent dans les tissus périphériques, échantillonnent les antigènes du tissu et migrent constitutivement vers les ganglions drainants même en absence de *stimuli* inflammatoires. Différentes sous-populations de CD ont été décrites dans les *épithélia* suivant leur localisation tissulaire.

Dans la peau et les muqueuses, on trouve 2 sous types "équivalents" aux CDres CD8 α^+ et CD11b $^+$ mais qui expriment des marqueurs un peu différents. On les distingue en CD CD103 $^+$ (proches des CD8 α^+) et en CD CD103 $^-$ (proches des CD11b $^+$). Le développement des CD CD103 $^+$ et des CD CD8 α^+ dépend de facteurs communs, tels Flt3 (Ginhoux et al. 2009), BatF3 (Edelson et al. 2010), Id2 (Ginhoux et al. 2009) ou IRF8 (Ginhoux et al. 2009). On trouve aussi dans la peau les cellules de Langerhans (LCs) qui sont retrouvées à l'état immature dans les couches stratifiées à la fois de l'épiderme et des muqueuses telles que les surfaces oculaires, orales et vaginales. Elles expriment de hauts niveaux de CD207, de CD205 et de EpCAM (Bursch et al. 2007).

Les CDinf murines apparaissent lors d'infection ou de vaccination. Elles proviennent de la différenciation de monocytes sanguins. Leur mobilisation implique le récepteur TLR4, le CD14 et la molécule adaptatrice TRIF. Elles ont été récemment caractérisées comme étant DC-SIGN $^+$ CD14 $^+$. Ces CDinf dérivées des monocytes sont très efficaces pour la présentation croisée de protéines et de bactéries Gram négatives (Cheong et al. 2010).

Chez l'homme, les CDc humaines expriment le marqueur CD4 mais n'expriment pas le marqueur CD8 α . L'existence de sous-populations de CDres humaines équivalentes aux CD CD8 α^+ murines a été démontrée récemment dans le sang (Croizat et al. 2010) (Bachem et al. 2010) (Poulin et al. 2010) (Robbins et al. 2008). Les CDc BDCA-3 $^+$ seraient les homologues des CDc murines CD8 α^+ , de par des similitudes de signatures transcriptomiques et des caractéristiques

fonctionnelles, notamment la forte capacité de présentation croisée. A l'opposé, les CDc BDCA-1⁺ humaines seraient les équivalentes des CDc murines CD11b⁺.

Dans les CDmig humaines de la peau, trois sous-populations de CD ont été identifiées :

- Les LCs de l'épiderme qui expriment un haut niveau de CD1a et de CD207. Elles sont CD14⁻ et sont les meilleures inductrices de la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ et de lymphocytes T CD8⁺ en comparaison des sous-populations de CD dermales. Elles orientent la réponse des lymphocytes T CD4⁺ vers un phénotype de type Th2 via la sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. Les LCs sont plus efficaces pour présenter des peptides exogènes, des peptides issus de mélanomes ou viraux, aux lymphocytes T CD8⁺ mémoires. En revanche, elles sont incapables de promouvoir la différenciation des cellules B naïves en plasmocytes (Klechevsky, Morita, et al. 2008).
- Les CD intersticielles du derme sont CD1a⁻CD14⁺ et CD1a^{int}CD14⁻. Seule la sous-population CD dermales CD14⁺ induit une différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes *helper* folliculaires (Tfh) capables d'induire l'activation des lymphocytes B. Elles induisent la différenciation de cellules B naïves en plasmocytes sécrétant des immunoglobulines (Ig) M, mais elles ne sont pas efficaces pour activer des lymphocytes T CD8⁺ naïfs. Ces données suggèrent que cette sous-population de CD induit préférentiellement une réponse humorale et que, au contraire, les LCs induisent préférentiellement une réponse à médiation cellulaire (Ueno et al. 2007).

Chez le mouton, les CDc ont été identifiées dans l'intestin (Akesson et al. 2008), dans le poumon (Fach et al. 2006) et dans la lymphe drainant la peau (Bujdoso et al. 1989).

Dans la lymphe ovine, les CDmig sont retrouvées en plus grand nombre dans la lymphe afférente cutanée que dans la lymphe afférente oro-nasale (Epardaud et al. 2004). Elles expriment le marqueur CD1b et sont capables de capturer des antigènes et d'induire la prolifération des lymphocytes T (Bujdoso et al. 1989). Notre équipe a identifié deux sous-populations : la sous-population majoritaire SIRP⁺CD26⁻ et la sous-population minoritaire SIRP⁻CD26⁺ (Epardaud et al. 2004). Récemment,

Vanessa Contreras en thèse dans l'équipe a montré que la sous-population SIRP⁻ CD26⁺ partageait des caractéristiques moléculaires (signature transcriptomique) et fonctionnelles (cross présentation aux lymphocytes T CD8⁺) avec les CD CD8 α ⁺ de la souris et les CD BDCA-3⁺ de l'homme (Contreras et al 2010)(Crozat et al. 2010). La surexpression de nombreux gènes semble caractériser cette sous-population, notamment l'expression de l'IL-12, CADM1, XCR1, CLEC9A, IRF8, Id2, BatF3, Flt3 (Contreras et al 2010). De plus cette sous-population SIRP⁻CD26⁺ induit fortement l'expression du gène codant pour l'IL-22 dans les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺ naïfs (Contreras et 2010). Enfin, nous avons pu, grâce à la comparaison entre espèces de mammifères, établir un phénotype commun de sous-populations de CD, indépendamment du tissu d'origine (CD_{res} et CD_{mig}), qui est CADM1⁺CLEC9A⁺SIRP⁻ et CADM1⁻CLEC9A⁻SIRP⁺ plus généralement appelées CD8 α -like et CD11b-like. Au vu des différences fonctionnelles entre ses sous-populations, il est important de les considérer différemment pour évaluer la contribution des CD dans les interactions hôtes/pathogènes et hôtes/vaccins.

1.1.3. L'activation des CD par les vaccins et leurs adjuvants

L'efficacité des vaccins passe par l'activation des CD, cellules clés de l'initiation de la réponse immunitaire. Les vaccins utilisés ou en développement sont produits selon différents principes : ils peuvent correspondre à l'agent pathogène atténué dans sa virulence, à l'agent pathogène inactivé par des processus chimiques ou physiques, à des protéines recombinantes correspondant aux antigènes protecteurs, à des vecteurs ADN. Les antigènes protecteurs peuvent également être insérés dans des vecteurs bactériens recombinants ou dans des vecteurs viraux recombinants qui stimulent intrinsèquement les CD. Les vaccins inactivés ou sous forme de simples protéines recombinantes ne sont pas suffisamment activateurs de CD, donc pas suffisamment immunogènes. En conséquence, on ajoute des « adjuvants » au principe vaccinal de base.

Le terme « adjuvant » dérivé du latin *adjuvare* (aider), désigne toute substance capable de cibler le système immunitaire pour renforcer l'immunogénicité d'antigènes administrés simultanément. Il existe une multitude d'adjuvants, de nature et d'origine

extrêmement diverses. Ces adjuvants conduisent à l'activation des CD, soit en interagissant directement avec elles, soit en activant d'autres cellules qui stimulent les CD *in fine* (De Gregorio et al. 2009). Le ciblage direct des adjuvants sur les CD peut être médié par des composants microbiens tels que les agonistes des TLR ou des récepteurs de type NOD. Le ciblage indirect des CD concerne les adjuvants minéraux (l'hydroxyde d'aluminium, le phosphate d'aluminium appelé alum), les adjuvants huileux de type émulsion « eau dans l'huile » (MF59 composé principalement de squalène), les adjuvants à microparticules et les saponines. Certains adjuvants combinent les 2 propriétés, tels l'adjuvant complet de Freund qui contient des parois de mycobactéries dans une émulsion eau dans huile. Nous détaillerons davantage ci dessous les adjuvants à effet indirect sur les CD, les agonistes des TLR et les vaccins viraux recombinants. Nous envisagerons également des méthodes vaccinales d'avenir qui utilisent des activations très ciblées des CD (manipulations *in vitro* ou ciblage par anticorps recombinants).

1.1.3.1. Les adjuvants à effet indirect sur la CD

Les adjuvants traditionnels comme l'alum et le MF59 sont des composés connus pour moduler la persistance d'antigènes ou l'absorption d'antigènes par les CD. Il a été suggéré que l'adsorption de l'alum favorise une libération lente de l'antigène par « l'effet dépôt ». La plupart de ces composés, bien qu'incapables d'activer les CD *in vitro*, peuvent stimuler les CD *in vivo* par le ciblage de cellules du stroma ou par le recrutement et l'activation de cellules sanguines telles les monocytes et les granulocytes (Seubert et al. 2008).

