

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
ECOLE DOCTORALE « HOMME, ENVIRONNEMENT, SANTE »

Thèse en vue de l'obtention du titre de docteur en
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
Discipline : Immunologie

CARACTERISATION ET INFLUENCE DES LYMPHOCYTES T CD4
ANTI-TELOMERASE DANS LES CANCERS

Présentée et soutenue publiquement le 3 Décembre 2012 par

Magalie DOSSET

Sous la direction de M. le Professeur Olivier ADOTEVI

JURY

Professeur Christophe BORG, Université de Franche-Comté de Besançon	Examineur
Professeur François GHIRINGHELLI, Faculté de Médecine de Dijon	Rapporteur
Docteur Nathalie LABARRIERE, Université de Nantes	Rapporteur
Professeur Eric TARTOUR, Université Paris Descartes de Paris	Examineur

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de deux laboratoires : le laboratoire "Immunothérapie et traitement anti-angiogénique en cancérologie" de l'UMR970 à Paris et le laboratoire "Interaction Hôte-Greffon-Tumeur et Ingénierie Cellulaire et Génique" de l'UMR1098 à Besançon. Je remercie donc le Professeur Eric TARTOUR, le Professeur Philippe SAAS et le Professeur Christophe BORG qui m'ont accueillie dans leur laboratoire et équipe de recherche respectifs.

Je souhaite également témoigner ma reconnaissance aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Merci en particulier au Docteur Nathalie LABARRIERE et au Professeur François GHIRINGHELLI qui ont accepté de lire et d'évaluer la qualité de ce travail effectué durant ces 4 années de thèse.

Je souhaite remercier la Ligue Nationale Contre le Cancer et la Fondation ARC pour leur soutien financier qui m'a permis de préparer cette thèse.

A mon directeur de thèse, le Professeur Olivier ADOTEVI, qui m'a encadrée et formée depuis mon Master. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée et son soutien indéfectible. Grâce à ses qualités de pédagogue, à son enthousiasme et sa bonne humeur permanente il a toujours su faire émerger le côté agréable et scientifiquement stimulant de ce long et laborieux travail de thèse.

Je tiens à adresser toute ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont permis de mener à bien ces travaux de recherche. Merci en particulier au Docteur Yann GODET ainsi qu'à mes collègues doctorants Charline VAUCHY et Laurent BEZIAUD pour leur aide précieuse et intensive dans la finalisation de ce travail.

Merci à l'ensemble de mes collègues qui m'ont permis de travailler dans un cadre des plus agréables et qui m'ont témoigné jusqu'au bout leurs encouragements. Petite pensée en particulier aux autres thésards, je vous souhaite à tous plein de manips qui marchent et des publications à foison !

Je n'oublie pas non plus mon ex-camarade de thèse, le Docteur Federico SANDOVAL, qui a gradué avant moi. Merci à toi aussi pour ton soutien et ton amitié.

Aux différents stagiaires de Master : Marie-Christine LIENAFI, Jennifer ARTHUR et Virginie POUPENEY avec qui j'ai apprécié de partager ces quelques mois de partenariat.

A toutes les personnes de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, de l'Institut Pasteur, de l'HEGP, du CEA et de l'EFS que j'ai eu le plaisir de côtoyer au cours de ces années.

A mes ami(e)s, en particulier Couti pour son soutien de tous les jours par mails et par textos.

A ma mère et ma grand-mère qui, malgré la distance, ont toujours été très présentes et ont toujours su me redonner du courage dans les moments les plus difficiles. En espérant à l'avenir un vol toujours aussi lointain...

A mon grand-père qui aurait été très fier de me voir me hisser au sommet du Mont Doctorat.

RESUME

L'histoire naturelle du cancer implique des interactions entre la tumeur et les mécanismes de défense de l'hôte, tout particulièrement avec le système immunitaire adaptatif. Ainsi la transformation de cellules normales en cellules malignes peut engendrer l'expression d'antigènes tumoraux reconnus par les lymphocytes T. Plusieurs sous-populations de lymphocytes T (LT) CD4 contrôlent les réponses antitumorales, parmi elles, les LT CD4 helper de type-1 (Th1) jouent un rôle activateur majeur de l'immunité à médiation cellulaire antitumorale. Ils deviennent actifs grâce à la reconnaissance des peptides de 15 à 20 acides aminés dérivés d'antigènes tumoraux et présentés par les molécules HLA de classe II. Ils sont nécessaires à l'induction et la fonction des cellules effectrices dirigées contre les tumeurs notamment les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL). De plus la présence de lymphocytes CD4 Th1 infiltrant les tumeurs est souvent associée à un bon pronostic chez les patients.

A l'aide d'un modèle *in vitro* chez l'homme et *in vivo* chez des souris transgéniques HLA, nous avons identifié quatre nouveaux peptides CD4 dérivés de la télomérase (TERT) un antigène de tumeur exprimé dans la majorité des cancers humains. Ces peptides appelés «Universal Cancer Peptide, UCP» se lient à la majorité des allèles HLA-DR et sont capables d'activer spécifiquement les LT CD4 de type-1.

Des LT CD4 circulants spécifiques des UCP sont naturellement détectables dans plusieurs cancers humains mais absents chez des individus sains. Des clones T CD4 spécifiques des UCP générés à partir des lymphocytes de patients, produisent de forts taux d'IFN γ , TNF α , et d'IL-2, cytokines associées à la polarisation Th1. L'analyse par ELISPOT IFN γ , de LT CD4 anti-UCP circulants au sein d'une cohorte de 84 patients atteints de cancers bronchiques métastatiques a montré la présence naturelle de ces lymphocytes chez 38 % des patients. De plus un effet bénéfique de la présence de cette réponse sur la survie globale a été observé chez les patients ayant une réponse clinique objective après chimiothérapie (13 vs 10 mois, $P < 0.003$). *In vivo*, l'immunisation de souris transgéniques HLA-A2/HLA-DR1 (Tg A2/DR1) avec les peptides UCP stimule des réponses T CD4 spécifiques caractérisées par une polarisation Th1. Nous avons montré que la présence *in vivo* de LT CD4 anti-UCP est nécessaire pour l'induction de réponses CTL antitumorales efficaces. Ainsi chez des souris co-immunisées en présence d'un peptide UCP, on observe un accroissement en nombre et de la qualité des réponses CTL proportionnellement à l'aide délivrée par les LT CD4 anti-UCP. L'induction de LT CD4 anti-UCP s'accompagne également d'une activation des cellules dendritiques *in vivo* via un mécanisme impliquant CD40L, IFN γ et GM-CSF. Dans un modèle de mélanome transplantable chez les souris Tg A2/DR1 nos résultats ont montré qu'une vaccination thérapeutique comportant un peptide UCP favorise un meilleur recrutement de CTL fonctionnels dans les tumeurs et améliore ainsi l'efficacité antitumorale du vaccin.

Ces résultats confirment le rôle antitumoral majeur des lymphocytes CD4 Th1 et soulignent l'intérêt clinique de stimuler des réponses T CD4 spécifiques d'antigènes tumoraux de relevance clinique comme TERT.

Mots Clés : lymphocytes T CD4, peptide helper restreint HLA-DR, télomérase, CTL, tumeur

ABSTRACT

Recent advances in immunology have now validated the concept of cancer immunosurveillance and the leading role of adaptative T cell immunity. Until a few years ago, antitumor CD8 T cell responses have been the most studied due to their direct cytotoxic activity on tumor cells. On the other hand, study of antitumor CD4 T cell responses are even more challenging because of the heterogeneity and plasticity of the various CD4 T cells subpopulations described. Among them, CD4 T helper type-1 cells (Th1), mainly characterized by the production of IFN γ , control the activation of antitumor cellular immunity. Thus, stimulation of specific CD4 Th1 cells may have a major interest for the development of anticancer immunotherapies. During this research thesis, we characterized novel HLA class II epitopes derived from a relevant tumor antigen, telomerase (TERT), and studied their capacities to stimulate specific CD4 Th1 cell responses.

Using a method based on predictive immunology, we identified 4 peptides derived from TERT, referred as « Universal Cancer Peptides » (UCPs), enable to bind the most commonly found HLA-DR alleles in human. Using HLA-A2/HLA-DR1 transgenic mouse model, we first evaluated the *in vivo* immunogenicity of these peptides. Immunization of mice with UCPs induces high avidity specific CD4 T cells. The study of their polarization showed that UCP-specific CD4 T cells do not produce IL-4, -5, -10 or -17 cytokines, excluding a Th1, Treg or Th17 differentiation. In contrast, we measured high amount of IFN γ and IL-2 which characterize a Th1 pattern. The study of helper role allow us to demonstrate that CD8 peptide-based vaccinations in presence of UCPs enhance the efficacy of tumor specific CTL responses. Indeed, the intensity of these responses is strongly correlated with that of UCP-specific CD4 T cells induced *in vivo*. Furthermore, the stimulation of UCP-specific CD4 T cells promotes activation and IL-12 release by dendritic cells through a mechanism that involves IFN γ , GM-CSF and CD40L. We also demonstrated the antitumor efficacy of UCPs during a therapeutic vaccination in mice, as well as their capacity to foster the recruitment of specific CD8 T cells at the tumor site. In addition, the presence of naturally occurring UCP-specific CD4 T cell responses was found in different types of cancers such as leukemia, lung, colorectal or renal cancers. A study conducted in a cohort of 84 metastatic lung cancer patients revealed a synergistic effect of spontaneous UCP-specific CD4 Th1 and chemotherapy-treatment.

Altogether, this study provides further evidences that stimulation of antitumor CD4 Th1 cells is a powerful method to improve cancer vaccines and also highlights the interest of TERT-derived UCPs for the innovative monitoring of antitumor CD4 T cell responses.

Keywords : CD4 helper T cells, HLA-DR restricted peptide, telomerase, CTL, cancer

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
LISTE DES FIGURES.....	8
LISTE DES TABLEAUX.....	9
AVANT-PROPOS.....	10
 CONTEXTE SCIENTIFIQUE	 12
 I. LES REPONSES T CD4 ANTITUMORALES.....	 13
1. ROLE DES DIFFERENTES SOUS-POPULATIONS DE LT CD4 DANS LES CANCERS	13
1.1. LES REPONSES T CD4 ACTIVATRICES.....	14
1.1.1. Différenciation et rôle des Th1	14
1.1.2. Nouvelle population de LT CD4 à activité antitumorale : les Th9	20
1.2. LES LT CD4 ASSOCIES A UNE IMMUNOSUPPRESSION : LES TREG	21
1.3. ROLE AMBIVALENT DES TH2 ET TH17.....	28
1.3.1. Les lymphocytes Th2	28
1.3.2. Les lymphocytes Th17	32
1.4. AUTRES POPULATIONS DE LT CD4 HELPER	37
2. HETEROGENICITE ET PLASTICITE DE LA POLARISATION DES LYMPHOCYTES T CD4 HELPER..	38
 II. LES ANTIGENES ASSOCIES AUX TUMEURS	 43
1. ROLE DES ANTIGENES TUMORAUX DANS L’IMMUNOSURVEILLANCE DES CANCERS	43
2. CLASSIFICATION DES ANTIGENES TUMORAUX.....	44
2.1. LES ANTIGENES MUTES A SPECIFICITE UNIQUE (TSA)	44
2.2. LES ANTIGENES DU GROUPE CANCER / TESTIS	45
2.3. LES ANTIGENES DE DIFFERENCIATION.....	45
2.4. LES ANTIGENES SUREXPRIMES	46
2.5. LES ANTIGENES VIRaux	46
3. LA TELOMERASE: ANTIGENE TUMORAL CIBLE POUR LES LYMPHOCYTES T	49
3.1. STRUCTURE DE LA TELOMERASE	49
3.2. ROLE DE LA TELOMERASE DANS L’ONCOGENESE.....	51
3.3. EXPRESSION ET REGULATION DE LA TELOMERASE DANS LES CANCERS	53
 III. PRESENTATION ET IDENTIFICATION DES PEPTIDES RESTREINTS PAR LE CMH DE CLASSE II.....	 57
1. DISTRIBUTION ET REGULATION DE L’EXPRESSION DES CMH II.....	57
2. LES VOIES DE PRESENTATION ANTIGENIQUE PAR LE CMH II.....	61
2.1. PRESENTATION DIRECTE DES ANTIGENES EXOGENES.....	61
2.2. L’AUTOPHAGIE DANS LA CROSS-PRESENTATION DES ANTIGENES DE TUMEURS	65
3. STRATEGIE D’IDENTIFICATION D’EPITOPES T CD4 ANTITUMORAUX	68
3.1. LA STRATEGIE PAR ELUTION DE PEPTIDES.....	69
3.2. APPROCHE BASEE SUR LES TILs.....	69
3.3. CRIBLAGE DE LIBRAIRIES DE PEPTIDES CHEVAUCHANTS	69
3.4. STRATEGIE PREDICTIVE	70

OBJECTIFS.....	75
RESULTATS.....	77
PARTIE 1 : IDENTIFICATION DE NOUVEAUX PEPTIDES IMMUNOGENES DERIVES DE LA TELOMERASE RESTREINTS HLA-DR ET ANALYSE DES REPONSES LYMPHOCYTAIRES T CD4 ANTI-TERT CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE CANCER DU POUMON.	78
PARTIE 2 : ETUDE <i>IN VIVO</i> DES FONCTIONS HELPER ET ANTITUMORALES DE NOUVEAUX PEPTIDES PAN-HLA-DR DERIVES DE LA TELOMERASE.....	81
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	81
I. OPTIMISATION DE LA STRATEGIE PREDICTIVE POUR L'IDENTIFICATION D'EPITOPES CD4 DERIVES D'ANTIGENES TUMORAUX	84
II. ETUDE DU ROLE HELPER DES UCP SUR LES REPONSES CTL ANTITUMORALES	96
III. UTILISATION DES UCP POUR UNE ANALYSE DYNAMIQUE DES REPONSES SPONTANEEES T CD4 ANTI-TUMORALES	101
CONCLUSION.....	105
BIBLIOGRAPHIE.....	107
ANNEXES.....	127