L'effet de l'alum sur l'immunité cellulaire et humorale est inhibé lorsque les monocytes CD11c ou les CD sont déplétés, mettant en évidence le rôle central des CD dans son effet (Seubert et al. 2008). Outre l'absorption d'antigènes, l'alum est connu pour induire une réaction locale pro-inflammatoire au site d'administration, conduisant à la libération d'acide urique. Par effet direct ou par l'acide urique libéré dans l'environnement, l'alum active un récepteur cytoplasmique NOD-like appelé NLRP3 ou NALP3, qui en s'associant avec la protéine ASC et la protéase caspase 1 forme un complexe protéinique appelé inflammasome. L'activation de NLRP3 aboutit à la conversion en formes actives des précurseurs des cytokines pro-inflammatoires

comme l'IL-1b, IL-18 et IL-33 (Pétrilli et al. 2007). Par ailleurs, l'alum et le MF59 induisent la sécrétion de chimiokines telles que CCL2, CCL3, CCL4 et CXCL8 par les granulocytes et les monocytes *in vitro*, chimiokines impliquées dans le recrutement de cellules inflammatoires sanguines (Seubert et al. 2008). L'injection intrapéritonéale de l'alum déclenche la production locale des chimiokines CCL2, CXCL1 qui conduit au recrutement de neutrophiles, d'éosinophiles et de monocytes qui se différencient en CD inflammatoires (De Gregorio et al. 2009).

Enfin, l'utilisation d'adjuvants tels que l'alum et le MF59 semblent accroître le recrutement des cellules inflammatoires (monocytes et granulocytes) dans le site d'injection, améliorer la différenciation des monocytes en CD, et faciliter la migration des CD dans les ganglions lymphatiques où sera amorcée la réponse immunitaire adaptative (Seubert et al. 2008).

1.1.3.2. Les ligands de TLR

Les TLR (1 à 13) sont des molécules transmembranaires qui présentent des similarités avec la protéine codée par le gène Toll de la drosophile. Par leur partie extracytosolique, ils reconnaissent des motifs moléculaires structuraux caractéristiques issus de micro-organismes viraux, bactériens ou fongiques. Ces motifs incluent :

- de l'ADN bactérien ou de l'ADN viral contenant des motifs CpG (Cytidine-Guanosine) non méthylés (TLR9)
- de l'ARN viral simple (TLR7) ou double brin (TLR3)
- des composants des parois bactériennes Gram négatives comme les lipopolysaccharides (LPS) (TLR4)
- des lipopeptides (TLR1, 2, 6)
- de la flagelline composant du flagelle de certaines bactéries (TLR5)

Les TLR membranaires (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10-13) sont des récepteurs identifiant principalement des molécules non codées par le soi tels des lipopeptides, des peptidoglycans et la flagelline. Les ligands des TLR localisés au niveau des endosomes (TLR3, 7, 9) reconnaissent des molécules à base d'acide nucléique.

La partie intracytosolique des TLR comprend des homologies de séquences avec le récepteur à l'IL-1. La liaison des TLR à leur ligand provoque la dimérisation des TLR, soit homodimérique, soit hétérodimérique (TLR1/2, TLR2/6) et la transduction de signaux via deux molécules adaptatrices principales : MyD88 et TRIF. MyD88 transduit la signalisation de tous les TLR excepté TLR3 qui utilise la molécule adaptatrice TRIF. La signalisation du TLR4 est conduite par les 2 molécules MyD88 et TRIF. Ces molécules adaptatrices activent d'autres partenaires cytosoliques dont la kinase IRAK4 (MyD88) et la kinase TBK1 (TRIF). La cascade des phosphorylations de plusieurs intermédiaires conduit ultimement à la translocation nucléaire du complexe NF- κ B (MyD88) et/ou de l'IRF3 (TRIF). Ces facteurs de transcription majeurs activent l'expression de nombreux gènes de l'inflammation et de la maturation fonctionnelle des CD, avec production de cytokines (IL-12, IL-6, IFN- α et β), de chimiokines (CCL2, 3, 4, 5), et augmentation de l'expression de molécules d'adhésion (intégrines), des récepteurs aux chimiokines (CCR7), des molécules de co-activation (CD80, CD86, CD40), du CMH I et II, optimisant ainsi les capacités des CD à migrer vers les ganglions et à présenter les antigènes. L'effet adjuvant des ligands de TLR est en grande partie médié par les CD : en effet, des souris invalidées pour l'expression de la molécule adaptatrice MyD88 uniquement dans les CD (souris Knock in MyD88 dans les cellules CD11c) présentent une réponse immune très réduite lors de vaccination adjuvée avec différents ligands de TLR (Hou et al. 2008). Ainsi, l'activation directe des CD par les ligands des TLR joue un rôle important dans leur effet adjuvant. Les ligands activant les TLR3, 4, 7 et 9 sont plus particulièrement envisagés comme adjuvants et sont détaillés ci dessous.

Les motifs CpG sont des oligodésoxynucléotides non-méthylés synthétiques (CpG ODN) et sont de plus en plus utilisés comme adjuvants, principalement dans les traitements du cancer, les maladies infectieuses et allergiques. Ils sont reconnus par le TLR9 qui est plutôt exprimé par la catégorie des pDC chez l'homme, dont la fonction majeure est la production d'IFN-I. L'activation des pDC favorise la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécrétant des anticorps et l'activation des lymphocytes T CD8⁺ et T CD4⁺ de type Th1. Les premiers essais cliniques humains ont commencé en 1999, et ont montré des signes encourageants d'activité en tant qu'adjuvant vaccinal. Des essais pré-cliniques en cours sur modèles

animaux suggèrent que les motifs CpG ODN ont une activité anti-tumorale (Vollmer & Krieg 2009).

L'imiquimod et le resiquimod sont de petites molécules synthétiques nucléotidiques de la famille des imidazoquinolinamines. Elles agissent en tant que modificateur de la réponse immunitaire et ciblent principalement le TLR7. L'imiquimod induit la production de cytokines (IL-1, IL-12, IL-6, TNF- α) et en particulier de l'IFN- α (Stockfleth et al. 2003). Des études précliniques ont indiqué son potentiel pour le traitement de lésions précancéreuses et le traitement de tumeurs chez l'homme mais il ne s'agit pas ici de la fonction adjuvante d'un vaccin. L'imiquimod a été approuvé pour le traitement de verrues génitales externes et pour le traitement de lésions cancéreuses de la peau (Kemény & Nagy 2010). Le resiquimod co-administrée par voie nasale avec des « Virus-Like-Particles » (VLP) du virus de norwalk, virus responsable de la gastro-entérite, a démontré avoir un effet d'adjuvant mucosal (Velasquez et al. 2010). Cet effet s'est aussi retrouvé dans le traitement contre les papillomavirus humains (Fraillery et al. 2009).

Le TLR3 est un récepteur qui reconnaît l'ARN viral double brin. Le polycytidylique acide poly-inosinique (poly IC) est un composé synthétique qui lie le TLR3. Le poly IC induit l'IFN-I, la production de cytokines/chemokines inflammatoires et la maturation des CD via la protéine adaptatrice TRIF. L'administration intranasale de poly IC combinée à un virus inactivé de la grippe, induit une protection contre l'infection grippale (Ichinohe et al. 2005). Il a aussi montré une action adjuvante dans la réponse aux lymphocytes T CD4⁺ de type Th1 et dans la réponse humorale contre la malaria (Tewari et al. 2010).

L'endotoxine des bactéries Gram négatives, encore appelée lipopolysaccharide (LPS) est active en tant qu'adjuvant mais possède des effets toxiques marqués. Le monophosphoryl lipide A (MPL), obtenu par traitement du LPS à l'acide chlorhydrique, est un composant beaucoup moins toxique qui conserve son efficacité en tant qu'adjuvant. Le LPS et le lipide A sont reconnus par le TLR4 (Ianaro et al. 2009). Le MPL stimule l'activation des CD et des lymphocytes T humains (Ismaili et al. 2002). Il a une action adjuvante dans la réponse cellulaire et humorale, et peut potentialiser des adjuvants à effet indirect sur les CD (Ulrich & Myers 1995).

Le MPL a été administré à l'homme dans divers essais cliniques de vaccins (vaccin contre le paludisme, vaccin anti-cancer) sans induire d'effets secondaires.

1.1.3.3. Les virus recombinants

Un grand nombre de vecteurs viraux ont été développés pour la vaccination et ont atteint les essais cliniques. Plusieurs d'entre eux sont aussi utilisés dans la thérapie génique. Ce sont les caractéristiques intrinsèques des vecteurs qui déterminent leur efficacité en tant que vecteurs vaccinaux, notamment leur capacité à induire une réponse immunitaire innée et l'activation des CD.

Les vecteurs adénovirus et les vecteurs pox sont les plus étudiés et certains sont en phase clinique (M. A. Liu 2010). Les vecteurs adénovirus seront traités dans un chapitre spécifique. Les deux vecteurs pox les plus utilisés sont : le canarypox et le Modified Vaccine Ankara (MVA). Le MVA a été développé par forte atténuation du virus de la vaccine par passage sur cellules de poulet ; il perd 10% de son génome ce qui conduit à une perte de réplication dans les cellules de primates. Le canarypox a pour hôte naturel le canari mais il peut infecter des cellules de mammifères sans s'y répliquer. Les MVA et le canarypox tolèrent l'insertion de grands fragments codant pour des antigènes hétérologues d'intérêt et présentent un large tropisme pour les cellules de mammifères. L'expression de l'antigène est de courte durée et l'emplacement du virus dans le cytoplasme évite les risques d'intégration qui pourraient se produire avec un vecteur rétroviral, par exemple (Mastrangelo et al. 2000). Avant d'autoriser l'emploi de tels vecteurs, il est important de vérifier au maximum leur innocuité de manière la plus rigoureuse possible. Ces vecteurs qui sont donc des vaccins vivants sont particulièrement efficaces. L'expression des antigènes hétérologues peut induire une immunité protectrice. Ainsi des canarypox recombinants sont homologués dans différents pays pour des applications vétérinaires (contre la rage, la maladie de carré, la leucose féline, la grippe équine et contre l'infection par le virus West-Nile). Un canarypox codant pour la glycoprotéine de la rage a permis de réduire les foyers épidémiques sauvages par l'administration orale d'appâts (M. A. Liu 2010). Divers vecteurs pox ont fait l'objet d'essais cliniques chez l'homme (principalement des études contre le virus de l'immunodéficience

humaine (HIV)) et dans un des plus grands essais cliniques, le vecteur canarypox codant pour des antigènes du HIV a été utilisé comme le premier élément d'une vaccination « prime-boost » (stratégie de vaccination en plusieurs étapes, qui permet de présenter un même antigène à l'aide de différents vecteurs) impliquant 16.000 personnes (Rerks-Ngarm et al. 2009).

D'autre part, les vecteurs MVA et canarypox interagissent efficacement avec les CD, ce qui explique en partie leur efficacité vaccinale. Ils sont capables d'infecter efficacement les CD *in vitro* (Di Nicola et al. 1998) et *in vivo* (Abadie et al. 2009) et de les activer (Drillien et al. 2004)(Guerra et al. 2007). Par exemple, une étude a montré, suite à l'infection du virus canarypox recombinant ALVAC, une maturation partielle de CD dérivées de monocytes humains. La caractérisation du profil d'expression génique de cette infection a mis en évidence une majorité de gènes fortement induits appartenant au réseau IFN, en contraste aux gènes impliqués dans la voie NF- κ B qui n'ont pas été induits (Harenberg et al. 2008).

1.1.3.4. Méthodes d'avenir

Compte tenu de leur rôle essentiel dans l'initiation, l'orientation et l'intensité des réponses immunes, les CD sont une cible directe de choix pour le développement de nouveaux vaccins. Actuellement, deux approches de vaccins basés sur les CD sont en cours d'élaboration. Une première approche consiste à injecter des CD chargées *ex vivo* avec un antigène d'intérêt alors que la deuxième approche consiste à cibler les CD *in vivo*.

Les premiers essais vaccinaux de CD chargées *ex vivo* ont été testés sur des patients atteints de cancer. Les CD ont été générées à partir de monocytes en présence de « Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor » (GM-CSF) et d'IL-4. Ces études ont mis en évidence une meilleure présentation aux lymphocytes T quand les CD sont chargées en présence d'un cocktail de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF (Dhodapkar et al. 1999). Dans d'autres études, ce sont des CD purifiées du sang qui ont été chargées *in vitro* avec des antigènes tumoraux. Par exemple, cette stratégie a été utilisée chez des patients atteints de lymphome B folliculaire où des réponses immunitaires et des rémissions cliniques

ont été observées (Hsu et al. 1996). Cependant, il apparaît utile d'adjoindre à ces transferts de CD des activateurs capables de contourner l'environnement tolérogène des tumeurs (Candido et al. 2001).

Le ciblage de CD *in vivo* a pu être réalisé principalement avec des anticorps recombinants, fusionnés avec des antigènes modèles ou d'intérêt. Certaines molécules exprimées spécifiquement par des sous-populations de CD peuvent permettre un ciblage précis, conduisant à induire des types particuliers d'immunité. Par exemple, le ciblage des CD CD8⁺ chez la souris par des anti-DEC205 a permis d'induire plutôt des réponses T CD8⁺, alors que le ciblage des CD CD11b⁺ par des anti-33D1 a permis d'induire des réponses T CD4⁺ (Dudziak et al. 2007). Il est parfois nécessaire d'adjoindre des adjuvants pour induire des réponses effectrices et non tolérogènes par cette stratégie mais pas toujours (Bonifaz et al. 2004). Ainsi, le ciblage de la molécule CLEC9A induit une réponse T CD8⁺ et stimule une réponse anticorps très efficace en absence d'adjuvant (Caminschi et al. 2008).

La transposition de cette stratégie chez l'homme est difficile, car elle est limitée en première intention à des essais *in vitro*. Il faudra un temps très long avant que des lots cliniques soient produits et effectivement testés (Baylor Institute, USA, <http://www.baylorhealth.edu/Research/BIIR>). Toutefois différents antigènes humains ciblés par des anti DC-SIGN avec la protéine KLH, l'anti-DEC205 avec la protéine Gag et l'anti-mannose récepteur avec l'hormone gonadotropin, l'anti-DCIR avec l'antigène Matrix d'influenza (Klechevsky, Flamar, et al. 2010) ont permis d'induire une cross présentation de l'antigène *in vitro* (Tacke et al. 2005)(Bozzacco et al. 2007)(Ramakrishna et al. 2007)(Klechevsky, Flamar, et al. 2010).

1.1.4. Les effecteurs

La mise en place de la réponse vaccinale par les CD et leur environnement conduisent à l'apparition d'effecteurs de la protection, c'est à dire de lymphocytes et de leurs produits qui assurent l'élimination des pathogènes (Immunobiology, 7ed. 2005). Il s'agit de lymphocytes B qui se différencient en plasmocytes producteurs

d'anticorps, de lymphocytes T CD4⁺ *helper* dont il existe plusieurs catégories, et de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. L'objectif de cette partie est de présenter les différents types de lymphocytes induits par les vaccins et utiles à la protection.

1.1.4.1. Les lymphocytes T *helper*

Les lymphocytes T *helper* sont définis par leur profil de production des cytokines secrétées par les CD qui les activent. On distingue principalement :

- **Les lymphocytes Th1** induits par la production d'IL-12 par les CD. Ils sont impliqués dans la réponse cellulaire aux pathogènes intracellulaires (virus, bactéries et parasites intracellulaires). Ils sécrètent une forte quantité d'IFN- γ , associée à l'activation du facteur de transcription T-bet, STAT4 et STAT1 (Szabo et al. 2000).
- **Les lymphocytes Th2** induits par l'IL-4. Ils sont impliqués dans l'élimination des pathogènes extracellulaires et la réponse humorale via l'activation des lymphocytes B. Ils secrètent principalement de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13, en association avec l'activation du facteur de transcription GATA-3 et STAT6 (Zheng & Flavell 1997).
- **Les lymphocytes Th17** induits par l'IL-6, le TGF- β et l'IL-23. Ils sont impliqués dans l'élimination de pathogènes extracellulaires et intracellulaires, dans la réponse inflammatoire et dans l'auto-immunité. Ils sécrètent une forte quantité d'IL-17 (Awasthi & Kuchroo 2009). Ils expriment le facteur de transcription ROR γ t.
- **Les lymphocytes *helper* folliculaires (Tfh)** induits par l'IL-12. Ils sont impliqués dans la régulation des réponses B qu'ils activent via la production d'IL-21. Ils expriment le récepteur CXCR5 qui permet leur localisation dans les follicules des ganglions où s'opère la maturation des lymphocytes B. Ils expriment le facteur de transcription BCL6.
- **Les lymphocytes T régulateurs (Treg)** caractérisés par l'expression du facteur de transcription FOXP3 sont impliqués dans la tolérance et l'homéostasie. Ils jouent un rôle crucial en contrôlant les réponses immunes dans les maladies auto-immunes, les réactions allergiques et les rejets de

greffes, mais aussi dans l'élimination des virus et l'inhibition de l'immunité anti tumorale (So et al. 2008).

Ces différents types de lymphocytes *helper* sont impliqués dans la protection induite par les vaccins.

Par exemple, dans le cas de la vaccination contre la tuberculose, les lymphocytes Th1 et Th17 jouent un rôle important dans la protection. Ainsi, il a été démontré que la déplétion de l'IL-17 durant le challenge avec des mycobactéries réduit l'expression des chimiokines et la sécrétion d'IFN- γ dans le poumon et conduit à l'absence de contrôle de l'infection (Khader et al. 2007). Un autre exemple a montré que l'induction de lymphocytes Tfh dans les ganglions est essentielle à la production de lymphocytes B produisant des anticorps de forte affinité et essentielle au maintien de la mémoire immunitaire dans les ganglions, par leur capacité à exprimer des complexes CMH II associés aux peptides immunogènes pendant de nombreuses semaines (Fazilleau et al. 2007).

Il est à noter que les lymphocytes Treg auraient parfois un rôle négatif dans la réponse vaccinale. En effet, dans la vaccination contre la grippe chez la souris, il a été démontré qu'ils inhibaient les réponses Th1 et Th2 tout en maintenant la production d'anticorps (Surls et al. 2010).