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
CIITA	MHC class II transactivator
CCL	C-C motif chemokine ligand
CCR	C-C motif chemokine receptor
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes
CXCR	C-X-C motif chemokine receptor
CD	Cluster de Differentiation
CMH	Complex Majeur d'Histocompatibilité
CLIP	Class II Associated Invariant Chain Peptides
CTL	Lymphocyte T Cytotoxique
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DC	Cellule Dendritique
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FGF	Fibroblast Growth Factor
Foxp3	Forkhead box P3
GITR	Glucocorticoid-induced tumour-necrosis-factor-receptor-related protein
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor
HLA	Human Leucocyte Antigen
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
LB	Lymphocyte B
Ii	Chaine invariante
LT	Lymphocyte T
mTGF-β	Membrane-tethered transforming growth factor
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NK	Natural Killer
NO	Oxyde nitrique
PD-1	Programmed cell death 1
RAG	Recombinaison Activating Genes
ROR	Retinoic acid-related orphan receptor
STAT	Signal Transducer and Activator
TAA	Tumor-associated antigen
TCR	T Cell Receptor
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TFH	Lymphocyte T folliculaire
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T helper
TILs	Lymphocytes Infiltrant les Tumeurs
TNF	Tumor Necrosis Factor
TR	Telomerase RNA
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
Treg	Lymphocyte T régulateur
TSA	Tumor-specific antigen
WT	Wild-Type

Liste des Figures

Figure 1 : Voies de signalisation impliquées dans la différenciation des Th1.....	15
Figure 2 : Rôle helper des Th1 dans la réponse antitumorale.....	19
Figure 3 : Voies de signalisation impliquées dans la différenciation des Treg.....	24
Figure 4 : Différents mécanismes immunosuppresseurs utilisés par les Treg.....	25
Figure 5 : Voies de signalisation impliquées dans la différenciation des Th2.....	29
Figure 6 : Balance entre l'effet pro et antitumoral des Th2 dans les cancers.....	32
Figure 7 : Voies de signalisation impliquées dans la différenciation des Th17.....	34
Figure 8 : Les Th17 et l'immunité antitumorale.....	36
Figure 9 : Polarisation des différentes sous-populations de LT CD4 et leur rôle dans l'immunité antitumorale.....	38
Figure 10 : Modèle de différenciation des LT CD4 effecteurs et mémoires.....	39
Figure 11 : Plasticité et flexibilité des principales sous-populations de LT CD4 helper.....	40
Figure 12 : Les modifications épigénétiques bivalentes de gènes régulateurs majeurs peuvent contribuer à la plasticité des sous-populations de LT CD4 helper.....	42
Figure 13 : Classification des antigènes tumoraux selon la nature de leur expression.....	47
Figure 14 : Critères de classification d'un antigène idéal.....	48
Figure 15 : L'horloge télomérique.....	49
Figure 16 : TERT et le complexe télomérase.....	50
Figure 17 : Propriétés de la télomérase.....	53
Figure 18 : Niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel de la télomérase.....	55
Figure 19 : Représentation des régions codant les molécules du CMH I et II humaines et murines.....	58
Figure 20 : Diversité des allèles HLA de classe II.....	59
Figure 21 : Voie de présentation des antigènes exogènes par les molécules CMH II.....	64
Figure 22 : Trois types d'autophagies et les mécanismes impliqués.....	65
Figure 23 : Régulation de l'apprêtement des antigènes intra et extracellulaire par le CMH II via la macroautophagie.....	66
Figure 24 : Etapes de la stratégie classique d'immunologie inverse pour la prédiction d'épitopes T CD4.....	73
Figure 25 : Evaluation de l'apprêtement naturel de UCP4 par les DC.....	89
Figure 26 : Les peptides UCP n'induisent pas de cellules CD4+CD2+Foxp3 spécifiques.....	94

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Comparaison entre nTreg et iTreg.....	22
Tableau 2 : Rôle ambivalent des Th17 dans l'immunité antitumorale.....	35
Tableau 3 : Expression de hTERT dans les cancers humains.....	54
Tableau 4 : Liste des principaux essais cliniques ciblant TERT.....	56
Tableau 5 : Régulation de l'expression du gène CIITA (MHC2TA).....	60
Tableau 6 : Algorithmes de prédictions d'épitopes HLA de classe II.....	71
Tableau 7 : Liste des épitopes T CD4 dérivés d'antigènes tumoraux identifiés et naturellement apprêtés.....	74
Tableau 8 : Comparaison des affinités prédites des UCP obtenues avec les algorithmes SYFPEITHI et NetMHCIIpan.....	85
Tableau 9 : Comparaison entre la prédiction NetMCHII et le test <i>in vitro</i> de liaison HLA...	86

Avant-propos

Dès 1909, Paul Ehrlich formulait l'hypothèse que des tumeurs peuvent se développer spontanément *in vivo* et que le système immunitaire est capable de les détecter et d'empêcher leur prolifération. C'est en 1957 que Lewis Thomas et MacFarlane Burnet introduisent le concept d'immunosurveillance des tumeurs (Burnet 1957). Cette théorie stipule que, tout au long de la vie, des cellules effectrices du système immunitaire patrouillent activement dans tout le corps humain pour identifier et détruire des cellules génétiquement altérées et malignes. En effet, des expériences menées chez des souris ont permis de vérifier l'hypothèse selon laquelle les cellules cancéreuses seraient immunologiquement différentes des cellules normales. Les premières démonstrations directes de la capacité du système immunitaire à reconnaître et à détruire des cellules tumorales furent apportées en 1953 par Foley. L'auteur a démontré qu'après ablation d'une tumeur induite chez la souris, celle-ci rejette l'implantation d'une deuxième tumeur identique, suggérant ainsi l'existence d'une mémoire immunologique. De plus l'immunisation de souris avec des tumeurs irradiées ou des cellules T provenant de souris syngéniques préalablement exposées à la tumeur, permettait de prévenir le développement de tumeurs implantées (Foley 1953; Schreiber et al. 2011).

Bien que cette hypothèse ait longtemps été contestée, des données récentes obtenues tout d'abord à partir de modèles animaux puis chez des patients atteints de cancers ont confirmé clairement cette théorie. En effet, différents modèles de souris transgéniques immunodéficientes tels que les souris RAG (déficientes en lymphocytes T, lymphocytes B et NK T) ou déficientes en perforine (composant important pour l'activité cytotoxique des lymphocytes T et des cellules NK) ont montré une incidence augmentée dans le développement de tumeurs spontanées (Kaplan et al. 1998; Shankaran et al. 2001). Plusieurs études ont également démontré la contribution active de l'IL-12, l'IFN γ et d'autres voies impliquant l'immunité à médiation cellulaire (Brunda et al. 1993; Dighe et al. 1994; Kaplan, Shankaran et al. 1998; Girardi et al. 2001; Shankaran, Ikeda et al. 2001). Chez l'homme, comparés à des sujets sains immunocompétents, les patients immunodéprimés ou traités par immunosuppresseurs présentent de façon similaire une augmentation significative de fréquence de cancers. A ceci s'ajoute l'observation que les patients atteints de cancer (quelle qu'en soit l'origine) ayant une infiltration lymphocytaire T importante au sein de la tumeur ont une meilleure survie que les patients porteurs de tumeurs non-infiltrées (Rilke et al. 1991; Lipponen et al. 1992; Naito et al. 1998; Pages et al. 2009; Fridman et al. 2011; Emens et al. 2012).

Cependant, si un système immunitaire défaillant rend plus sensible au développement de tumeurs, la présence de cancers chez les sujets immunocompétents est un fait avéré. L'hypothèse communément admise est que le système immunitaire veille à l'élimination des tumeurs les plus immunogènes, poussant par la même occasion la tumeur à naturellement sélectionner des variants moins immunogènes qui vont échapper aux cellules effectrices (Zitvogel et al. 2006). Le concept d'immunosurveillance fait donc partie d'un processus plus général appelé « cancer immunoediting » (Schreiber, Old et al. 2011). La première étape de ce processus correspond à la phase d'élimination. Elle débute lorsque des cellules normales sont transformées secondairement par un ou plusieurs stimuli (carcinogènes, mutations génétiques, radiations, infections virales...). Une tumeur fortement immunogène chez un hôte immunocompétent entraînera une stimulation optimale des cellules effectrices du système immunitaire à la fois inné et adaptatif et une élimination rapide de la tumeur naissante. En revanche, en présence d'une tumeur moins immunogène ou d'un hôte immunodéficient, toutes les cellules tumorales pourraient ne pas toutes être éliminées et une phase d'équilibre se met alors en place. Durant cette phase, qui peut s'étendre sur plusieurs années, les cellules tumorales sont tenues sous contrôle par le système immunitaire et des variants de la tumeur se développent. Cette étape est majoritairement contrôlée par les cellules du système immunitaire adaptatif et conduit à une réponse inflammatoire importante. Au cours du stade tardif de la phase d'équilibre, malgré une réponse immune continue, de nouveaux variants peu immunogéniques prolifèrent et créent un microenvironnement immunosuppresseur défavorable qui conduit à un échappement tumoral. Lors de cette dernière phase, la masse tumorale devient incontrôlable conduisant à un envahissement cliniquement visible des tissus sains et à une dissémination métastatique.

L'ensemble de ces observations a donc naturellement conduit à admettre l'existence d'antigènes associés aux tumeurs (TAA) et l'existence d'une surveillance de l'émergence de tumeurs par le système immunitaire.

Si l'immunité innée (médiée par les cellules NK, NK T, macrophages ou les cellules dendritiques) s'avère être la première barrière mise en place pour contrer la tumeur, elle n'est cependant pas en mesure d'installer une immunité spécifique qui pourrait faire face à un échappement tumoral ou à l'apparition de métastases. Ce rôle est assuré par l'immunité adaptative, notamment les lymphocytes T.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

I. Les réponses T CD4 antitumorales

Pendant longtemps, le rôle des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL) dans les cancers a été le plus étudié de part leurs propriétés cytotoxiques sélectives sur les cellules tumorales. Cependant il est clairement établi que les lymphocytes T (LT) CD4 jouent un rôle crucial dans le contrôle de l'immunité antitumorale. En effet, il a été montré que l'absence de LT CD4 était préjudiciable au développement d'une immunité antitumorale efficace et durable. Néanmoins la compréhension du rôle des LT CD4 dans les cancers et leur utilisation pour le développement d'immunothérapies anticancéreuses sont moins avancées que pour les LT CD8.

Dans la première partie de cette thèse, nous présenterons les caractéristiques des différentes sous-populations de LT CD4 existantes et leur rôle dans l'immunité antitumorale, ainsi que le caractère plastique de leur polarisation.

1. Rôle des différentes sous-populations de LT CD4 dans les cancers

A la sortie du thymus, les LT CD4 naïfs migrent vers les zones T des organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate, tissus lymphoïdes des muqueuses) où se déroule la sélection clonale. Lorsqu'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) - notamment les cellules dendritiques (DC) - se charge en antigène tumoral, celle-ci gagne les ganglions. La rencontre du LT CD4 avec son antigène combiné à d'autres signaux de costimulation lui permet alors d'entamer un programme de différenciation aboutissant à la formation de LT CD4 effecteurs ou mémoires.

En 1986, Mosmann et Coffman ont identifiés deux sous-populations de LT CD4 activés, les lymphocytes Th1 et les lymphocytes Th2, qui diffèrent par le profil de sécrétion cytokinique et leurs fonctions. Depuis ces vingt dernières années, la compréhension de l'importance de ces différentes formes de LT CD4 et des mécanismes par lesquels ils se différencient a connu des avancées majeures. Aujourd'hui au moins 7 sous-populations distinctes de LT CD4, déterminées par les cytokines présentes dans le microenvironnement après leur activation, ont été identifiées : les **Th1** (T helper-1), **Th2**, **Th9**, **Th17**, **Th22**, **TFH**

(follicular helper T cell) et iTreg (induced-regulatory T cell) (Pardoll and Topalian 1998; Kennedy and Celis 2008) (O'Shea and Paul 2010). Ces différentes sous-populations de LT CD4 ont pour fonction d'orchestrer la réponse immunitaire face à des pathogènes. Parmi elles, certaines ont un effet activateur sur l'immunité antitumorale, d'autres au contraire l'inhibe, et certaines ont un rôle qui reste à être élucidé.

1.1. Les réponses T CD4 activatrices

1.1.1. Différenciation et rôle des Th1

Les lymphocytes Th1 coordonnent les réponses immunes à médiation cellulaire dirigées contre des pathogènes intracellulaires (virus, bactéries, antigènes de tumeur...). La production d'IL-12 par les cellules dendritiques activées est un facteur clé dans la différenciation des Th1. La transduction du signal délivré par l'IL-12 aux LT CD4 est assurée par STAT4. STAT4 apparaît ainsi comme un facteur d'amplification des réponses Th1 capables d'induire directement la production d'IFN- γ dans les LT CD4 activés. Les Th1 sont caractérisés par l'expression du **facteur de transcription T-bet** et la sécrétion des **cytokines IFN γ , IL-2 et TNF α** . Les Th1 sont également caractérisés par l'expression de certains récepteurs aux chimiokines tels que **CCR5** (en particulier sur les Th1 des tissus lymphoïdes des intestins) et **CXCR3**.

Différenciation des Th1

T-bet est peu abondant dans les LT CD4 naïves. Suite aux signaux induits par la stimulation du TCR, son expression augmente via un ensemble d'interactions faisant intervenir notamment la voie mTORC1/akt et menant à l'activation de STAT4 (Delgoffe et al. 2011). Cette signalisation requiert la présence de la GTPase Rheb, activatrice de mTORC1. Parallèlement l'IL-12 sécrétée par les CPA se lie à son récepteur IL-12R et induit à son tour l'expression du facteur T-bet via STAT4.