1.1.4.2. Les lymphocytes cytotoxiques

Les lymphocytes cytotoxiques T CD8⁺ ou CTL sont responsables de l'immunité cellulaire aboutissant à la mort de la cellule infectée. On observe une libération des granules cytotoxiques (lysosomes particuliers) qui contiennent deux catégories de molécules que l'on appelle des cytotoxines :

- La perforine qui est une protéine qui en se polymérisant forme des pores dans la membrane de la cellule infectée. Le milieu extracellulaire pénètre alors dans la cellule qui mourra par éclatement.

- Les sérine-estérases qui ont pour but de détruire l'ADN en activant des caspases qui vont fragmenter l'ADN afin d'induire l'apoptose. Les débris cellulaires sont alors phagocytés par les cellules phagocytaires.

On cherche à induire des CTL par les vaccins notamment pour lutter contre les tumeurs, contre les maladies infectieuses chroniques, tels HIV ou le virus de l'hépatite C (HCV), et pour générer des réponses contre des antigènes conservés entre les variants viraux comme dans la grippe. Un vaccin constitué de peptides de la télomérase, qui vise les cellules cancéreuses, a été développé (Cortez-Gonzalez & Zanetti 2010) . Un grand succès a été obtenu chez l'homme par l'induction de lymphocytes T CD8⁺ contre le virus papillomavirus HPV16, responsable de cancers génitaux avec une stratégie impliquant l'injection de peptides longs correspondant aux protéines virales E6 et E7 (Melief & van der Burg 2008). L'induction de réponses lymphocytaires T CD8⁺ contre le virus de la grippe avec des adjuvants à base d'ADN et de lipides cationiques a conduit à l'apparition d'une immunité cross-protectrice contre différents variants viraux chez la souris (D. K. Hong et al. 2010). Dans le cas du HCV, on cherche à induire des lymphocytes T CD8⁺ contre les protéines non structurales du virus car ils sont associés à l'élimination du virus. Ainsi, des vecteurs adénovirus recombinants se sont avérés particulièrement efficaces pour induire des lymphocytes T CD8⁺ anti-protéines non structurales éliminant un virus modèle du HCV chez la souris (Mikkelsen et al. 2011).

1.1.4.3. Les lymphocytes B producteurs d'anticorps

Les lymphocytes B, ainsi nommés par référence à la Bourse de Fabricius, qui en est l'organe producteur chez les oiseaux, sont responsables de la réponse immunitaire humorale : ils sont spécialisés dans la production d'anticorps, qu'ils sécrètent après s'être transformés en plasmocytes et qui diffusent dans les humeurs (liquides) de l'organisme. Ces lymphocytes sont très importants dans la vaccination car les anticorps produits vont directement lier l'agent pathogène. Certains de ces anticorps vont neutraliser les pathogènes en empêchant leur fixation aux cellules ou en se fixant à des toxines produites par le pathogène, bloquant ainsi leur pathogénicité. Certains anticorps vont assurer une opsonisation du pathogène qui

correspond au recouvrement du pathogène par les anticorps permettant alors la phagocytose par des cellules de type macrophage ou granulocyte. Enfin après fixation à l'antigène, certains anticorps peuvent activer le complément, ce qui va conduire soit à une opsonisation, soit à une déstabilisation des membranes du pathogène.

Le lymphocyte B reconnaît l'antigène par son immunoglobuline (Ig) de surface : le BCR (« B cell receptor ») est le récepteur antigénique des lymphocytes B. On a vu plus haut qu'ils sont particulièrement activés dans les zones folliculaires des ganglions par les lymphocytes Tfh en association avec des CD. Suite à cette activation, les lymphocytes B obtenus se multiplieront intensément et certains d'entre eux donneront des plasmocytes qui produiront des IgM de basse affinité pour l'antigène. La poursuite des interactions entre le lymphocyte B activé et les lymphocytes Tfh va conduire à la maturation d'affinité des Ig et, ultimement, à leur conversion en IgG, IgE ou IgA. Les lymphocytes B se différencient alors en plasmocytes qui rejoindront les tissus infectés ou en lymphocytes B mémoires. Ils pourront alors recevoir la stimulation des lymphocytes Th2 qui, sous l'effet de IL-4, IL-5, IL-6 et de la molécule CD40, augmenteront le niveau de production des Ig devenues très spécifiques du pathogène.

Le rôle des anticorps neutralisants est essentiel dans la protection contre de nombreux agents pathogènes, par exemple la grippe, la rage, le rotavirus et le virus de la bluetongue chez le mouton. Dans mon laboratoire, on cherche à induire des anticorps neutralisants contre le virus de la grippe par des antigènes viraux qui ne sont pas inducteurs d'anticorps neutralisants dans les conditions d'infection naturelles : il s'agit de la protéine M2e du virus. Mon groupe a montré que les complexes N^{SRS} (protéine de la nucléocapside du virus respiratoire syncytial (RSV) purifiée sous forme de nanoparticules circulaires) étaient des vecteurs d'antigènes très puissants pour stimuler des réponses anticorps, en particulier au niveau mucosal. Il a montré que des souris, vaccinées par voie intra-nasale avec des chimères N-3M2e, étaient en bonne santé et protégées contre une épreuve virale (données non publiées).

Parfois les anticorps peuvent être néfastes, et faciliter les infections, notamment lorsque les anticorps sont de faible affinité (cas de la vaccination contre le virus de la dengue) (B. R. Murphy & Whitehead 2010).

1.2. La signature transcriptomique

La plupart des vaccins ont été développés de manière empirique et, en dépit de leur succès, nous comprenons peu de choses sur leurs méthodes de fonctionnement. On relie en général l'efficacité vaccinale à l'induction d'anticorps neutralisants ou à l'induction de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, parfois à l'induction de lymphocytes T CD4⁺. Dans certains cas, ces éléments ne suffisent pas pour prédire l'efficacité vaccinale ; on manque ainsi cruellement de marqueurs de protection. Un exemple frappant chez le porc concerne la peste porcine africaine dans laquelle les porcs sont parfaitement protégés par un mécanisme inconnu indépendant des anticorps neutralisants (Neilan et al. 2004). Ces corrélats de protection sont nécessaires pour comprendre les mécanismes de la protection vaccinale, pour identifier les individus protégés ou non, pour évaluer l'efficacité de stratégies vaccinales sans nécessairement passer par une épreuve virale, et pour prédire l'induction d'effets indésirables par le vaccin, comme par exemple, la maladie neurotrophe où la maladie viscérotrophe qui ont été associées à la vaccination par la souche vaccinale 17D du virus de la fièvre jaune (YF-17D) (Pulendran 2009).

Ainsi, grâce à «la vaccinologie des systèmes», le groupe de Bali Pulendran aux USA a pu établir de nouveaux corrélats de protection dans le cas du vaccin contre la fièvre jaune chez l'homme (Querec et al. 2009). Pour cela, les auteurs ont analysé la réponse des cellules mononucléées du sang (PBMC) 3 jours après la vaccination par approche transcriptomique. Ils ont identifié une signature transcriptomique précoce qui corrèle avec l'intensité de la réponse T CD8⁺ à 60 jours, et une autre signature qui corrèle avec le taux d'anticorps neutralisants à 45 jours (Querec et al. 2009). De plus le rôle de certains gènes inattendus a pu être mis en évidence dans l'immunité induite par le vaccin, comme par exemple le facteur d'initiation de traduction EIF2AK4 (Querec et al. 2009) ou la protéine K4 dépendante de la calmoduline. Ces gènes ont été trouvés fortement modulés en réponse précoce

au vaccin contre la fièvre jaune chez l'homme et leur invalidation chez la souris a montré leur contribution dans l'immunité. Il apparaît donc convaincant que la réponse vaccinale peut être prédite par la signature transcriptomique observée très tôt après la vaccination. Elle pourrait donc concerner la réponse des CD, mais cela est à démontrer.

Des études similaires à celle réalisée sur la fièvre jaune sont en cours et sont susceptibles de générer différents scénarios de résultats. Un premier scénario extrême serait que tous les vaccins efficaces génèrent une seule signature transcriptomique archétypique. Cela permettrait la prédiction de la réponse immunitaire protectrice pour tous les vaccins. L'autre scénario extrême serait que les signatures moléculaires pourraient être « vaccin spécifique », avec pour chaque vaccin une signature unique prédictive. Enfin le dernier scénario, le plus probable serait celui de groupes de vaccins fonctionnant par des mécanismes similaires. Par exemple, les vaccins impliquant la production de CTL dans leur mécanisme de protection pourraient avoir une signature commune. Tous les vaccins qui stimulent la migration de lymphocytes T vers les poumons pourraient avoir une signature commune distincte, etc ... De même, on pourrait avoir une « méta-signature » des vaccins protégeant par des anticorps neutralisants et une « méta-signature » des vaccins protégeant par des anticorps opsonisants.

A terme, ce type d'études pourrait conduire au développement d'une puce « vaccin » (Pulendran 2009). Cette puce serait composée de 200 à 1000 gènes, organisée en « clusters ». Chaque cluster de gènes permettrait de révéler une signature particulière de la réponse immunitaire innée ou de la réponse immunitaire adaptative. On aurait ainsi la signature de la réponse effectrice des lymphocytes T CD8⁺, la signature de la fréquence de polymorphismes des lymphocytes T, la signature de la balance entre les différents lymphocytes T *helper*, la signature de la réponse aux lymphocytes B, etc... L'ensemble de cette identification de signatures permettrait d'évaluer rapidement la puissance, le type, la durée et la qualité de la protection de la réponse immunitaire chez les personnes vaccinées. Cette puce « vaccin » serait un dispositif puissant qui pourrait être utilisé pour prédire l'immunogénicité et la protection conférée par les vaccins.

2. Les vecteurs adénoviraux

Les *Adenoviridae* (ou adénovirus) constituent une famille de virus non enveloppés (dits « nus ») à génome ADN double brin qui regroupent une centaine de types, dont une cinquantaine peut infecter l'homme. C'est en 1953 que ceux-ci ont été mis en évidence par Wallace P. Rowe à partir de fragments d'amygdale (ROWE et al. 1953). Leur souplesse pour l'insertion d'ADN exogène a conduit à les utiliser comme vecteurs de gènes dans les années 90 pour réparer des défauts du métabolisme cellulaire (Ragot et al. 1993)(Stratford-Perricaudet et al. 1990) mais leur forte immunogénicité a rapidement orienté leur utilisation vers la vaccination. En effet les adénovirus présentent de nombreuses caractéristiques qui en font de bons candidats pour la vaccination vectorisée (voir chapitre 2.2). Ce sont des virus nus donc peu fragiles, qui infectent un large spectre de cellules dont les cellules post-mitotiques ou les cellules à prolifération lente. Ils présentent un faible pouvoir pathogène naturel, en particulier pour les sérotypes 2 et 5 de l'adénovirus humain et le sérotype 2 de l'adénovirus canin. Le génome viral, après un transfert nucléaire efficace, persiste en position extrachromosomique, sans risque d'intégration dans le génome cellulaire et par suite sans risque d'interférence avec les fonctions des gènes cellulaires. Du fait que ce sont des virus à ADN, leur génome est facilement manipulable ce qui facilite la construction des vecteurs recombinants et l'obtention de stocks viraux produits à hauts titres sur culture cellulaire. La taille du génome des adénovirus permet l'insertion de cassettes transgéniques de relativement grande taille, sans toutefois dépasser 105% de la taille initiale du génome pour permettre l'encapsidation (Bett et al. 1993). Enfin, ce sont surtout leurs propriétés immunogènes qui en font des candidats majeurs pour la vaccination vectorisée.

2.1. Organisation et structure des adénovirus

Les adénovirus se regroupent en plusieurs genres :

- ✓ les *Mastadenovirus* comprenant la plupart des adénovirus de mammifères.
- ✓ les *Aviadenovirus* comprenant la plupart des adénovirus des oiseaux.

- ✓ les *Atadenovirus* regroupant certains sérotypes d'adénovirus ovins, bovins, adénovirus de reptiles ...
- ✓ les *Siadenovirus* regroupant les adénovirus de grenouilles et quelques sérotypes aviaires.

Chacun de ces genres regroupe plusieurs espèces d'adénovirus, au sein desquelles on peut retrouver un ou plusieurs sérotypes. Les sérotypes d'adénovirus sont divisés en sous groupes (A à F chez l'homme). Les virus d'un même sous-groupe partagent des caractéristiques biologiques, génomiques, structurales et biochimiques (Flint 2002).

2.1.1. Structure des adénovirus

Les particules adénovirales, d'un diamètre de 60 à 110 nm selon les espèces, sont non enveloppées et constituées extérieurement d'une capsid de forme icosaédrique. La capsid est formée de trois protéines de structure : d'une part l'hexon qui constitue les faces de l'icosaèdre, et d'autre part la base du penton et la fibre qui s'associent pour former le complexe penton à chacun des 12 sommets. D'autres protéines virales de structure, dites « protéines ciment », participent à la stabilité de la capsid et sont indispensables à certaines étapes du cycle de réplication (Vellinga et al. 2005). D'autres protéines se retrouvent à l'intérieur de la capsid où elles sont plus ou moins étroitement liées au génome viral pour former une structure nucléoprotéique, le core viral. Le génome de l'adénovirus est un ADN bicaténaire linéaire de 30000 à 45000 paires de bases. Ce génome est subdivisé en plusieurs régions : la région E (Early) correspond aux gènes précoces impliqués dans la préparation de la cellule à la réplication de l'ADN viral (protéines fonctionnelles) et la région L (Late) correspond aux gènes transcrits tardivement et impliqués dans la formation des nouvelles particules virales (protéines structurales). Il existe 8 unités de transcription, 5 précoces (E1 à E5), 2 intermédiaires (gènes codant les protéines IX et IVa2), et une tardive (L). La région E1 est indispensable à la réplication virale et constitue un site de délétion de choix dans la synthèse de vecteurs non répliatifs. La région E3 code des protéines permettant l'échappement aux défenses antivirales de l'hôte et représente donc une autre région intéressante à

modifier.

2.1.2. Les adénovirus humains du sous groupe C et B

Les adénovirus humains sont classés en 6 sous groupes (A à F) qui regroupent 51 sérotypes (Flint 2002)(Russell 2009). Les sous-groupes C et B des adénovirus humains sont particulièrement étudiés en vaccination.

L'adénovirus humain de sérotype 5 (AdHu5) appartient au sous groupe C. Il a été, avec l'adénovirus humain de sérotype 2 (AdHu2), le premier type d'adénovirus qui a été modifié pour être déficient pour la réplication en déléant d'abord la région E1, région correspondant aux gènes précoces impliqués dans la préparation de la cellule à la réplication de l'ADN viral. Cette délétion permet de limiter la propagation du vecteur en empêchant sa réplication, et ce même chez l'espèce sensible. Puis d'autres vecteurs délétés dans les régions E1 et E3 ont été générés, permettant l'insertion de cassettes d'expression dont la taille peut dépasser 8kpb. La production des vecteurs non réplicatifs AdHu5 nécessite une lignée cellulaire complétant les fonctions E1 (Graham et al. 1977). Enfin, pour contrer la mise en place de l'immunité dirigée contre le vecteur et le produit du transgène, des vecteurs de deuxième, troisième ou dernière génération ont été créés par la délétion séquentielle des régions E2 et E4.

In vitro, des travaux ont montré que la fibre responsable de l'attachement au récepteur cellulaire des AdHu5 interagit à la surface cellulaire avec le récepteur primaire de forte affinité CAR (Coxsackie and Adenovirus Receptor), récepteur commun au virus coxsackie B3 (Bergelson et al. 1997)(Tomko et al. 1997). Le récepteur CAR est une glycoprotéine transmembranaire de la famille des immunoglobulines présente à la surface d'un grand nombre de cellules de mammifères, et notamment à la surface de nombreuses cellules humaines, ce qui explique le large tropisme des adénovirus (Howitt et al. 2003).

Un problème majeur qui limite l'utilisation de l'AdHu5 est l'existence d'une immunité préexistante qui est fréquemment rencontrée ; de plus, sa forte immunogénicité interfère sur les possibilités de ré-utilisation (rappel ou vaccination contre un autre antigène vectorisé par AdHu5). En conséquence de nouveaux vecteurs recombinants ont été développés. Ces vecteurs appartiennent au sous-

groupe B et sont de sérotypes 7, 11 et 35. Les adénovirus du sous-groupe B n'ont pas le même récepteur que les autres adénovirus. En effet, ces virus ne rentrent pas en compétition avec les adénovirus du sous-groupe C (ex AdHu5) lors de l'attachement aux cellules (Stevenson et al. 1995) et ils se lient ou utilisent la protéine CD46 comme récepteur pour se fixer à la cellule hôte (Gaggar et al. 2003). La protéine CD46 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée de manière ubiquitaire dans presque toutes les cellules humaines.

Les adénovirus humains ont été parmi les premiers virus à être utilisés dans le cadre de la thérapie génique. Cependant la limite majeure de ce système est l'expression des transgènes qui se fait à des niveaux élevés mais seulement de façon transitoire. On attribue ce phénomène à 1) l'activité cytotoxique du virus, 2) à la reconnaissance des antigènes viraux exprimés à la surface des cellules transfectées par les cellules cytotoxiques et 3) à l'absence de mécanismes permettant d'assurer la persistance intracellulaire du vecteur. Par ailleurs, les adénovirus induisent une forte réponse immunitaire contre eux mêmes, ce qui limite les possibilités d'injections multiples. Enfin de nombreux patients sont déjà porteurs d'anticorps anti-adénovirus, notamment contre l'AdHu5, acquis au cours d'infections naturelles. Ainsi, ce profil d'expression ne convient pas à la correction à long terme d'une maladie chronique mais est adapté à la destruction ciblée de cellules, aux protocoles d'immunothérapie et aux maladies aiguës (Poller et al. 2006). C'est pourquoi, ils sont utilisés dans des essais cliniques immunothérapeutiques contre le cancer (Ekblad & Halldén 2010)(Guse & A Hemminki 2009)(Kanerva & Akseli Hemminki 2005). Leur efficacité de transduction s'allie dans ce cas à leur cytotoxicité et à leur immunogénicité.