Seul ou complexé avec d'autres protéines, le facteur T-bet assure la régulation des gènes de l'IL-2 (Hwang et al. 2005), de l'IFN- γ (Wong et al. 2011), du TNF- α ou encore le récepteur à l'IL-12 (IL-12R) (Jenner et al. 2009), amplifiant ainsi les mécanismes de la polarisation Th1. De même, l'expression du facteur Eomes amplifie la régulation positive de l'ifn γ (Yang et al. 2008; Yagi et al. 2010). T-bet s'avère aussi nécessaire à l'expression de gènes impliqués dans la migration des cellules Th1 vers le site de l'inflammation. Ainsi il régule positivement

l'expression de CXCR3, récepteur des chimiokines CXCL9/CXCL10 sécrétées par les cellules endothéliales tumorales (Lord et al. 2005). Le récepteur CCR5, ligand des chimiokines RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β est aussi exprimé fortement par les populations de cellules Th1. Néanmoins son expression ne semble pas être dépendante de T-bet (Lord, Rao et al. 2005). Une étude récente a montré l'implication du facteur KLF2 dans la modulation de l'expression CCR5 chez les LT CD4 (Richardson et al. 2012).

Suite à la polarisation des LT CD4 en Th1 par l'IL-12 sécrétée par les CPA, une boucle de rétro-action se met alors en place, faisant intervenir les cytokines IFN γ et IL-2. L'IFN γ sécrétée se lie à son récepteur situé à la surface des LT CD4 et recrute STAT1 impliqué dans la régulation positive de T-bet (Afkarian et al. 2002). De même l'IL-2 induit l'activation du facteur de transcription STAT5 qui régule positivement l'expression de l'IFN γ et contribue également à augmenter l'expression de l'IL-12R (Yamane and Paul 2012). L'importance de la voie IL-2/STAT5 dans l'induction de T-bet est encore sujette à controverses et les cytokines clés impliquées dans la différenciation Th1 restent à ce jour l'IL-12 et l'IFN γ .

L'ensemble des principaux mécanismes impliqués dans la différenciation des Th1 est illustré dans la figure 1.

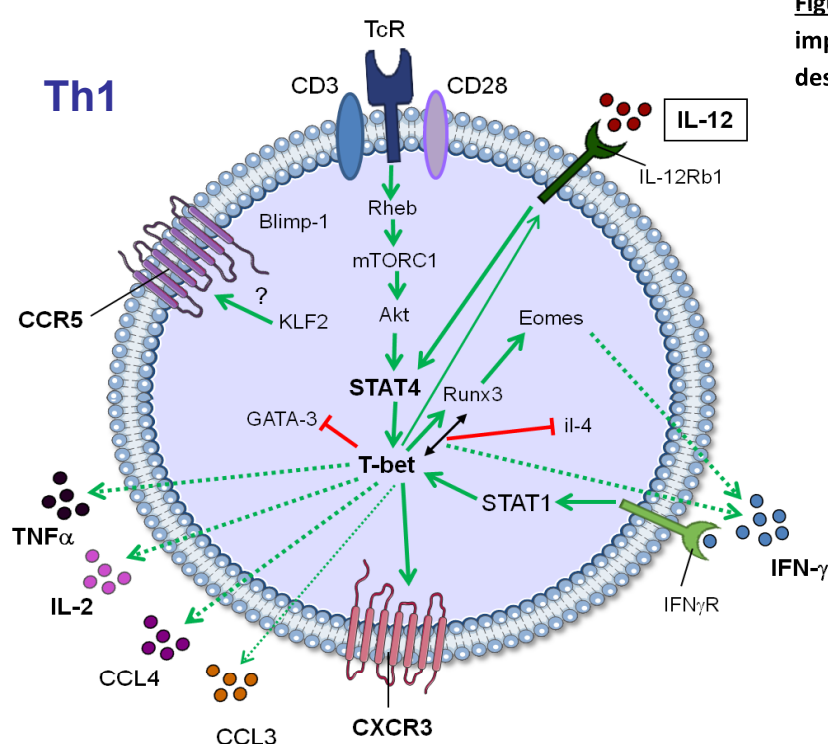


Figure 1 : Voies de signalisation impliquées dans la différenciation des Th1.

Rôle des Th1 dans la réponse antitumorale

Le rôle antitumoral majeur joué par les Th1 a été clairement établi depuis plusieurs années (Ostrand-Rosenberg 2005; Kennedy and Celis 2008). Leur action s'effectue principalement via l'aide qu'ils apportent aux autres effecteurs de l'immunité antitumorale : CTL, DC, cellules NK et macrophages.

Les mécanismes de **l'aide fournie par les Th1 pour la génération et l'augmentation des réponses CTL antitumorales** sont les plus connus et constituent un paramètre important pour prévenir l'induction d'une tolérance prématurée des LT CD8 (Bourgeois et al. 2002; Curtsinger et al. 2003; Shafer-Weaver et al. 2009).

La première forme d'aide procurée par les Th1 provient de l'expression transitoire de CD40L à la surface des Th1. Un modèle communément admis repose sur la capacité des Th1 à favoriser la maturation des DC qui, par la suite, vont activer les LT CD8 (Ridge et al. 1998). Selon ce modèle, l'interaction des LT CD4 spécifiques de l'antigène avec les CPA présentant le complexe peptide/CMH II approprié combiné à un signal de co-stimulation par CD80, augmente l'expression de CD40L à la surface des LT CD4. La liaison de CD40L à son récepteur CD40 situé à la surface des DC et la production d'IFN γ activent ces CPA. Ces dernières augmentent alors l'expression des molécules du CMH et des molécules de co-stimulation (ex: CD80, CD86, CD70) à leur surface et produisent des cytokines telles que l'IL-12 (Snijders et al. 1998). Les CPA suractivés activent enfin à leur tour les LT CD8 via la transmission d'un signal peptide / CMH I associé à des signaux de co-stimulation (Bennett et al. 1998; Schoenberger et al. 1998; Smith et al. 2004).

Un autre type d'aide plus direct repose sur les différentes cytokines produites par les Th1, en particulier l'IL-2 et l'IFN γ , qui facilitent l'expansion et la différenciation des LT CD8 antitumoraux. L'IL-2 sécrétée par les Th1 fonctionne comme un facteur de prolifération et d'activation qui favorise la génération d'une réponse primaire CTL efficace (Greenberg 1991; Bos and Sherman 2010). Sa présence durant la réponse primaire (Bourgeois and Tanchot 2003; Shedlock and Shen 2003; Janssen et al. 2005) associée à l'interaction entre CD40L à la surface des Th1 et son récepteur CD40 sur les LT CD8 (Bourgeois, Veiga-Fernandes et al. 2002) s'est montrée indispensable à l'expansion secondaire des CTL mémoires. Des études ont montré une perte progressive des LT CD8 chez les souris CD4-déficientes, entraînant une faible résistance à une infection virale ultérieure (Zajac et al. 1998). Ces données soulèvent ainsi un point important dans l'immunosurveillance et l'immunothérapie des cancers car une immunité antitumorale prolongée est nécessaire à une complète régression de la tumeur

(Ossendorp et al. 1998). L'IFN γ produit localement par les Th1 favorise quant à lui l'expression des molécules du CMH par les cellules tumorales conduisant à une reconnaissance accrue de ces cellules par les LT (CTL et Th1). De plus il induit la sécrétion de chimioattractants (ex : CXCL9, CXCL10, CCL5...) par les cellules épithéliales tumorales et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins qui vont pouvoir attirer les CTL spécifiques de la tumeur sur le site de l'inflammation (Marzo et al. 2000; Wong et al. 2008; Nakanishi et al. 2009; Bos and Sherman 2010). Très récemment, une étude menée chez la souris a montré que le transfert adoptif de LT CD4 anti-tumoraux à lui seul favorisait la maturation des fonctions des CTL endogènes au sein de la tumeur (Ding et al. 2012). Par ailleurs, l'effet 'helper' des Th1 peut s'exercer efficacement contre des tumeurs CMH II-négatives (Ossendorp, Mengede et al. 1998). Compte tenu de l'expression restreinte du CMH II sur les tumeurs, le mode d'action des LT CD4 est principalement dépendant de la phagocytose des cellules tumorales par les CPA.

Si beaucoup de modèles expérimentaux ont prouvé que l'activation optimale des CTL dépend étroitement de la présence de Th1, d'autres ont cependant mis en évidence l'absence de nécessité de LT CD4 helper durant la phase d'initiation de réponses CTL (Zimmerli et al. 2005; Cote et al. 2011). Dans ce cas de figure, la stimulation d'épitopes CD8 de forte affinité serait possiblement suffisante pour induire des CTL capables de produire leurs propres IL-2. En revanche les épitopes de faible affinité, reconnaissant par exemple des peptides dérivés du soi ou associés aux tumeurs, resteraient dépendants d'une production locale d'IL-2 sécrétée par les lymphocytes Th1. D'autres paramètres peuvent déterminer si les réponses CTL primaires requièrent ou pas la présence d'une aide dépendante des Th1. Par exemple un taux élevé de CD70 à la surface des DC permet de contourner le besoin de LT CD4 helper. Cependant l'expression de CD70 sur les DC est le résultat d'une interaction CD40/CD40L avec les Th1 (Bullock and Yagita 2005). De même, des études *in vitro* ont montré que l'utilisation d'anticorps agonistes anti-CD40 ou la stimulation des TLR (Toll-like receptor) permet d'outrepasser le besoin d'une aide apportée par les LT CD4 pour la génération de réponses CTL mémoires (Bullock and Yagita 2005; Toka et al. 2005). Récemment Wiesel et Oxenius ont examiné l'ensemble des études à l'origine de ce débat sur l'aide apportée par les LT CD4 (Wiesel and Oxenius 2012). Bien que certaines études aient trouvé que la présence des LT CD4 helper était dispensable voire délétère à la génération de CTL mémoires, dans la plupart des cas sans les signaux fournis par les Th1 durant la phase initiale d'activation, le maintien de LT CD8 mémoires pleinement fonctionnels est altéré (Gao et al. 2002; Rocha and Tanchot 2004; Sun et al. 2004). Des travaux ont notamment montré que les Th1 régulent l'expression de TRAIL à la surface des CTL activés, les rendant moins susceptibles au

phénomène d'AICD (activation-induced cell death) lors d'une activation secondaire que leurs homologues générés en absence d'aide (Janssen, Droin et al. 2005).

Si la fonction classique des Th1 dans l'immunité antitumorale est d'activer les LT CD8, la stimulation de LT CD4 antitumoraux peut entraîner une complète régression tumorale en absence de LT CD8 (Greenberg 1991; Cohen et al. 2000). Ainsi en plus de leur action sur les CTL, les Th1 sont capables directement ou indirectement de lyser les cellules tumorales. En effet, **les Th1 jouent un rôle dans la stimulation des cellules de l'immunité innée** capables d'exercer une activité antitumorale contre la tumeur. L'IFN γ produit par les Th1 induit la production de NO (oxyde nitrique), ROS (reactive oxygen species) et RNS (reactive nitrogen species) par les macrophages impliqués dans l'élimination des cellules tumorales (Hung et al. 1998). Par la sécrétion d'IFN γ et d'IL-2, les Th1 prennent aussi part à l'activation des cellules NK (van den Broeke et al. 2003; Perez-Diez et al. 2007). De plus, ils favorisent le recrutement des macrophages, granulocytes et cellules NK dans le microenvironnement tumoral (Cohen, Peng et al. 2000; Knutson and Disis 2005). Bien que les fonctions 'helper' des Th1 puissent s'exercer au niveau des ganglions durant la phase initiale d'activation de la réponse immune, l'ampleur de leur efficacité se mesure localement notamment par la production d'IFN γ qui favorise l'infiltration de la tumeur par les autres cellules de l'immunité (Pardoll and Topalian 1998; Bos and Sherman 2010).

Par ailleurs, **les Th1 spécifiques de la tumeur peuvent eux-mêmes exercer un effet lytique sur les cellules tumorales** (Schultz et al. 2000). La production d'IFN γ agit comme un facteur antitumoral et anti-angiogénique (Mumberg et al. 1999; Qin and Blankenstein 2000). De même, leur action cytotoxique s'exerce par le biais de la sécrétion de cytokines telles que le TNF α ou en provoquant l'apoptose des cellules tumorales via les voies de Fas/FasL ou TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Hahn et al. 1995). Un résumé de l'ensemble des mécanismes 'helper' utilisés par les Th1 est illustré dans la Figure 2.

Chez les patients atteints de cancer, la présence de lymphocytes Th1 au sein de la tumeur est associée à un bon pronostic (Pages et al. 2010; Tosolini et al. 2011). Très récemment, une étude menée chez la souris a pu montrer que le transfert adoptif de LT CD4 anti-tumoraux à lui seul favorisait la maturation des fonctions des CTL intra-tumoraux endogènes (Ding, Huang et al. 2012) ou des cellules NK (Ainhua Perez-Diez 2010 Blood). Chez les patients atteints de myélome, le transfert adoptif à la fois de LT CD4 et T CD8 favorise la mise en place d'une mémoire immunitaire centrale robuste (Rapoport et al. 2005).