2.1.3. Les adénovirus canins

La majorité des vecteurs adénoviraux vaccinaux développés sont d'origine humaine, néanmoins de nombreux vecteurs sont aujourd'hui dérivés d'autres espèces d'adénovirus, notamment issus de mammifères non humains, ce qui pose moins de problèmes en termes de biosécurité et d'immunité préexistante chez l'homme. En particulier, les adénovirus canins représentent l'espèce d'adénovirus

non primate la plus étudiée pour des visées de vaccination et de thérapie génique.

La première observation d'infection adénovirale de canidés remonte à 1925 chez des renards sauvages atteints d'hépatite aiguë (Green 1925). Dans les années 40, cette forme d'infection fut observée chez des chiens et prit le nom d'hépatite infectieuse canine, ou hépatite de Rubarth. Dans les années 50, les observations de cette infection se multiplient, le virus responsable est découvert et apparenté aux adénovirus (Kapsenberg 1959). Ce virus, responsable d'hépatites graves, correspond au sérotype 1 de l'adénovirus canin (Cav1). En 1953, un autre type d'adénovirus, responsable d'infections de type respiratoire fut observé chez le chien (Prier 1956). Fortement homologue de Cav1 mais causant des infections très différentes, ce virus correspond au sérotype 2 de l'adénovirus canin (Cav2).

Le Cav2 atténué est couramment utilisé comme vaccin chez les chiens contre l'hépatite de Rubarth et la toux du chenil (Powell 1979). Il a été observé que l'administration par voie orale de souches atténuées de Cav2 induit une réponse aux lymphocytes B de la même façon qu'une infection naturelle chez des canidés comme le renard ou le raton laveur (Sumner et al. 1988).

Dès la fin des années 90, face aux problèmes d'immunité acquise contre les sérotypes humains d'adénovirus, l'utilisation de vecteurs dérivés d'adénovirus non humains s'est développée. L'utilisation courante de Cav2 en vaccination chez le chien depuis de nombreuses années, le recul sur son innocuité et son immunogénicité, le désigne comme un candidat de choix en vectorologie. Rapidement, un système déficient est créé par délétion de la région E1 (Cav2-*d*) (B Klonjowski et al. 1997) et son utilisation est envisagée en thérapie génique chez l'homme (E J Kremer et al. 2000). Le Cav2-*d* est peu inflammatoire chez la souris, il est capable de transduire de façon efficace les neurones et les cellules du tractus respiratoire et il permet une expression à long terme des transgènes qu'il exprime (Keriel et al. 2006)(Soudais et al. 2001).

2.2. Utilisation vaccinale des adénovirus

Les adénovirus sont intrinsèquement fortement inflammatoires et immunogènes. Ils induisent des anticorps neutralisants anti-adénovirus, spécifiques

de sérotypes. Ils induisent des réponses T CD4⁺ et T CD8⁺ qui croisent entre plusieurs sérotypes, à la fois chez l'homme et la souris (Lasaro & Hildegund Cj Ertl 2009).

Les adénovirus recombinants, le plus souvent de type AdHu5 délétés en E1 ou E1 et E3, induisent de très bonnes réponses T et B contre les transgènes (Xiang et al. 1996)(He et al. 2000). En particulier, la réponse T CD8⁺ spécifique du transgène est le plus souvent très importante, environ 10 fois supérieure à la réponse T CD4⁺, qui est plutôt de type Th1. Toutefois l'existence d'anticorps anti-AdHu5 pré-existants nuit à la réponse contre le transgène. La réponse T CD8⁺ est de longue durée, et la phase de contraction de la population T CD8⁺ après le pic de réponse, est particulièrement limitée (T. C. Yang et al. 2007). Cette forte réponse T CD8⁺ a été montrée dans plusieurs modèles précliniques (Idoyaga et al. 2011)(Trumpfheller et al. 2006)(Idoyaga et al. 2011) et aussi chez l'homme (O'Brien et al. 2009). Elle serait liée à un long maintien d'expression du transgène dans les ganglions lymphatiques (>30 jours). Ainsi les adénovirus recombinants AdHu5 ont été utilisés chez la souris et chez des macaques pour vacciner efficacement contre la malaria, le virus influenza, les leishmanies, mycobacterium tuberculosis, la dengue et la rage (Lasaro & Hildegund Cj Ertl 2009). Des vaccins thérapeutiques contre des oncoprotéines de papillomavirus ou contre un antigène de mélanome tel que « Melanoma Antigen Recognized by T-cells » (MART-1) se sont montrés efficaces chez la souris (Lasaro & Hildegund Cj Ertl 2009). En particulier, le virus HIV-1 a été ciblé par des adénovirus recombinants AdHu5 et 11 codant pour les protéines Gag, Pol et Nef dans un essai clinique de phase 2. En effet, les lymphocytes T CD8⁺ prennent souvent pour cibles des protéines internes virales conservées entre les isolats du HIV-1, et ils semblent jouer un rôle dans la protection contre le virus. Dans cet essai clinique, des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques du HIV ont été induits chez les patients mais aucune efficacité protectrice n'a pu être démontrée. Plus grave, les individus séropositifs pour les adénovirus et vaccinés par l'adénovirus recombinant HIV Gag/pol/nef ont présenté un taux d'infection supérieur aux individus non vaccinés. L'hypothèse proposée est que la vaccination par l'adénovirus favorise l'activation et l'expansion des lymphocytes T CD4⁺, notamment dans les muqueuses, qui sont les cibles du HIV-1 (Benlahrech et al. 2009).

Comme dit plus haut, des adénovirus de sérotypes plus rares, pour lesquels il n'y a pas ou peu de réponses pré-existantes, ont aussi été testés. En particulier

l'AdHu35 est prometteur, et il s'est révélé efficace dans des tests précliniques contre la malaria chez la souris et contre la tuberculose chez le singe (Lasaro & Hildegund Cj Ertl 2009).

Le Cav2 a également montré un potentiel vaccinal recombinant. En effet, le Cav2-*d* exprimant la glycoprotéine Gn du virus de Séoul responsable de fièvre hémorragique, induit une protection complète (humorale et cellulaire) contre l'infection par le virus Séoul chez la souris (Yuan et al. 2009). D'autre part, un vecteur Cav2 codant pour la glycoprotéine de l'enveloppe et la protéine Gag du virus de l'immunodéficience féline s'est révélé inducteur d'anticorps chez le chat, mais là encore, ce virus recombinant s'est montré facilitant l'infection (Bernard Klonjkowski et al. 2009). Un virus Cav2 codant pour la glycoprotéine 5 (GP5) du virus « porcine reproductive and respiratory syndrome » (PRRS) s'est montré aussi inducteur d'anticorps neutralisants et inducteur de réponses T prolifératives spécifiques de la GP5 (Zhou et al. 2010). Enfin, en collaboration avec le groupe de Bernard Klonjkowski de l'Ecole Vétérinaire de Maisons-Alfort, mon équipe, dans des travaux auxquels j'ai participé, a montré que le Cav2 induisait des réponses T CD4⁺, T CD8⁺ et une réponse anticorps contre la glycoprotéine G de la rage chez le mouton (Bouet-Cararo et al. 2011).

2.3. Interaction des adénovirus avec les CD

Les CD sont des cellules clé de l'initiation de l'immunité. Il était important de déterminer si les adénovirus interagissent avec les CD directement ou indirectement, s'ils peuvent les transduire (c'est à dire les infecter et y exprimer le transgène) et les activer pour induire une réponse immune et si leur interaction avec les CD peut être modulée en vue de leur amélioration vaccinale.

Des travaux ont montré que l'AdHu5 transduit les CD *in vitro* et *in vivo* (Lindsay et al. 2010) chez la souris et *in vitro* chez l'homme (Loré et al. 2007). Pourtant le récepteur CAR n'est pas ou peu exprimé par les CD en général. Il semble que les récepteurs de l'AdHu5 sur les CD soient des molécules de la famille des intégrines et qu'ils puissent faire intervenir la lactoferrine par un mécanisme dépendant de DC-SIGN (W. C. Adams et al. 2009). Chez l'homme, l'AdHu5 transduit

davantage les CD dérivées de la peau (cellules de Langerhans et dermales) que les CD maturées *in vitro* à partir des monocytes en présence de GM-CSF et d'IL-4, peut être en raison de l'expression de CAR qui est un peu plus importante sur les CD de la peau (W. C. Adams et al. 2009). Chez l'homme, toujours *in vitro*, il transduit davantage les CDc que les pDC (Loré et al. 2007). L'AdHu35, qui utilise le CD46 pour l'entrée dans les CD (CDc et pDC), transduit plus facilement les CD humaines que ne le fait l'AdHu5, en particulier des CD dermales semi-matures de la peau (De Gruijl et al. 2006). En conséquence l'induction de réponses T CD8⁺ polyfonctionnelles mémoires par les CDc et pDC est plus importante avec l'AdHu35 qu'avec l'AdHu5 (Loré et al. 2007). *In vivo* chez la souris, AdHu5 transduit davantage les CD CD11b⁺ que les CD CD8α⁺. Pourtant, ce sont les CD CD8α⁺ qui se sont révélées les plus capables d'activer la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du transgène codé par l'AdHu5 (Lindsay et al. 2010).