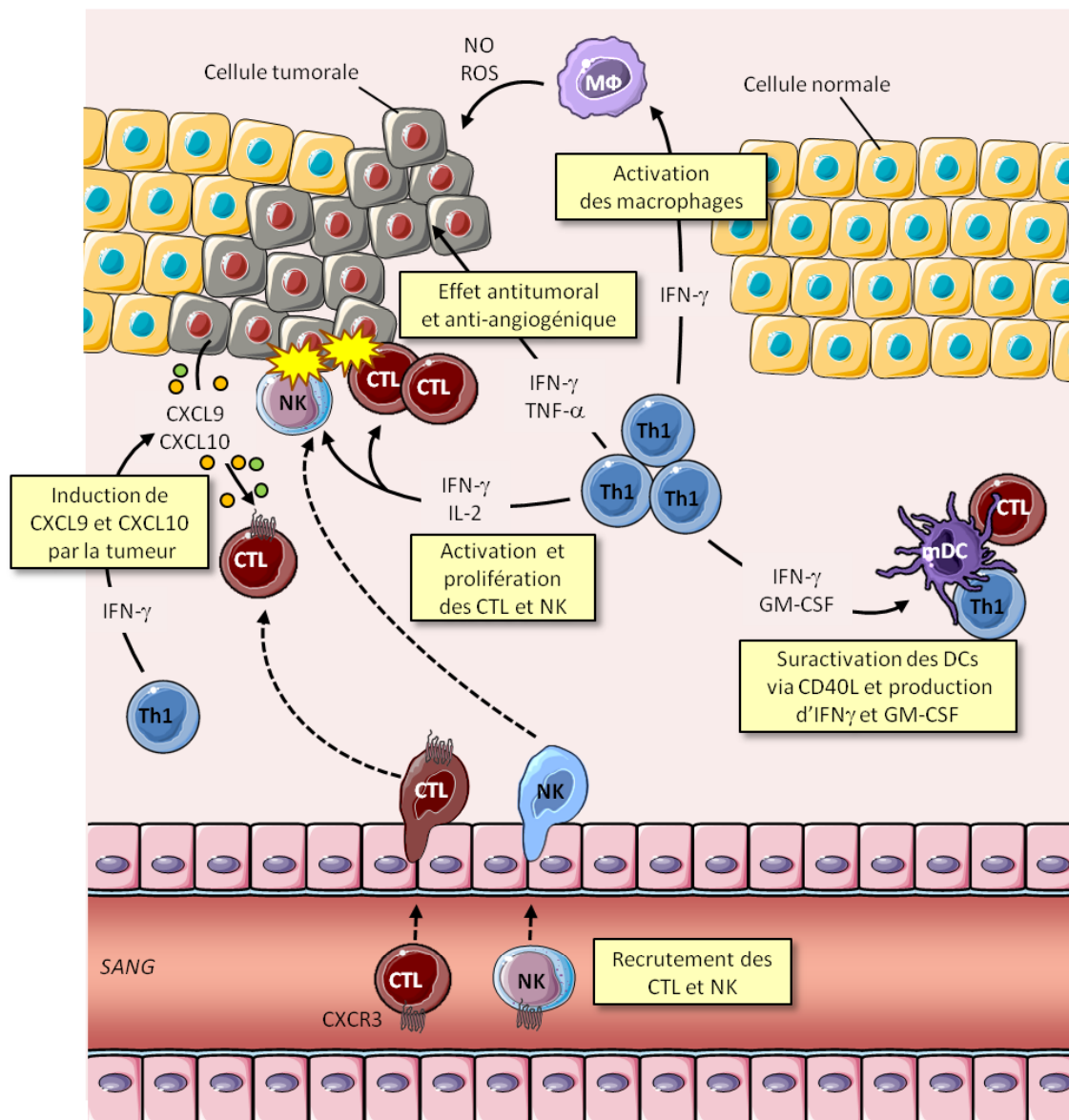


Figure 2 : Rôle helper des Th1 dans la réponse antitumorale. Les lymphocytes Th1 reconnaissent les antigènes tumoraux présentés par les DC sur le site tumoral et sécrètent de l'IFN-γ et du GM-CSF qui, en association avec une interaction CD40/CD40L, favorise la maturation des DC. En réponse à l'IFN-γ, les cellules tumorales et les cellules endothéliales locales produisent les chimiokines CXCL9 et CXCL10. Celles-ci se lient aux récepteurs CXCR3 exprimés à la surface des CTL, NK et macrophages ce qui conduit au recrutement de ces cellules au sein de la tumeur où ils exercent leurs activités cytotoxiques. Les Th1 favorisent l'activation et la prolifération des cellules antitumorales recrutées via la production d'IFNγ et d'IL-2. De plus les Th1 peuvent exercer un effet antitumoral et anti-angiogénique par le biais de la sécrétion d'IFN-γ et de TNF-α.

1.1.2. Nouvelle population de LT CD4 à activité antitumorale : les Th9

Récemment, une nouvelle population de LT CD4 capable de se différencier en Th9 **en présence des cytokines IL-4 et TGF- β** a été décrite (Dardalhon et al. 2008). Les Th9 sont caractérisés par une **production importante d'IL-9, mais aussi d'IL-10**. Leur différenciation est assurée par les facteurs de transcription PU.1, IRF4 et STAT6. L'expression de IRF4 est nécessaire au développement des Th9 et au maintien de leur fonction (Staudt et al. 2010). Son interaction avec PU.1 favoriserait la transcription du gène *il-9*. Malgré ces quelques données, l'ensemble des mécanismes liés à la différenciation des Th9 reste à être étudié.

Les Th9 ont été décrits jusqu'ici comme ayant une activité globalement pro-inflammatoire. Ils sont impliqués notamment dans les réactions d'autoimmunité ou d'allergies (Erpenbeck et al. 2003). L'IL-9 sécrétée par les Th9 agit en effet comme facteur de croissance et d'activation des mastocytes. De plus, des études menées *in vitro* ont montré la capacité de l'IL-9 à augmenter la production IL-4-dépendante d'IgE et d'IgG, et à favoriser l'expansion de certaines sous-populations de LB.

Ce n'est que très récemment que des études ont pu mettre pour la première fois en évidence l'implication de l'IL-9 et des Th9 dans l'immunité antitumorale (Schmitt and Bopp 2012). Dans une première étude menée par Purwar et al., les auteurs ont montré que le transfert adoptif de Th9 chez des souris sauvages ou Rag1^{-/-} était capable d'inhiber la croissance de mélanome (Purwar et al. 2012). Un effet similaire est observé après l'injection d'IL9 recombinant contre le développement de mélanomes et de métastases pulmonaires induites. Des expériences de déplétion *in vivo* suggèrent que l'effet antitumoral de l'IL-9 est induit par son action sur les mastocytes et non sur les LT ou LB.

Une seconde étude, conduite par l'équipe de Lu et al. confirme le rôle antitumoral des Th9 à l'aide de plusieurs modèles prophylactiques et thérapeutiques de tumeurs murines (Lu et al. 2012). Cette protection antitumorale s'est même avérée supérieure à celle obtenue par le transfert de Th1. Cependant, contrairement aux travaux de Purwar et al., la contribution significative de mastocytes dans cet effet antitumoral n'est pas retrouvée. En revanche le transfert adoptif de Th9 a conduit à une augmentation importante des réponses CTL endogènes via le recrutement CCL20/CCR6-dépendant de DC CD8 α ⁺ au sein de la tumeur.

En dépit de l'activité antitumorale des Th9 observée, une étude menée *in vitro* a montré que l'IL-9 sécrétée pourrait paradoxalement favoriser la fonction immunosuppressive des Treg (Elyaman et al. 2009). Si les expériences décrites précédemment sont basées sur l'utilisation de Th9 polarisés artificiellement *in vitro* en présence d'IL-4 et de TGF- β , leur

induction au cours de stratégies vaccinales n'a pas encore été évaluée. De même le rôle de la kinase mTOR dans les mécanismes de différenciation de ces cellules ainsi que l'expression spécifique de récepteurs aux chimiokines ne sont pas connus.

1.2. Les LT CD4 associés à une immunosuppression : les Treg

Les **Treg CD4⁺ CD25⁺** découverts en 1995 par l'équipe de Sakaguchi, font partie des mécanismes immunosuppresseurs qui, dans les conditions physiologiques, sont importants pour l'homéostasie immunitaire et le maintien d'une tolérance immunitaire centrale et périphérique (Sakaguchi et al. 1995). La détermination du phénotype Treg a été révolutionnée en 2003 par l'identification d'un nouveau gène appelé **Foxp3**. Ce facteur de transcription est apparu comme un bon marqueur spécifique des Treg chez la souris, mais chez l'homme il peut être également induit chez les LT CD4 activés sans que ceux-ci ne présentent pour autant d'activité immunosuppressive (Kryczek et al. 2009). La discrimination entre Treg et LT activés se fait alors par le marqueur CD127, exprimé faiblement sur les Treg et fortement sur les LT activés. De plus, au niveau génique, les Treg présentent une déméthylation des motifs CpG en amont de l'exon 1 du locus Foxp3 qui n'est pas retrouvée chez les LT activés (O'Shea and Paul 2010). Les Tregs expriment aussi de façon non-spécifique des molécules de surface comme **CTLA-4 (CD152)** (cytotoxic T lymphocyte antigen 4), **GITR** (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor family related gene), **mTGF-β** (membrane-tethered transforming growth factor), **PD-1** (programmed cell death 1), **CD73** (chez la souris uniquement) et **CD39** (Curotto de Lafaille and Lafaille 2009; Pere et al. 2012). De même, chez l'homme comme chez la souris, le récepteur aux chimiokines **CCR4** est retrouvé préférentiellement sur Treg comparé aux LT conventionnels (Iellem et al. 2001; Hirahara et al. 2006).

Parmi les Treg CD4⁺CD25⁺ on distingue notamment les Treg dits « naturels » (**nTreg**) et les Treg induits ou adaptatifs (**iTreg**) (Ito et al. 2008; Curotto de Lafaille and Lafaille 2009). La différence phénotypique entre le nTreg et les iTreg s'établit selon le niveau d'expression et le statut (constitutif ou induit) des molécules CD25 et Foxp3 (Tableau 1).

Origine des Treg

Les nTreg sont issus de la différenciation thymique. Ces lymphocytes sont sélectionnés positivement après reconnaissance du peptide du soi présenté avec une affinité intermédiaire par une molécule de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Jordan et al. 2001). Ces nTreg représentent 5-10% des LT CD4⁺ du sang périphérique chez l'homme et 1-5% chez la souris (Baecher-Allan et al. 2001). Ils préviennent principalement contre la survenue de maladies inflammatoires et constituent la population que l'on retrouve chez un individu en absence d'infection. Les iTreg résultent de la conversion en périphérie de LT CD4⁺Foxp3⁻ en LT CD4⁺Foxp3⁺. L'origine des iTreg est encore mal comprise, bien qu'ils semblent être issus de populations de lymphocytes T matures en réponse à un antigène dans un environnement immunosuppresseur (Curotto de Lafaille and Lafaille 2009).

Récemment, en plus des nTreg Foxp3⁺ et des iTreg Foxp3⁺, 2 autres populations de iTreg Foxp3⁻ ont été décrits : les **Tr1** (qui sécrètent principalement de l'IL-10 et sont induits après stimulation antigénique) (Roncarolo et al. 2006) et les **Th3** (qui sécrètent essentiellement du TGF- β et sont induits par des antigènes administrés par voie orale) (Weiner 2001). L'origine de ces deux populations, à savoir s'ils constituent une population de Treg à part ou non, est encore sujet à débats.

	Treg naturels	Treg induits
Génération		
Tissu	Thymus	¹ OLII/Tissus inflammés
Environnement cytokinique	TGF- β , IL-2 ou IL-15	TGF- β , IL-2
Signal de costimulation associé	CD28	CTLA-4
Caractéristiques phénotypiques		
Marqueurs	CD45RA ⁺ / - CD25 ^{hi} Foxp3 ^{hi} CD39 ⁺	CD45RA ⁻ CD25 ^{low} Foxp3 ^{low} CD39 ⁺
Expression de Foxp3, CTLA-4, GITR	Constitutive	Induite
Déméthylation de la région ² TSDR du locus Foxp3	Complète	Partielle
Niveau d'expression de CD25	Forte	Variable
Autres marqueurs	Helios, Nrp1, PD-1, Swap70	Dapl1, Igfbp4
Spécificité	Antigènes du soi	Antigènes du soi / exogènes

¹ OLII : Organes lymphoïdes secondaires; ² TSDR : T-cell specific demethylated region

Tableau 1 : Comparaison entre nTreg et iTreg

Différenciation des Treg

La génération des Treg requiert à la fois une signalisation du TCR (via NFAT et AP1) et la présence de TGF- β . In vitro, elle requiert la présence d'IL-2 ou d'IL-15 qui conduit à l'activation de STAT5 et amplifie l'expression de Foxp3 (Bluestone and Abbas 2003; Liu et al. 2008). Le maintien de Foxp3 est assuré par le complexe Foxp3/Runx1, exprimé constitutivement chez les nTreg. Ainsi, Foxp3 est exprimé fortement chez les nTreg (CD4+CD25^{high}), son expression est en revanche transitoire chez les iTreg (CD4+CD25^{low}) (Curotto de Lafaille and Lafaille 2009).

L'implication de la voie mTOR a aussi clairement montré son importance dans la différenciation des LT CD4 en iTreg. En effet une récente étude menée chez la souris a montré que, les LT CD4 n'exprimant pas mTOR (Frap1^{-/-}, Frap1 étant le gène codant pour la protéine mTOR) stimulés en présence d'anti-CD3 et de CPA se différencient naturellement en Treg au détriment des profils effecteurs Th1, Th2 ou Th17 (Delgoffe, Pollizzi et al. 2011). Les iTreg issus de la stimulation de cellules T déficientes en mTOR expriment un taux de Foxp3 et de GITR équivalent à celui des nTreg. Ils présentent également une activité immunosuppressive et, contrairement aux Treg issus de souris sauvage, ces Treg Frap1^{-/-} sont sensibles *in vitro* à une prolifération induite par l'IL-2. Ainsi dans des conditions normalement propices à l'induction de Th1 *in vitro* ou *in vivo* après infection virale, l'absence d'une signalisation mTOR conduit à la génération de Treg Foxp3⁺ fonctionnels. Compte tenu du rôle du TGF- β dans l'induction des iTreg, les auteurs ont analysé l'impact de l'absence de mTOR sur la sécrétion de TGF- β par les cellules. Aucune différence dans la production de TGF- β n'est observée entre les cultures de cellules issues de souris Frap1^{-/-} ou wild-type (WT). En revanche, les LT Frap1^{-/-} présentent d'ores et déjà un taux basal de Smad3 phosphorylé plus élevé que les LT WT et ce taux augmente encore après stimulation. Ainsi les LT Frap1^{-/-} sont rendus plus sensibles à l'activation de Smad3 (un facteur impliqué dans l'expression de Foxp3) par le TGF- β et donc plus disposés à une différenciation en Treg. De manière intéressante, une déplétion sélective de l'un ou l'autre des deux complexes mTOR (TORC1 et TORC2) n'est pas suffisante à cette différenciation, suggérant l'implication de ces deux protéines dans l'inhibition du développement des iTreg.