Il semble que l'activation des lymphocytes T CD8⁺ par les CD suite à l'immunisation par l'AdHu5 soit partiellement dépendante de MyD88 et pas de l'inflammasome (NALP3) (Lindsay et al. 2010). Globalement *in vivo*, la réponse immune induite par l'AdHu5 et les autres adénovirus humains tels l'AdHu35 et AdHu26 est indépendante de l'IL-1 mais elle est partiellement dépendante de MyD88, surtout la réponse T CD8⁺. Par contre, aucun TLR particulier ne semble impliqué de manière majeure (Rhee et al. 2011). On propose que ce sont plusieurs TLR conjugués qui contrôlent en partie la réponse, ou qu'un ligand nouveau, distinct des TLR mais dépendant de MyD88, soit impliqué. L'induction d'IFN-I dans les pDC par l'adénovirus fait intervenir le TLR9. Par contre, l'induction d'IFN-I dans les CDc ne paraît pas impliquer la voie MyD88, mais une voie encore non explorée, impliquant la voie des jun-kinases (Fejer et al. 2008).

Enfin le Cav2, bien que capable d'induire des réponses immunes contre des transgènes *in vivo*, ne paraît pas capable de transduire efficacement des CD humaines dérivées *in vitro* à partir de monocytes, ni de les activer (Perreau et al. 2007). Ceci serait en lien avec l'utilisation de récepteurs et de voies endosomales différentes entre AdHu5 et Cav2, qui ne permettent pas la sortie endosomale nécessaire à la réplication du Cav2.

Au total, les différents adénovirus sont des vecteurs immunogéniques intéressants mais qui peuvent être encore perfectionnés. En fonction de leur espèce

et sérotype, ils paraissent interagir différemment avec les sous-populations de CD d'origines tissulaires différentes en utilisant des voies de transduction et des mécanismes encore peu connus.

BIBLIOGRAPHIE

- Abadie, V. et al., 2009. Original encounter with antigen determines antigen-presenting cell imprinting of the quality of the immune response in mice. *PloS One*, 4(12), p.e8159.
- Adams, W.C. et al., 2009. Adenovirus serotype 5 infects human dendritic cells via a coxsackievirus-adenovirus receptor-independent receptor pathway mediated by lactoferrin and DC-SIGN. *The Journal of General Virology*, 90(Pt 7), p.1600-1610.
- Awasthi, A. & Kuchroo, V.K., 2009. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *International Immunology*, 21(5), p.489-498.
- Bachem, A. et al., 2010. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(6), p.1273-1281.
- Benlahrech, A. et al., 2009. Adenovirus vector vaccination induces expansion of memory CD4 T cells with a mucosal homing phenotype that are readily susceptible to HIV-1. , 106(47), p.19940-19945.
- Bergelson, J.M. et al., 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5304), p.1320-1323.
- Bett, A.J., Prevec, L. & Graham, F.L., 1993. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *Journal of Virology*, 67(10), p.5911-5921.
- Bonifaz, L.C. et al., 2004. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(6), p.815-824.
- Bouet-Cararo, C. et al., 2011. Canine adenoviruses elicit both humoral and cell-mediated immune responses against rabies following immunisation of sheep. *Vaccine*, 29(6), p.1304-1310.
- Bozzacco, L. et al., 2007. DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(4), p.1289-1294.

- Bujdoso et al., 1989. Characterization of sheep afferent lymph dendritic cells and their role in antigen carriage. *The Journal of Experimental Medicine*, 170(4), p.1285-1301.
- Bursch, L.S. et al., 2007. Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(13), p.3147 -3156.
- Buschow, S.I. & Figdor, C.G., 2010. Dendritic cell subsets digested: RNA sensing makes the difference! *Immunity*, 32(2), p.149-151.
- Caminschi, I. et al., 2008. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood*, 112(8), p.3264-3273.
- Candido, K.A. et al., 2001. Local administration of dendritic cells inhibits established breast tumor growth: implications for apoptosis-inducing agents. *Cancer Research*, 61(1), p.228-236.
- Cheong, C. et al., 2010. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell*, 143(3), p.416-429.
- Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y.-J., 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol*, 5(12), p.1219-1226.
- Contreras, V. et al., 2010. Existence of CD8_L-Like Dendritic Cells with a Conserved Functional Specialization and a Common Molecular Signature in Distant Mammalian Species. *The Journal of Immunology*, 185(6), p.3313 -3325.
- Cortez-Gonzalez, X. & Zanetti, M., 2010. Identification of immunogenic peptides of the self-tumor antigen: our experience with telomerase reverse transcriptase. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 651, p.211-225.
- Crozat, K. et al., 2010. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 α ⁺ dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(6), p.1283-1292.
- De Gregorio, E., D'Oro, U. & Wack, A., 2009. Immunology of TLR-independent vaccine adjuvants. *Current Opinion in Immunology*, 21(3), p.339-345.
- Dhodapkar, M.V. et al., 1999. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 104(2), p.173-180.
- Di Nicola, M. et al., 1998. Gene transfer into human dendritic antigen-presenting cells by vaccinia virus and adenovirus vectors. *Cancer Gene Therapy*, 5(6), p.350-356.

- Drillien, R., Spohner, D. & Hanau, D., 2004. Modified vaccinia virus Ankara induces moderate activation of human dendritic cells. *The Journal of General Virology*, 85(Pt 8), p.2167-2175.
- Dudziak, D. et al., 2007. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5808), p.107-111.
- Edelson, B.T. et al., 2010. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8+ conventional dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(4), p.823 -836.
- Ekblad, M. & Halldén, G., 2010. Adenovirus-based therapy for prostate cancer. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 12(4), p.421-431.
- Epardaud, M. et al., 2004. Enrichment for a CD26hi SIRP- subset in lymph dendritic cells from the upper aero-digestive tract. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(3), p.553 -561.
- Fazilleau, N. et al., 2007. Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells. *Nature Immunology*, 8(7), p.753-761.
- Fejer, G. et al., 2008. Key role of splenic myeloid DCs in the IFN- α response to adenoviruses in vivo. *PLoS Pathogens*, 4(11), p.e1000208.
- Flint, S.J., 2002. Adenoviruses. Dans John Wiley & Sons, Ltd, éd. *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0000409/full>
- Frailery, D., Zosso, N. & Nardelli-Haeffliger, D., 2009. Rectal and vaginal immunization of mice with human papillomavirus L1 virus-like particles. *Vaccine*, 27(17), p.2326-2334.
- Gaggar, A., Shayakhmetov, D.M. & Lieber, André, 2003. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nature Medicine*, 9(11), p.1408-1412.
- Galibert, L. et al., 2005. Nectin-like Protein 2 Defines a Subset of T-cell Zone Dendritic Cells and Is a Ligand for Class-I-restricted T-cell-associated Molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 280(23), p.21955 -21964.
- Ginhoux, F. et al., 2009. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(13), p.3115 -3130.
- Graham, F.L. et al., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of General Virology*, 36(1), p.59-74.
- Green, R.G., 1925. THE ETIOLOGY OF CANINE DISTEMPER. *Science (New York, N.Y.)*, 62(1597), p.133-134.

- de Gruijl, T.D. et al., 2006. Intradermal delivery of adenoviral type-35 vectors leads to high efficiency transduction of mature, CD8⁺ T cell-stimulating skin-emigrated dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(4), p.2208-2215.
- Guerra, S. et al., 2007. Distinct Gene Expression Profiling after Infection of Immature Human Monocyte-Derived Dendritic Cells by the Attenuated Poxvirus Vectors MVA and NYVAC. *Journal of Virology*, 81(16), p.8707-8721.
- Guse, K. & Hemminki, A, 2009. Cancer gene therapy with oncolytic adenoviruses. *Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 14 Suppl 1, p.S7-15.
- Harenberg, A. et al., 2008. Gene profiling analysis of ALVAC infected human monocyte derived dendritic cells. *Vaccine*, 26(39), p.5004-5013.
- He, Z. et al., 2000. Viral recombinant vaccines to the E6 and E7 antigens of HPV-16. *Virology*, 270(1), p.146-161.
- Hong, D.K. et al., 2010. Cationic Lipid/DNA Complex-Adjuvanted Influenza A Virus Vaccination Induces Robust Cross-Protective Immunity. *J. Virol.*, 84(24), p.12691-12702.
- Hou, B., Reizis, B. & DeFranco, A.L., 2008. Toll-like receptors activate innate and adaptive immunity by using dendritic cell-intrinsic and -extrinsic mechanisms. *Immunity*, 29(2), p.272-282.
- Howitt, J., Anderson, C.W. & Freimuth, P., 2003. Adenovirus interaction with its cellular receptor CAR. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 272, p.331-364.
- Hsu, F.J. et al., 1996. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Medicine*, 2(1), p.52-58.
- Ianaro, A., Tersigni, M. & D'Acquisto, F., 2009. New insight in LPS antagonist. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(3), p.306-317.
- Ichinohe, T. et al., 2005. Synthetic Double-Stranded RNA Poly(I:C) Combined with Mucosal Vaccine Protects against Influenza Virus Infection. *Journal of Virology*, 79(5), p.2910-2919.
- Idoyaga, J. et al., 2011. Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(6), p.2384-2389.
- Ismaili, J. et al., 2002. Monophosphoryl Lipid A Activates Both Human Dendritic Cells and T Cells. *The Journal of Immunology*, 168(2), p.926 -932.