En plus du rôle de mTOR, d'autres protéines ont montré leur implication directe dans la différenciation Treg comme illustré dans la figure 3.

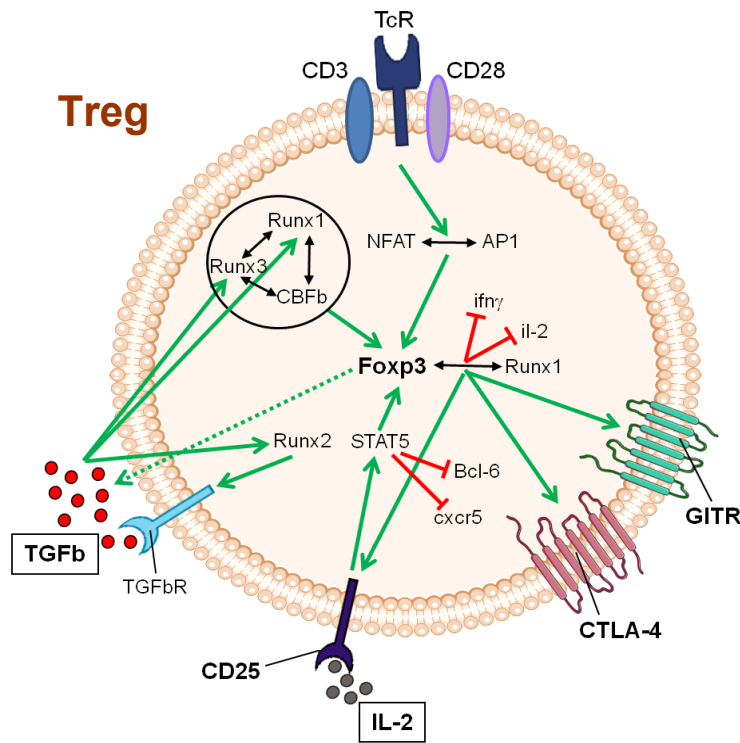


Figure 3 : Voies de signalisation impliquées dans la différenciation des Treg

Mécanismes immunosuppresseifs des Treg

Les iTreg et les nTreg partagent divers mécanismes inhibiteurs de la réponse immunitaire (Zou 2006; Vignali et al. 2008). Ces deux populations sont caractérisées par la sécrétion d'IL-10, de TGF- β , ou d'IL-35 (au moins chez la souris). Le TGF- β membranaire (membrane-tethered TGF- β) peut aussi induire une inhibition contact direct avec les LT effecteurs.

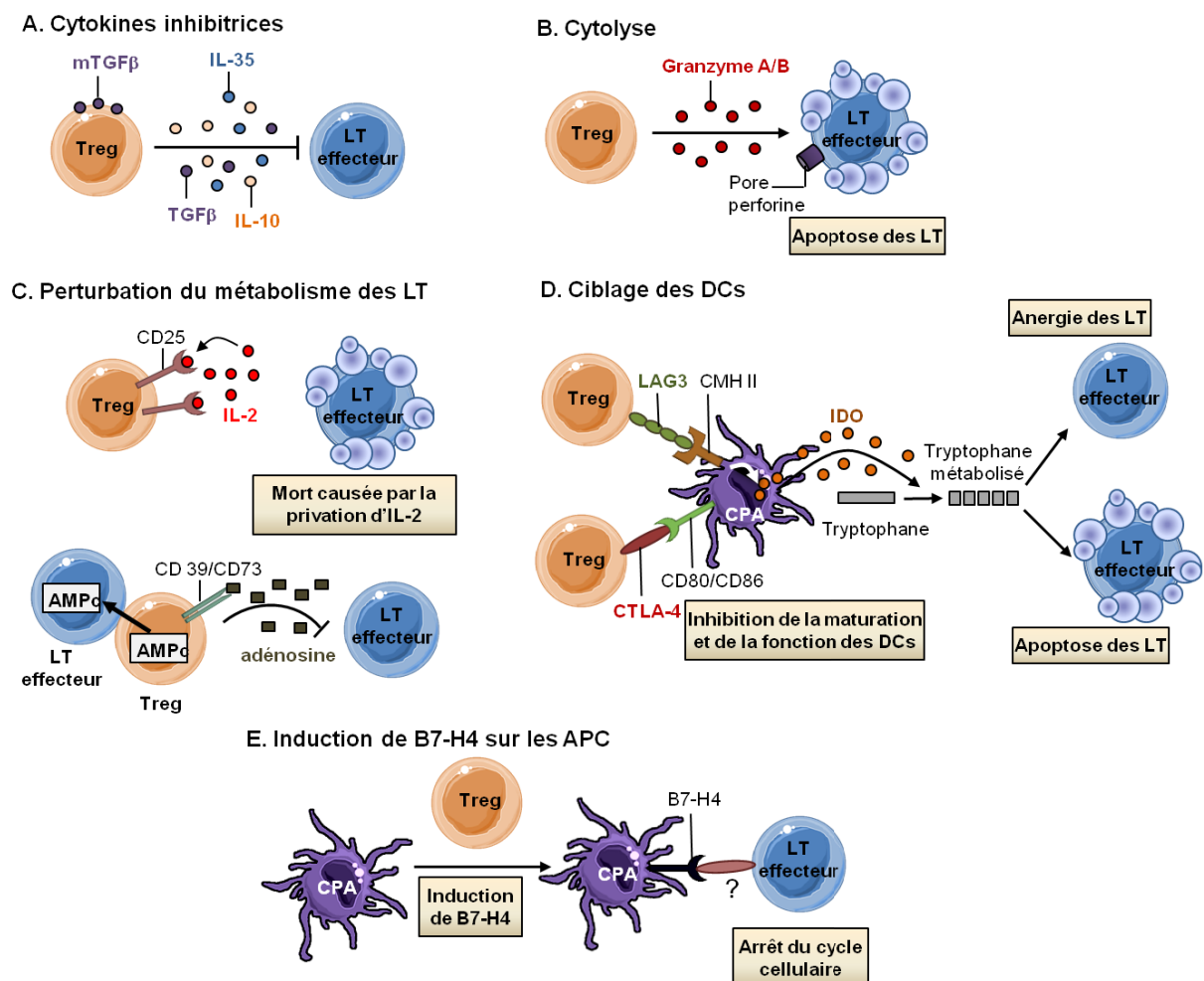
Les Treg activés peuvent exercer leur activité inhibitrice via la sécrétion de granzyme A (chez l'homme) / granzyme B (chez la souris) et lyser les LT ou les CPA (Grossman et al. 2004; Cao et al. 2007). Une étude menée chez des souris déficientes en granzyme B ou perforine a montré que ce mécanisme pouvait se montrer perforine-indépendant (Gondek et al. 2005).

Un autre mécanisme implique le blocage du métabolisme cellulaire des LT effecteurs. Les Treg expriment fortement CD25, et par conséquent entrent en compétition avec les LT activés pour la capture de l'IL-2, facteur de croissance et de prolifération des LT. Les Treg ont aussi montré leur capacité à inhiber les fonctions des LT effecteurs par le transfert d'AMP cyclique inhibiteur aux LT via les jonctions GAP. De plus la transformation de l'ATP péricellulaire en adénosine par les ectonucleotidases CD39 et CD79 présentes sur les Treg, induit une immunosuppression des LT effecteurs exprimant le récepteur $A_{2A}R^+$ (adenosine receptor 2A). L'activité des Treg inclut des mécanismes inhibiteurs de la fonction et la maturation des DC par le biais de LAG3 (lymphocyte-activation gene 3) et CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte

antigen-4) qui exercent leur activité suppressive en interagissant respectivement avec le CMH II et les molécules CD80/CD86 à la surface des DC. Ces interactions induisent la sécrétion par les CPA de l'enzyme IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase) qui dégrade le tryptophane, entraînant une anergie des LT.

Récemment, les Treg ont montré leur capacité à induire sur les CPA l'expression de B7-H4, molécule inhibitrice qui à son tour régule négativement la prolifération des LT effecteurs.

L'ensemble de ces principaux mécanismes immunosuppresseurs utilisés par les Treg dans les cancers est résumé dans la Figure 4.



Figures 4 : Différents mécanismes immunosuppresseurs utilisés par les Treg CD4+CD25+Foxp3+. **A**, Sécrétion de cytokines immunosuppressives IL-10, TGFβ et IL-35. **B**, Induction d'une lyse ciblée des cellules telles que les APC et les LT via la sécrétion de granzyme A/B et de perforine. **C**, Perturbation du métabolisme des LT par privation d'IL-2 capturée par le récepteur CD25 exprimé par les Treg, ou via le transfert d'AMPc et la génération d'adénosine inhibiteurs. **D**, Inhibition de la maturation et de la fonction des DC de façon contact-dépendant (via des interactions CTLA-4/CD80-CD86 ou LAG3/CMH II) entraînant la production d'IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase) par les CPA. Les CPA exprimant IDO inhibent l'activation des LT via la métabolisation du tryptophane. **E**, Induction de l'expression de B7-H4 sur les APCs, molécule qui à son tour induit l'inhibition de la prolifération des LT.

Comme mentionné précédemment, la propriété majeure des Treg réside en leur capacité à inhiber les fonctions des LT conventionnels. En plus de leur caractérisation phénotypique, il est donc très important d'évaluer l'activité inhibitrice Treg par l'étude des différents mécanismes impliqués dans ce phénomène. Les méthodes actuellement les plus utilisées pour mettre en évidence cette activité immunosuppressive reposent sur des tests *in vitro* d'inhibition de prolifération de LT ou sur la mesure de la production de cytokines après co-culture de Treg en présence de LT conventionnels à différents ratios. Plus récemment les tests d'inhibition de prolifération sont progressivement remplacés par des tests de détection de cytokines par cytométrie (TGF- β ou IL-10) associés à un phénotypage des Treg.

Rôle des Treg dans la réponse antitumorale

Dans un contexte tumoral, le développement de la tumeur est accompagné par l'accumulation de cellules suppressives dans le microenvironnement tumoral telles que les Treg (Bonertz et al. 2009; Schreiber et al. 2012). Les Treg issus du thymus, des ganglions, de la moelle osseuse et du sang expriment le récepteur aux chimiokines CCR4 et sont attirés par l'expression de CCL22 (chimiokine ligand de CCR4) sécrétée par les cellules tumorales et les macrophages infiltrant la tumeur (Curiel et al. 2004; Mizukami et al. 2008; Gobert et al. 2009). L'infiltration de la masse tumorale par les Treg contribue ainsi à inhiber l'activation spécifique (Chen et al. 2005) ou les cellules NK (Ghiringhelli et al. 2006). Plus récemment il a aussi été rapporté que les Treg produisent du VEGF et favorisent ainsi l'angiogénèse (Facciabene et al. 2011). Bien que les Treg soient réfractaires à une prolifération *in vitro* induite par les anticorps CD3/CD28, ils peuvent proliférer activement lorsqu'ils sont localisés dans le stroma tumoral. Cette prolifération peut être induite sous l'effet d'une libération locale d'IL-2 associée à une activation du TcR via la reconnaissance spécifique d'antigènes présentés par les DC (Gobert, Treilleux et al. 2009), ou encore via le TGF- β produit par les cellules dendritiques myéloïdes immatures locales (Ghiringhelli et al. 2005).

Dans les cancers, l'essentiel de l'activité inhibitrice des Treg serait portée principalement par les iTreg. En effet, des études ont montré que les iTreg infiltrant les tumeurs humaines ou issus de sang de patients atteints de différents cancers présentent des fonctions inhibitrices supérieures à ceux des nTreg isolés de donneurs sains (Chattopadhyay et al. 2006; Strauss et al. 2007; Mandapathil et al. 2009). Dans la plupart des cas, la présence de Treg est associée à un mauvais pronostic de la maladie (Liyanage et al. 2002; Curiel, Coukos et al. 2004; Wolf et al. 2005; Schreck et al. 2009; Katz et al. 2012) et ces lymphocytes

apparaissent comme un composant majeur du mécanisme d'échappement de la tumeur face au système immunitaire.

Cependant une poignée d'études a constaté que la fréquence des Treg Foxp3⁺ n'était ni augmentée, ni associée à un mauvais pronostic. Dans certains cancers tels que le lymphome folliculaire (Carreras et al. 2006), les cancers de la tête et du cou (Badoual et al. 2006) et en particulier le cancer colorectal (Fridman, Galon et al. 2011), la présence de Treg est corrélée à une amélioration de la survie globale des patients. Récemment l'équipe de Ghiringhelli a examiné l'ensemble des études se référant à l'infiltration Treg et son pronostic dans les cancers colorectaux (Ladoire et al. 2011). Une explication possible repose sur le fait que, dans certains travaux, les LT CD4⁺CD25⁺ associés à un phénotype Treg seraient en réalité des LT CD4 activés. Une autre explication mettrait en cause une diminution de l'expression de Foxp3 dans certaines circonstances. C'est le cas par exemple des tumeurs humaines enrichies en ATP qui peuvent favoriser la perte du marqueur Foxp3 dans les Treg recrutés au sein de la tumeur (Schenk et al. 2011).

L'ensemble de ces données suggère que les différences entre la fréquence des Treg et leur fonction ainsi que les diverses corrélations à un pronostic de la maladie doivent être judicieusement traitées. De plus elles soulignent le rôle crucial du microenvironnement tumoral dans la modulation de l'activité des cellules du système immunitaire, Treg y compris.

Chez les souris, des études ont montré que la présence de Treg était facteur de mauvais pronostic et que leur élimination pouvait améliorer l'efficacité des réponses immunitaires induites après vaccination (Onizuka et al. 1999; Tanaka et al. 2002; Morse et al. 2008). L'élimination transitoire des Treg durant la phase d'initiation de la réponse immunitaire est vue comme un moyen de restaurer ou accroître l'immunité antitumorale et l'efficacité des immunothérapies. Il existe plusieurs stratégies visant à éliminer les Treg ou inhiber leurs fonctions, les principales reposant sur l'utilisation de la chimiothérapie et l'utilisation d'anticorps monoclonaux.

Parmi les chimiothérapies, les propriétés immunomodulatrices du cyclophosphamide sont bien connues pour éliminer/inhiber les Treg et restaurer les réponses T antitumorales dans de nombreux modèles animaux (Ghiringhelli et al. 2004; Taieb et al. 2006). La déplétion sélective des Treg requiert l'utilisation de cet agent à faible dose ou à des doses métronomiques. Cependant son potentiel thérapeutique en clinique n'est pas aussi marqué que celui obtenu dans les modèles animaux (Audia et al. 2007; Ghiringhelli et al. 2007).

L'implication des Treg dans l'immunité antitumorale a été initialement mise en évidence grâce à des expériences de déplétion des Treg par administration d'anticorps anti-CD25 (PC61).

Cependant CD25 est aussi exprimé sur les LT activés, compliquant l'utilisation de cette stratégie. Chez l'homme, l'anticorps anti-CD25 (daclizumab) a été utilisé pour éliminer les Treg avec par conséquent des résultats contradictoires (Rech and Vonderheide 2009; de Vries et al. 2011). Plus récemment, l'IL-2 recombinante couplée à la toxine diphtérique (ONTAK, denileukin difitox) a été développée afin de cibler uniquement les LT présentant une forte expression de CD25. Les premiers résultats de son administration combinée à une vaccination ont montré une certaine efficacité dans le cancer du rein et le mélanome (Morse, Hobeika et al. 2008). Cependant dans une étude récente menée chez des patients atteints de mélanome, aucune diminution des Treg périphériques ni de bénéfice clinique inhérent au traitement n'ont été observés (de Vries, Castelli et al. 2011). Cette absence d'efficacité du traitement est sans doute due à l'incapacité du difitox à éliminer les iTreg Foxp3⁺CD25^{low}.

Une autre stratégie ciblant les Treg consiste en l'utilisation d'anticorps dirigés contre des molécules constitutivement exprimées par les Treg et conduisant à l'inhibition de leur fonction. C'est le cas des anti-CTLA4, Ipilimumab et Tremelimumab. Plusieurs études ont observé l'efficacité de ces traitements et leur capacité à restaurer la prolifération TcR-dépendante des LT, les rendant résistants à l'activité immunosuppressive des Treg (Menard et al. 2008; Hodi et al. 2010). Cependant une étude récente a démontré que le blocage de CTLA4 sur les Treg seul n'était pas suffisant pour augmenter les réponses antitumorales mais qu'il nécessitait également le ciblage concomitant de CTLA-4 sur les LT effecteurs (Peggs et al. 2009).

L'expression préférentielle de CCR4 par les Treg a conduit à l'utilisation d'antagonistes développés pour empêcher l'interaction des chimiokines CCL22/CCL17 (sécrétées par les DC) à leur récepteur CCR4 et inhiber ainsi le recrutement des Treg activés. Une étude menée chez la souris a rapporté que l'administration d'un antagoniste de CCR4 combiné à un vaccin permet d'induire une protection tumorale partielle (Pere et al. 2011).

D'autres traitements ont montré un rôle indirect sur les Treg tels que des anti-angiogéniques et des inhibiteurs de tyrosine kinase (ex: Sunitinib, temozolomide, imatinib mesylate ou dasatinib) (Banissi et al. 2009; Adotevi et al. 2010; Balachandran et al. 2011).

1.3. Rôle ambivalent des Th2 et Th17

1.3.1. Les lymphocytes Th2

Les lymphocytes Th2 contrôlent la différenciation des lymphocytes B et la production d'anticorps et orientent généralement la réponse immune à médiation humorale dirigée contre

des pathogènes extracellulaires. Les Th2 sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription **GATA3**, le récepteur aux chimiokines CRTH2 (chez l'homme) et l'expression des cytokines **IL-4**, **IL-5**, **IL-10** et **IL-13** (Tsuda et al. 2001; Zhu and Paul 2010)

Différenciation des Th2

La différenciation des LT CD4 naïfs en Th2 nécessite en particulier la présence des cytokines IL-4 et IL-2 (Yamane and Paul 2012). La transduction du signal TcR active la voie mTORC2/PKC (Delgoffe, Pollizzi et al. 2011) et induit l'activation de **STAT6**. STAT6 induit par la suite l'expression du facteur de transcription GATA3. Le même mécanisme est initié par l'IL-4 et l'IL-2 via l'activation de STAT5 (Cote-Sierra et al. 2004; Zhu 2010). *In vitro*, l'IL-2 joue un rôle particulièrement important dans la différenciation des LT CD4 en Th2. Des études ont montré que la neutralisation de l'IL-2 endogène affecte le développement des LT CD4 naïfs en Th2 sans pour autant influencer sur leur prolifération, cette dernière étant assurée par la présence d'IL-4 (Cote-Sierra, Foucras et al. 2004).

Le rôle de GATA-3 s'avère essentiel, en particulier durant la phase précoce de différenciation Th2. En effet, si sa présence est dispensable pour le maintien de l'accessibilité au gène *il-4*, elle permet en revanche de promouvoir son ouverture initiale (Zhu et al. 2006) et d'induire l'expression d'IL-4, -5, -13, CCR4 et IL4-R (Zhu 2010).

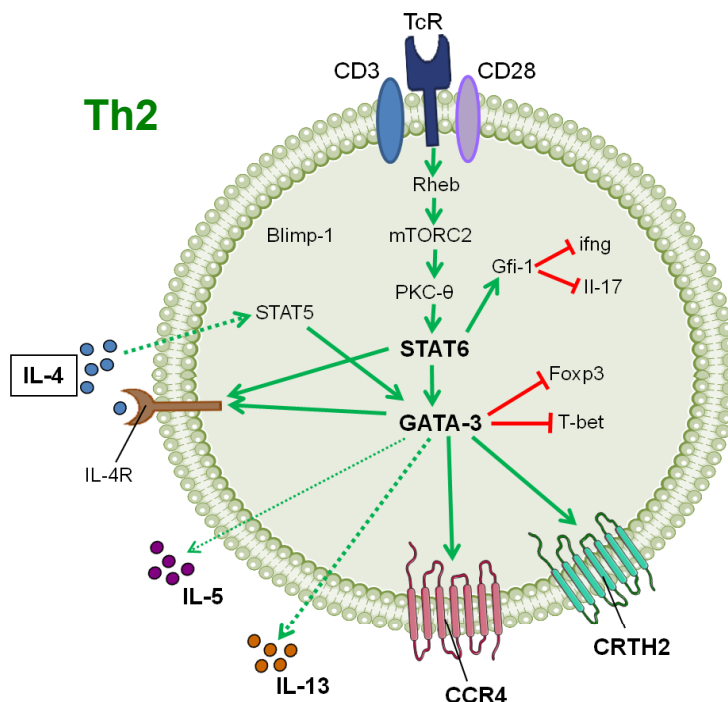


Figure 5 : Voies de signalisation impliquées dans la différenciation des lymphocytes Th2.

Rôle des Th2 dans les réponses antitumorales

Contrairement aux Th1, l'immunité médiée par les Th2 est traditionnellement considérée dans de nombreux cancers humains comme un facteur aggravant de la croissance tumorale, favorisant l'angiogénèse et inhibant l'immunité cellulaire (Feurino et al. 2007; De Monte et al. 2011). Classiquement, les Th2 sont connus pour leur rôle important dans l'aide apportée aux LB pour la production d'anticorps tels que les immunoglobulines (Ig)G1 ou l'IgE qui favorisent la croissance tumorale. Des études menées chez la souris ont montré que l'absence de LB confère une résistance accrue au développement de plusieurs types de tumeurs (carcinome du colon, mélanome) (Shah et al. 2005). De plus l'élimination de ces LB améliore l'efficacité d'une vaccination antitumorale chez la souris (Perricone et al. 2004). Ces expériences ont montré que l'activité pro-tumorale de ces LB s'exerçait via l'inhibition de la sécrétion d'IFN γ , des CTL et de l'activité NK (Perricone, Smith et al. 2004; Shah, Divekar et al. 2005). De plus, la sécrétion d'anticorps antitumoraux favorise la formation de complexes immuns (IC) associés à un mauvais pronostic de la maladie (Barbera-Guillem et al. 1999; Tan and Coussens 2007).

Malgré cet effet délétère des Th2, quelques études récentes ont cependant rapporté une activité antitumorale des Th2 (Ellyard, Simson et al. 2007). Dans le lymphome d'Hodgkin les patients présentant un nombre important de Th2 au sein de la tumeur avaient une meilleure survie (Schreck, Friebel et al. 2009). Des résultats similaires ont été obtenus dans le cancer du sein (Yoon et al. 2010). Chez la souris, l'effet antitumoral des Th2 est obtenu en particulier grâce à une collaboration avec des cellules infiltrant les tumeurs telles que les éosinophiles (Mattes et al. 2003) ou les cellules NK (Kitajima et al. 2011). Des études ont montré que l'injection d'IL-4 directement au sein de la tumeur ou dans les ganglions drainants inhibe la progression tumorale et favorise l'infiltration de la tumeur par des éosinophiles, macrophages et parfois également par des neutrophiles et lymphocytes (Tepper et al. 1992; Modesti et al. 1993). L'élimination des granulocytes résulte en une perte totale de l'effet antitumoral observé, suggérant le rôle important des éosinophiles dans la protection tumorale induite par l'IL-4 (Pericle et al. 1994). Dans ces conditions les LB, cellules NK ou mastocytes ne jouent pas un rôle prédominant et la présence de LT CD8 ne semble pas cruciale (Tepper, Coffman et al. 1992; Pericle, Giovarelli et al. 1994). Néanmoins la présence d'éosinophiles à elle seule ne confère pas d'immunité antitumorale si ceux-ci ne reçoivent pas les signaux activateurs appropriés (Samoszuk et al. 2004). En effet les éosinophiles peuvent aussi promouvoir la croissance tumorale par la sécrétion de facteurs tels que le VEGF (vascular endothelial growth factor), FGF-2 (fibroblast growth factor-2) ou l'IL-8 (Puxeddu et al. 2005). Leur rôle direct

dans l'angiogénèse tumorale reste néanmoins à être élucidé. Par opposition à l'immunité antitumorale médiée par les Th1 qui induit l'apoptose des cellules tumorales, l'immunité médiée par les Th2 entraîne une mort tumorale par nécrose (Tepper, Coffman et al. 1992). En effet, il a été rapporté que l'IL-4 possède des propriétés anti-angiogéniques (Volpert et al. 1998). Cependant, son utilisation *in vitro* a aussi mis en évidence sa capacité à inhiber l'apoptose des cellules tumorales - exception faite dans le cancer du rein (Falkensammer et al. 2006) - ce qui pourrait favoriser la croissance des tumeurs (Conticello et al. 2004). L'expression du récepteur à l'IL-4 (IL-4R) par les cellules tumorales a été retrouvée dans plusieurs types de cancers (Conticello, Pedini et al. 2004). Cependant, en dépit des résultats satisfaisants des traitements par IL-4 obtenus chez la souris, les essais cliniques n'ont pas eu l'efficacité escomptée (Whitehead et al. 1998; Whitehead et al. 2002). Probablement en cause la voie d'administration systémique ou à distance du site tumoral qui diffère des injections intra-tumorales efficaces administrées chez la souris.

En plus de l'IL-4, les Th2 produisent de l'IL-13. L'activité antitumorale de cette cytokine s'effectue préférentiellement par le biais des macrophages et des neutrophiles (Ma et al. 2004). Bien que la présence de macrophages associés aux tumeurs (TAM) soit généralement considérée comme un facteur de mauvais pronostic (Lewis and Pollard 2006), les macrophages ont aussi démontré une activité cytotoxique directe contre les cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (Corthay et al. 2005). Par opposition, l'IL-13 a montré sa capacité à inhiber l'IFN γ et l'activité des CTL (Terabe et al. 2000). Une expression accrue de la chaîne $\alpha 2$ récepteur à l'IL-13 a été détectée dans de nombreuses tumeurs (Terabe et al. 2004).

Les Th2 peuvent aussi favoriser la stimulation de LT CD8 de type-2 (Tc2) producteurs d'IL-4, -5 et -10. Il a été montré que ces Tc2 peuvent avoir une activité antitumorale, bien que cet effet soit clairement moins efficace que celui exercé par les CTL induits par les Th1 (Helmich and Dutton 2001). Néanmoins deux études récentes ont rapporté l'absence totale de réponses Tc2 antitumorales et dans les deux cas cette absence d'activité antitumorale était accompagnée d'une production massive d'IL-10 (Kemp and Ronchese 2001; Olver et al. 2006), cytokine connue pour son action immunosuppressive.

Les effets pro- et antitumoraux des Th2 sont illustrés dans la figure 6.