- KAPSENBERG, J.G., 1959. Relationship of infectious canine hepatitis virus to human adenovirus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 101, p.611-614.
- Kanerva, A. & Hemminki, Akseli, 2005. Adenoviruses for treatment of cancer. *Annals of Medicine*, 37(1), p.33-43.
- Kemény, L. & Nagy, N., 2010. [New perspective in immunotherapy: local imiquimod treatment]. *Orvosi Hetilap*, 151(19), p.774-783.
- Keriel, A. et al., 2006. Canine adenovirus vectors for lung-directed gene transfer: efficacy, immune response, and duration of transgene expression using helper-dependent vectors. *Journal of Virology*, 80(3), p.1487-1496.
- Khader, S.A. et al., 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nature Immunology*, 8(4), p.369-377.
- Klechevsky, E. et al., 2010. Cross-priming CD8+ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood*, 116(10), p.1685-1697.
- Klonjowski, B et al., 1997. A recombinant E1-deleted canine adenoviral vector capable of transduction and expression of a transgene in human-derived cells and in vivo. *Human Gene Therapy*, 8(17), p.2103-2115.
- Klonjowski, Bernard et al., 2009. Gag-specific immune enhancement of lentiviral infection after vaccination with an adenoviral vector in an animal model of AIDS. *Vaccine*, 27(6), p.928-939.
- Kremer, E J et al., 2000. Canine adenovirus vectors: an alternative for adenovirus-mediated gene transfer. *Journal of Virology*, 74(1), p.505-512.
- Lasaro, M.O. & Ertl, Hildegund Cj, 2009. New Insights on Adenovirus as Vaccine Vectors. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(8), p.1333-1339.
- Lindsay, R.W.B. et al., 2010. CD8+ T cell responses following replication-defective adenovirus serotype 5 immunization are dependent on CD11c+ dendritic cells but show redundancy in their requirement of TLR and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor signaling. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(3), p.1513-1521.
- Liu et al., Y.-J., 2005. IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annual Review of Immunology*, 23(1), p.275-306.

- Liu, M.A., 2010. Immunologic basis of vaccine vectors. *Immunity*, 33(4), p.504-515.
- Loré, K. et al., 2007. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells are susceptible to recombinant adenovirus vectors and stimulate polyfunctional memory T cell responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(3), p.1721-1729.
- Mastrangelo, M.J. et al., 2000. Poxvirus vectors: orphaned and underappreciated. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(8), p.1031-1034.
- Melief, C.J.M. & van der Burg, S.H., 2008. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nature Reviews. Cancer*, 8(5), p.351-360.
- Mikkelsen, M. et al., 2011. Enhanced and Sustained CD8+ T Cell Responses with an Adenoviral Vector-Based Hepatitis C Virus Vaccine Encoding NS3 Linked to the MHC Class II Chaperone Protein Invariant Chain. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*.
- Murphy, B.R. & Whitehead, S.S., 2010. Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine. *Annual Review of Immunology*.
- Neilan, J.G. et al., 2004. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology*, 319(2), p.337-342.
- O'Brien, K.L. et al., 2009. Adenovirus-specific immunity after immunization with an Ad5 HIV-1 vaccine candidate in humans. *Nature Medicine*, 15(8), p.873-875.
- PRIER, J.E., 1956. Preliminary studies on a canine respiratory disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 129(11), p.516-518.
- Pétrilli, V. et al., 2007. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 19(6), p.615-622.
- Pascale, F. et al., 2008. Plasmacytoid Dendritic Cells Migrate in Afferent Skin Lymph. *The Journal of Immunology*, 180(9), p.5963 -5972.
- Perreau, M. et al., 2007. Contrasting effects of human, canine, and hybrid adenovirus vectors on the phenotypical and functional maturation of human dendritic cells: implications for clinical efficacy. *Journal of Virology*, 81(7), p.3272-3284.
- Poller, W. et al., 2006. New therapeutic targets in chronic viral cardiomyopathy. *Ernst Schering Research Foundation Workshop*, (55), p.287-303.
- Poulin, L.F. et al., 2010. Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(6), p.1261-1271.

- Powell, K.W., 1979. Use of canine adenovirus type 2 vaccine to control kennel cough syndrome. *Veterinary Medicine, Small Animal Clinician: VM, SAC*, 74(6), p.801-804.
- Pulendran, B., 2009. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. *Nat Rev Immunol*, 9(10), p.741-747.
- Querec, T.D. et al., 2009. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol*, 10(1), p.116-125.
- ROWE, W.P. et al., 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 84(3), p.570-573.
- Ragot, T. et al., 1993. Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature*, 361(6413), p.647-650.
- Ramakrishna, V. et al., 2007. Toll-like receptor activation enhances cell-mediated immunity induced by an antibody vaccine targeting human dendritic cells. *Journal of Translational Medicine*, 5, p.5.
- Rerks-Ngarm, S. et al., 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *The New England Journal of Medicine*, 361(23), p.2209-2220.
- Rhee, E.G. et al., 2011. Multiple innate immune pathways contribute to the immunogenicity of recombinant adenovirus vaccine vectors. *Journal of Virology*, 85(1), p.315-323.
- Robbins, S.H. et al., 2008. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biology*, 9(1), p.R17-R17.
- Rodriguez, Ana et al., 1999. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol*, 1(6), p.362-368.
- Russell, W.C., 2009. Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol*, 90(1), p.1-20.
- Seubert, A. et al., 2008. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(8), p.5402-5412.
- So, T., Lee, S.-W. & Croft, M., 2008. Immune regulation and control of regulatory T cells by OX40 and 4-1BB. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 19(3-4), p.253-262.
- Soudais, C., Boutin, S. & Kremer, E J, 2001. Characterization of cis-acting sequences involved in canine adenovirus packaging. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 3(4), p.631-640.

- Stevenson, S.C. et al., 1995. Human adenovirus serotypes 3 and 5 bind to two different cellular receptors via the fiber head domain. *Journal of Virology*, 69(5), p.2850-2857.
- Stockfleth, E. et al., 2003. The use of Toll-like receptor-7 agonist in the treatment of basal cell carcinoma: an overview. *The British Journal of Dermatology*, 149 Suppl 66, p.53-56.
- Stratford-Perricaudet, L.D. et al., 1990. Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector. *Human Gene Therapy*, 1(3), p.241-256.
- Sumner, J.W. et al., 1988. Oral administration of an attenuated strain of canine adenovirus (type 2) to raccoons, foxes, skunk, and mongoose. *American Journal of Veterinary Research*, 49(2), p.169-171.
- Surls, J. et al., 2010. Differential effect of CD4⁺Foxp3⁺ T-regulatory cells on the B and T helper cell responses to influenza virus vaccination. *Vaccine*, 28(45), p.7319-7330.
- Szabo, S.J. et al., 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100(6), p.655-669.
- Tacke, P.J. et al., 2005. Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood*, 106(4), p.1278-1285.
- Taylor, P., Tamura, T. & Ozato, K., 2006. IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells. *Cell Research*, 16(2), p.134-140.
- Tewari, K. et al., 2010. Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4⁺ T cell responses to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein (CSP) and [alpha]DEC-CSP in non human primates. *Vaccine*, 28(45), p.7256-7266.
- Tomko, R.P., Xu, R. & Philipson, L., 1997. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), p.3352-3356.
- Trumpheller, C. et al., 2006. Intensified and protective CD4⁺ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(3), p.607-617.
- Ulrich, J.T. & Myers, K.R., 1995. Monophosphoryl lipid A as an adjuvant. Past experiences and new directions. *Pharmaceutical Biotechnology*, 6, p.495-524.

- Velasquez, L.S. et al., 2010. An intranasally delivered Toll-like receptor 7 agonist elicits robust systemic and mucosal responses to Norwalk virus-like particles. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 17(12), p.1850-1858.
- Vellinga, J., Van der Heijdt, S. & Hoeben, R.C., 2005. The adenovirus capsid: major progress in minor proteins. *The Journal of General Virology*, 86(Pt 6), p.1581-1588.
- Villadangos, J.A., 2001. Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Molecular Immunology*, 38(5), p.329-346.
- Vollmer, J. & Krieg, A.M., 2009. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(3), p.195-204.
- Watts, C., 2004. The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat Immunol*, 5(7), p.685-692.
- Xiang, Z.Q. et al., 1996. A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology*, 219(1), p.220-227.
- Yang, T.C. et al., 2007. T-cell immunity generated by recombinant adenovirus vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 6(3), p.347-356.
- Yuan, Z.-G. et al., 2009. A single immunization with a recombinant canine adenovirus type 2 expressing the seoul virus Gn glycoprotein confers protective immunity against seoul virus in mice. *Vaccine*, 27(38), p.5247-5251.
- Zheng, W. & Flavell, R.A., 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, 89(4), p.587-596.
- Zhou, J.-X. et al., 2010. Immune responses in pigs induced by recombinant canine adenovirus 2 expressing the glycoprotein 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Research Communications*, 34(4), p.371-380.