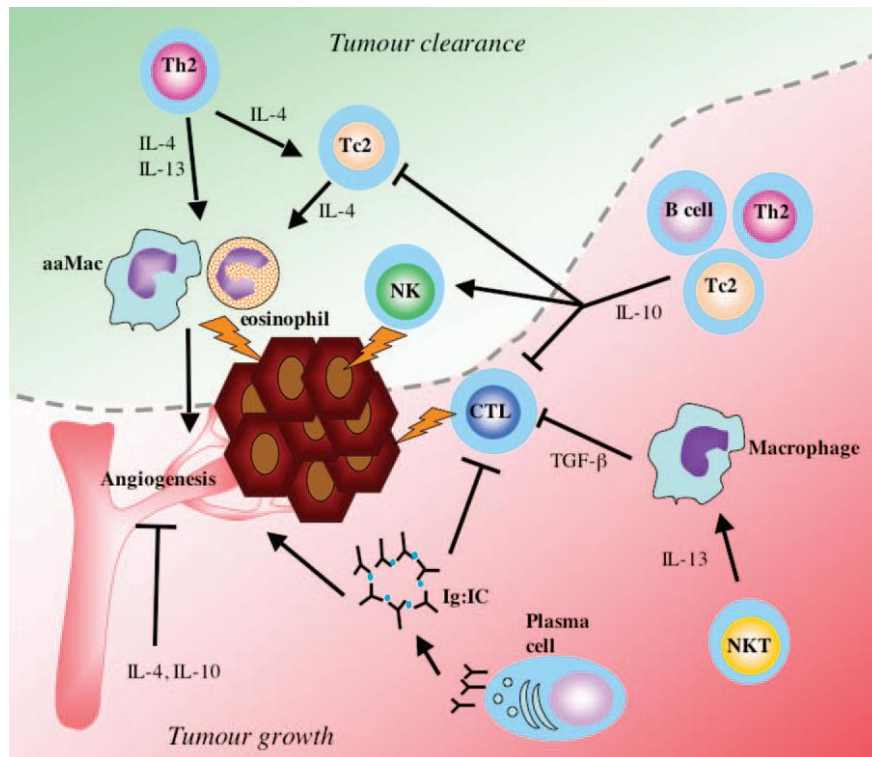


Figure 6 : Balance entre l'effet pro et antitumoral des Th2 dans les cancers. Ce modèle décrit comment les différents composants de l'immunité médiée par les Th2 peuvent inhiber la progression tumorale (zone verte) ou promouvoir le développement de la tumeur (zone rouge). La sécrétion d'IL-4 ou d'IL-13 par les Th2 induit le recrutement d'éosinophiles et de macrophages (aaMac) sur le site tumoral et favorise l'activité cytotoxique antitumorale. De la même façon, les CD8 Tc2 sécréteurs d'IL-4 collaborent avec ces cellules pour l'induction d'une protection tumorale. Par opposition, les Th2, Tc2 et les LB produisent de l'IL-10 qui inhibe l'activité antitumorale des CTL de même que le TGF- β sécrété par les macrophages CD11b⁺ activés par l'IL-13 dérivé des NKT (natural killer T). Cependant l'IL-10 peut aussi activer les fonctions antitumorales des cellules NK. Les plasmocytes favorisent la croissance tumorale par la sécrétion d'anticorps dirigés contre la tumeur qui forment des complexes immuns (Ig:IC), interférant avec l'activité antitumorale des CTL et favorisant l'angiogénèse. (Ellyard et al. 2007)

1.3.2. Les lymphocytes Th17

Bien que l'importance de la cytokine IL-17 dans différentes pathologies soit connue depuis plusieurs années, ce n'est que très récemment que les LT CD4 IL-17⁺ ont été identifiés comme une nouvelle sous-population d'effecteurs T distincte des Th1, Th2 et Treg (Weaver et al. 2006; Stockinger and Veldhoen 2007). Les Th17 sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription **ROR γ t**. De plus ils expriment un taux élevé de Fas (CD95) mais n'expriment pas PD-1, Foxp3, KLRG-1, CD57 et l'IL-10 (Wei et al. 2012). L'étude des Th17 isolés de différentes tumeurs humaines a montré qu'ils expriment fortement **CXCR4**, **CCR6**, **CD49**, **CD161** (KLRB1) (Zou and Restifo 2010). Cependant ces molécules ne sont pas exclusivement exprimées par les Th17. Ainsi à ce jour aucun récepteur spécifique de chimiokines n'est associé aux Th17 dans le microenvironnement tumoral. Les Th17

produisent de l'**IL-17a**, **IL-17f**, mais aussi **d'IL-21** et **IL-22**. De plus 50–90% de Th17 infiltrant les tumeurs produisent des taux importants de cytokines effectrices telles que l'IL-2, le GM-CSF, l'IFN γ ou du TNF (Kryczek et al. 2009). La différenciation des LT CD4 naïfs en Th17 est obtenue par la stimulation du TCR en présence de **TGF- β** et **d'IL-6** ou **d'IL-21**.

Différenciation des Th17

La différenciation en Th17 passe par une signalisation TCR impliquant la voie mTORC1 et l'expression de STAT3 (Figure 7). Parallèlement, la signalisation initiée par l'IL-6 induit l'activation successive de STAT3 et du facteur de transcription ROR γ t. Néanmoins l'induction d'une protéine ROR γ t pleinement fonctionnelle nécessite la participation du TGF- β . Des études récentes suggèrent que le TGF- β favorise l'expression de ROR γ t mais réprime sa fonction. Seule la présence d'IL-6 (ou d'IL-21) permet de lever cette inhibition (Zhou et al. 2008). L'expression des principales cytokines secrétées par les Th17 est régulée non seulement par les facteurs ROR mais aussi par d'autres protéines telles que STAT3, IRF4 et BATF (Brustle et al. 2007; Huber et al. 2008; Ciofani et al. 2012). Par ailleurs, la différenciation en Th17 est réprimée entre autre par la présence de la protéine SOCS3 (Suppressors of cytokine signaling)(Chen et al. 2006). Le rôle du TGF- β consiste alors à réprimer SOCS3, favorisant ainsi l'expression de STAT3 et le développement de LT CD4 en Th17 (Qin et al. 2009). De plus le signal médié par le TGF- β est nécessaire à l'expression de l'IL-17, du récepteur à l'IL-6 (IL-6R) mais aussi du récepteur à l'IL-23 (IL-23R) (Korn et al. 2009).

Bien qu'elle ne soit pas impliquée dans leur différenciation l'IL-23 joue un rôle important dans le maintien des fonctions effectrices des Th17 (Mangan et al. 2006). D'autres facteurs intracellulaires ont montré leur implication dans la voie de différenciation Th17 (Shi et al. 2011; Ciofani, Madar et al. 2012; Ueda et al. 2012), mais leur emplacement dans la chaîne de signalisation reste à être plus précisément déterminé.

Actuellement on ne sait pas si l'induction des Th17 associés aux tumeurs a lieu dans le microenvironnement tumoral ou à des sites distants. Cependant, le nombre élevé de macrophages retrouvés dans différents cancers tend à faire de cette population le principal inducteur des Th17 dans le microenvironnement tumoral chez l'homme (Zou et al. 2001; Kryczek et al. 2007).

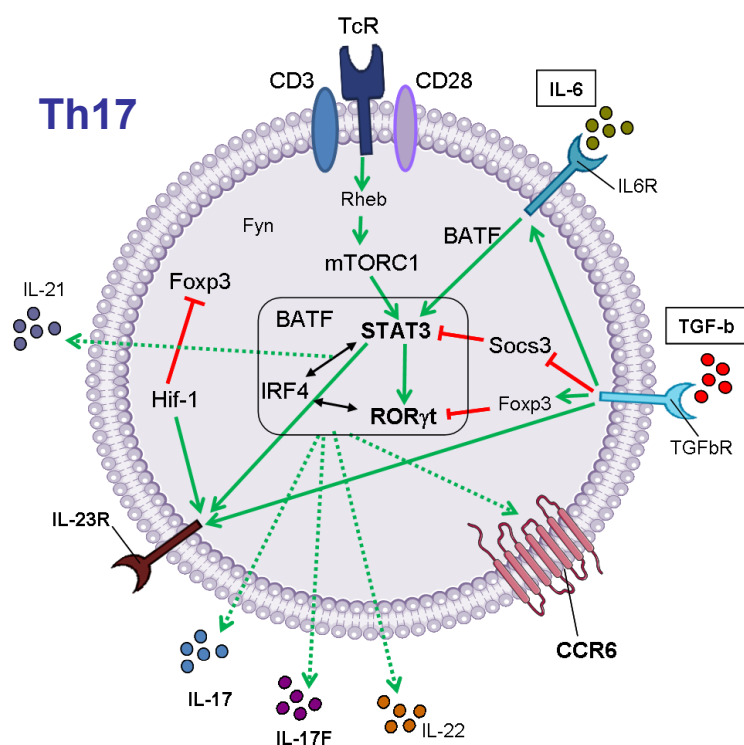


Figure 7 : Voies de signalisation impliquées dans la différenciation des Th17.

Rôle des Th17 dans la réponse antitumorale

Les Th17 ont jusqu'ici montré leur importance pour le contrôle des infections bactériennes extracellulaires et fongiques, ainsi que pour le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité innée comme les polynucléaires neutrophiles. Ils sont également impliqués dans plusieurs maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques telles que les scléroses multiples, les psoriasis ou l'arthrite rhumatoïde. Le rôle des Th17 dans l'immunité des cancers reste encore mal compris et controversé (Muranski and Restifo 2009; Wilke et al. 2011; Martin et al. 2012). Diverses études menées chez la souris ou chez des patients atteints de différents cancers affirment leur contribution dans le rejet tumoral, tandis que d'autres suggèrent que l'environnement inflammatoire créé par les Th17 favoriserait la croissance de la tumeur (Tableau 2).

Hôte	Modèle tumoral	Observations	Référence
SOURIS	Métastases pulmonaires de mélanome B16	Les CD4 Th17 favorisent les réponses CTL antitumorales	Muranski et al. 2008
	Cancer du pancréas	Injection de tumeurs IL-6+ induit un retard de croissance tumoral médiée par les Th17	Gnerlich et al. 2010
	Mélanome B16	Effet thérapeutique des Th17 associé à une stimulation des CTL antitumoraux	Ankathatti et al. 2011
	Cancer mammaire	Les TILs IL-17+ promeuvent la croissance tumorale en favorisant l'angiogénèse	Du et al. 2012
HOMME	Cancer de l'ovaire	Corrélation positive entre la survie des patients et l'infiltrat Th17 intratumoral	Kryczek et al. 2009
	Cancer du pancréas	Corrélation entre l'augmentation intratumorale des Th17 et l'échappement tumoral	Wang et al. 2011
	Cancer colorectal	L'expression d'un profil génique Th17 dans le microenvironnement tumoral est facteur de mauvais pronostic	Tosolini et al. 2011
	Cancer cervical utérin	Corrélation entre l'augmentation des TILs IL-17+ et l'angiogénèse intratumorale	Hou et al. 2012
	Gliome malin	Contribution des Th17 dans l'immunosuppression via la sécrétion d'IL-10 induite par TGF- β 1	Paladugu et al. 2012

Effet pro-tumoral

Effet antitumoral

Tableau 2 : Rôle ambivalent des Th17 dans l'immunité antitumorale

Les preuves d'une activité antitumorale des Th17 résident en la capacité des TIL Th17 à exprimer des cytokines effectrices similaires à celles retrouvées chez les patients atteints de maladies infectieuses (Almeida et al. 2007). Ces observations suggèrent que les Th17 agiraient comme des LT effecteurs fonctionnels. En accord avec cette hypothèse, chez l'homme comme chez la souris, les Th17 sont à la fois négativement corrélés à la présence de Treg (Curiel, Coukos et al. 2004; Kryczek, Banerjee et al. 2009) et positivement corrélés à la présence de cellules immunitaires effectrices (CTL, NK...) (Kryczek, Banerjee et al. 2009). Chez la souris déficiente en IL-17, la croissance des cellules tumorales et le développement de métastases pulmonaires sont accélérés dans plusieurs modèles tumoraux. Inversement l'expression ectopique d'IL-17 dans les tumeurs inhibe la progression tumorale (Martin-Orozco et al. 2009). De plus, les immunothérapies qui sont associées à une augmentation de l'activité des Th17 - telles que le traitement par IL-7 (Pellegrini et al. 2009) ou la vaccination avec les protéines HSP70 (heat shock protein 70) (Kottke et al. 2007) - présentent une meilleure immunité antitumorale. De même, dans le cancer du mélanome, les traitements par anti-CTLA4 entraînent l'induction de Th17. Le taux d'IL-17 détecté dans les ascites associées

aux tumeurs est alors positivement corrélé à la survie des patients (von Euw et al. 2009). Compte tenu de l'absence d'expression de granzyme ou de perforine par les Th17 chez l'homme, leur activité antitumorale s'effectuerait de manière indirecte via le recrutement d'autres cellules effectrices (Zhang et al. 2003; Galon et al. 2006; Kryczek, Banerjee et al. 2009; Martin-Orozco, Muranski et al. 2009) (Figure 8).

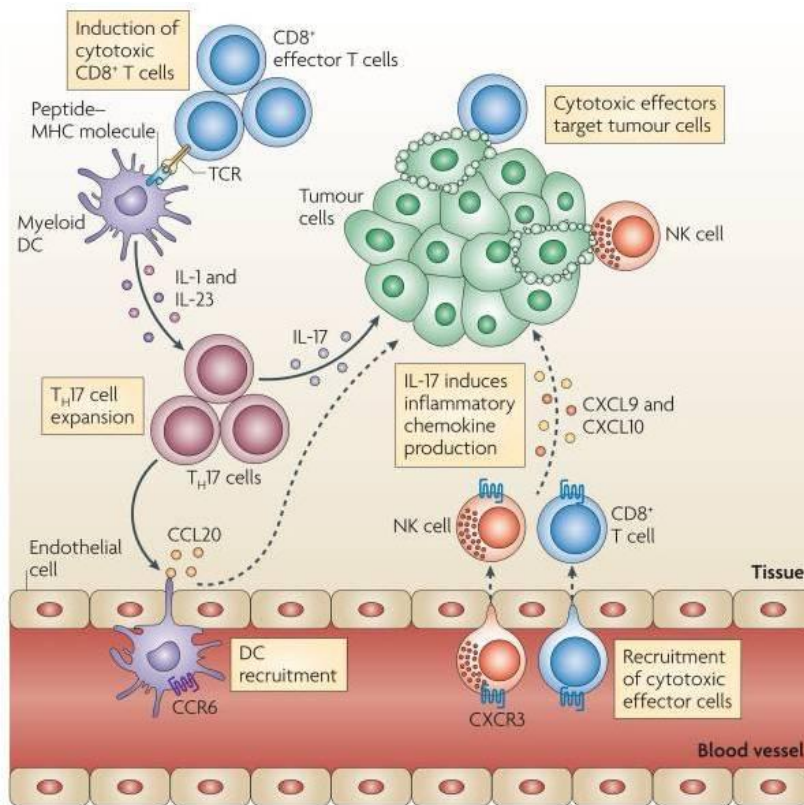


Figure 8 : Les Th17 et l'immunité antitumorale. Les Th17 sont recrutées dans le microenvironnement tumoral et prolifèrent en réponse à l'antigène tumoral présenté par les APC, telles que les cellules dendritiques myéloïdes, et en présence d'IL-1 et d'IL-23. Les Th17 favorisent le recrutement et la rétention des effecteurs T et des NK sur le site tumoral via l'induction de la production des chimiokines CXCL9 et CXCL10 par les cellules tumorales. De plus, les Th17 favorisent l'induction de CCL20 par les cellules tumorales, entraînant le recrutement de DC CCR6+. (Zou and Restifo 2010)

Bien qu'un rôle antitumoral des Th17 ait été mis en évidence, plusieurs études ont également observé une activité pro-tumorale de ces cellules. Les premières études sur l'IL-17 ont montré que cette cytokine favorise la croissance tumorale et les mécanismes d'angiogénèse, en particulier chez les souris immunodéficientes (Tartour et al. 1999; Numasaki et al. 2003). L'IL-17 induit la production d'IL-6 par les cellules tumorales et les cellules du stroma tumoral, conduisant à l'augmentation de l'expression de gènes pro-angiogéniques (Wang et al. 2009) et à l'expression d'ectonucleotidases par les Th17 (Chalmin et al. 2012). En soutien de ces observations, une autre étude a montré que les tumeurs sécrètent de l'IL-23, facteur de prolifération et de survie des Th17, ce qui participe ainsi à l'inhibition de la réponse antitumorale (Langowski et al. 2006).

Actuellement il n'existe aucune stratégie d'immunothérapie antitumorale basée sur l'utilisation des Th17 chez l'homme.

1.4. Autres populations de LT CD4 helper

Les **TFH** se différencient suite à une stimulation du TCR en présence des cytokines **IL-6** et **IL-21**. Il existe deux populations de TFH, une localisée au niveau des amygdales et l'autre située dans les centres germinatifs (GC TFH) (Fazilleau et al. 2009). La différence entre ces populations réside principalement en l'expression de **Bcl-6**, facteur nécessaire et suffisant à leur développement *in vivo*. Contrairement aux GC TFH, les TFH des amygdales expriment un niveau élevé d'ARNm Bcl-6 qui n'est pas corrélé avec l'expression de la protéine (Crotty et al. 2010). Les TFH expriment **CXCR5**, **CXCL13** (chez l'homme), **PD-1**, et **ICOS** (Kroenke et al. 2012). Chez l'homme, le récepteur CXCR4 exprimé par les CG TFH permet en particulier leur migration au niveau de la zone sombre des centres germinatifs. Parallèlement, l'absence d'expression du récepteur CCR7 empêche la relocalisation des TFH dans les zones T (Hardtke et al. 2005).

Les TFH induisent également principalement la production des cytokines **IL-21** et **IL-4**. En 2000, Breitfeld et al. ont décrit les TFH comme une sous-population de LT CD4 impliquée dans l'aide apportée aux LB pour la production d'anticorps. A ce jour, le rôle des TFH dans l'immunité antitumorale n'est pas connu.

Une autre sous-population de LT CD4 a été identifiée en 2009 par Trifari et al. : les **Th22** (Trifari et al. 2009). Ces cellules produisent de l'**IL-22** (cytokine membre de la famille de l'IL-10), du **TNF** et de l'**IL-13** ainsi que d'autres facteurs impliqués dans le remodelage cellulaire. A ce jour, les Th22 n'ont pas pu être mis en évidence chez la souris. Les caractéristiques et le mécanisme de développement de cette sous-population de LT CD4 chez l'homme restent à être explorés. Par conséquent très peu d'études ont analysé le rôle des Th22 dans l'immunologie des tumeurs (Liu et al. 2012; Zhuang et al. 2012).

L'ensemble des sous-populations de LT CD4 décrites dans ce chapitre ainsi que la complexité de leurs fonctions parfois contradictoires soulignent l'importance de leur étude dans l'immunité antitumorale. Les principaux facteurs impliqués dans la différenciation ces LT CD4 et leur impact sur la réponse antitumorale sont résumés dans la figure 9.

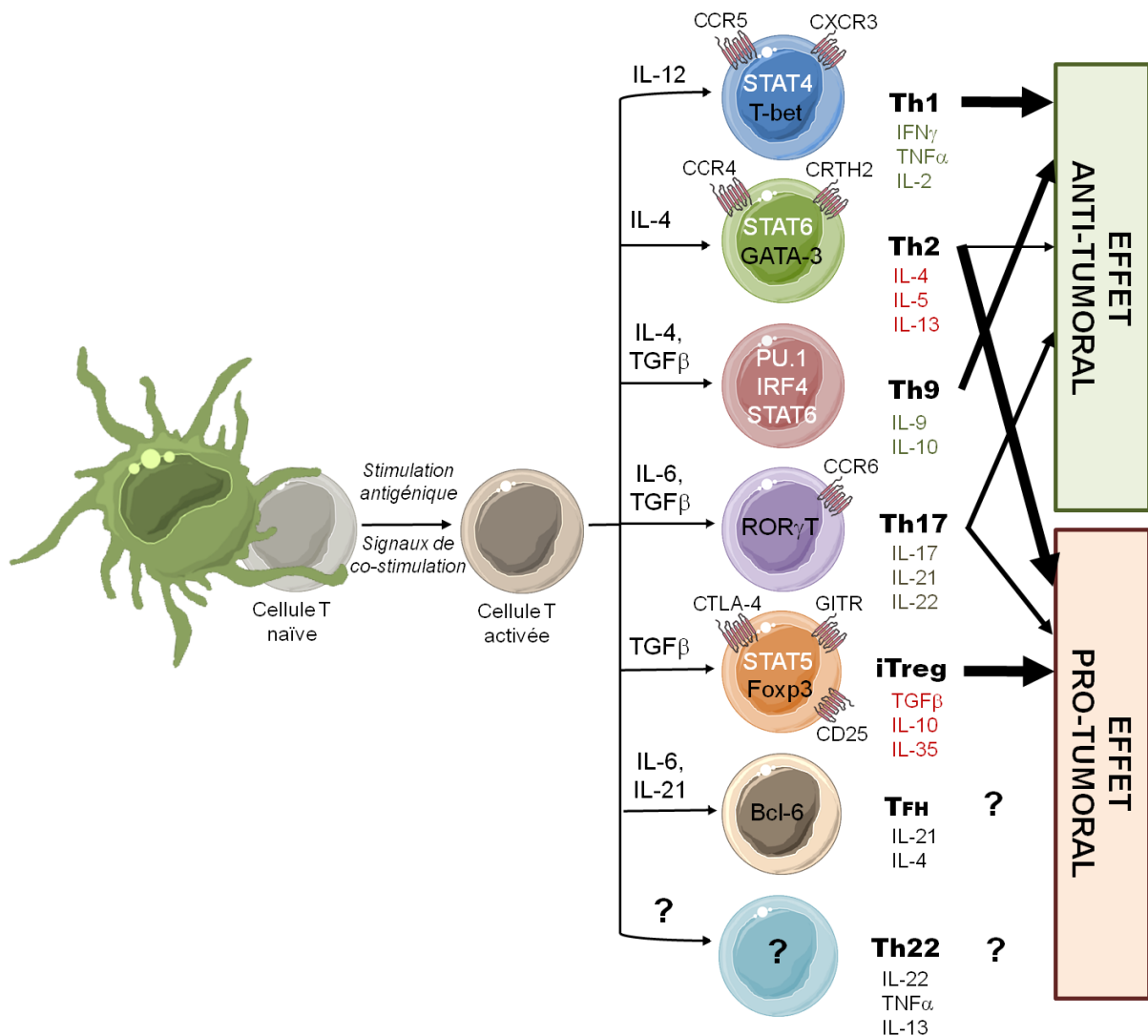


Figure 9 : Polarisation des différentes sous-populations de LT CD4 et leurs rôles dans l'immunité antitumorale.

2. Hétérogénéité et plasticité de la polarisation des lymphocytes T CD4 helper

Chaque sous-population de LT CD4 helper est capable de produire au moins une cytokine correspondant à son profil. Cependant les cellules d'une même sous-population ne sécrètent pas forcément les mêmes cytokines, traduisant ainsi leur **hétérogénéité**. En effet la plupart des lymphocytes T stimulés ne produisent pas l'ensemble des cytokines associées à leur profil. Par exemple les lymphocytes Th2 peuvent se différencier en sous populations IL-4^{hi}IL-5^{lo} ou IL-4^{lo}IL-5^{hi}, différenciables respectivement par leur expression de CCR4 (révéléateur d'une activation précoce des Th2) ou CCR8 (retrouvé sur les Th2 déjà polarisés) (Breitfeld 2000 JEM). Dans le cas d'infections virales, les patients répondant au traitement

présentent une fréquence élevée de LT CD4 polyfonctionnels capables de produire à la fois de l'IL-2 et de l'IFN γ comparé aux patients présentant une maladie progressive (Harari et al. 2004; Semmo et al. 2005). Compte tenu de ces observations Seder et al. ont proposé un modèle de différenciation des LT CD4 effecteurs et mémoires (figure 10) (Seder et al. 2008). Cette polyfonctionnalité des LT CD4, notamment des cellules CD4 Th1, se révèle être un important paramètre dans l'induction d'une réponse T antitumorale efficace.

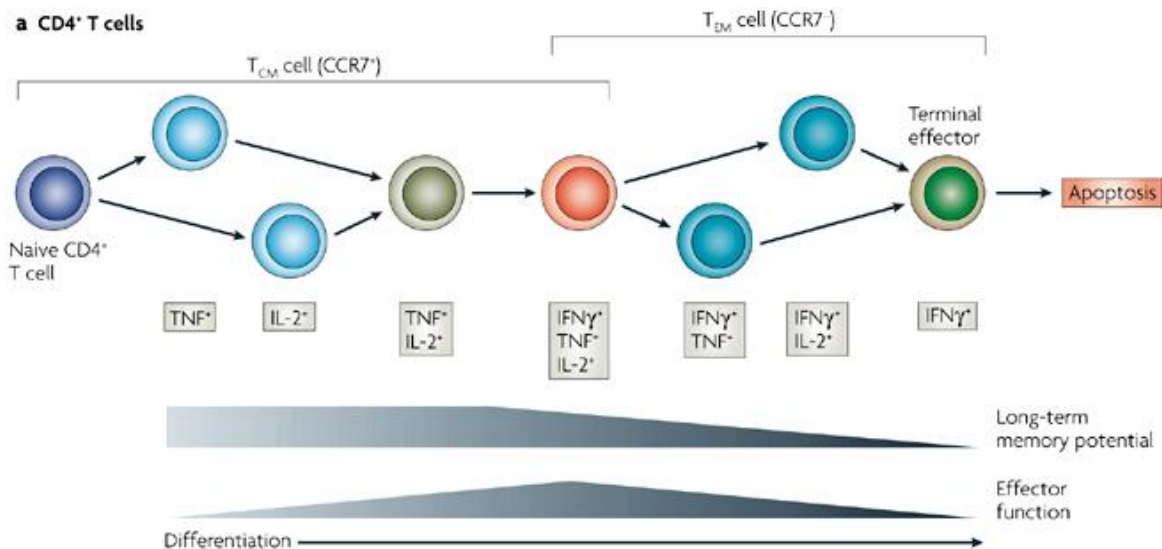


Figure 10 : Modèle de différenciation des LT CD4 effecteurs et mémoires. La stimulation antigénique continue peut entraîner progressivement une perte du potentiel mémoire et de la production de cytokines, aboutissant à une différenciation terminale en LT CD4 sécréteurs uniquement d'IFN γ et de durée de vie limitée. Après stimulation antigénique, chacune de ces sous-populations différenciées peut se développer en LT CD4 effecteurs activés conduisant par la suite à la mort du LT par apoptose. Les niveaux d'expression et d'exposition initiaux à l'antigène ainsi que les différents facteurs présents dans le microenvironnement gouvernent cette différenciation. T_{CM} : LT centraux mémoires, T_{EM} : LT effecteurs mémoires. (Seder RA et al., 2008, Nature)

Parallèlement, de plus en plus de travaux démontrent continuellement que certaines populations de LT CD4 définies par leurs fonctions et l'expression d'un facteur de transcription particulier, ne sont pas nécessairement stables (Bluestone et al. 2009; O'Shea and Paul 2010; Nakayamada, Takahashi et al. 2012) (Figure 11). La capacité des lymphocytes T à se transdifférencier d'un type cellulaire à un autre ou à changer de phénotype en fonction des cytokines présentes dans le microenvironnement reflète ainsi leur **plasticité**. D'abord considérée comme une cytokine Th2, l'IL-10 est maintenant reconnue comme étant sécrétée par de multiples populations cellulaires (Th1, Treg), agissant par feedback négatif pour contrôler l'amplitude des réponses immunes et éviter des dommages tissulaires (Kubo and Motomura 2012). Cette plasticité peut aussi expliquer les observations contradictoires sur

l'effet antitumoral de certaines sous-populations de LT CD4 comme les Th17 (Martin, Apetoh et al. 2012). Ces cellules ont montré leur capacité *in vivo* et *in vitro* à se convertir en Th1. L'acquisition de la capacité à produire de l'IFN γ par les Th17, en particulier conjointement à la production d'IL-17, est un phénomène fréquemment décrit (Wilson et al. 2007; Lee et al. 2009). Plusieurs autres études menées *in vitro* ou *in vivo* ont permis de rendre compte de ces phénomènes de conversion. Ahmadzadeh et al. ont notamment démontré que des populations clonales de LT CD4 mémoires spécifiques d'un antigène pouvaient sécréter préférentiellement des cytokines Th1 ou Th2 selon la nature du stimuli reçu (Ahmadzadeh and Farber 2002). En présence d'IFN γ , les cellules Th2 mémoires ont montré leur capacité à co-exprimer GATA-3 et T-bet tout en produisant à la fois de l'IL-4 et de l'IFN γ (Hegazy et al. 2010). De la même manière, les Th2 mémoires peuvent se différencier en lymphocytes Th2 GATA3⁺ ROR γ t⁺ sécrétrices d'IL-17 dans les cas d'allergies chroniques sévères.

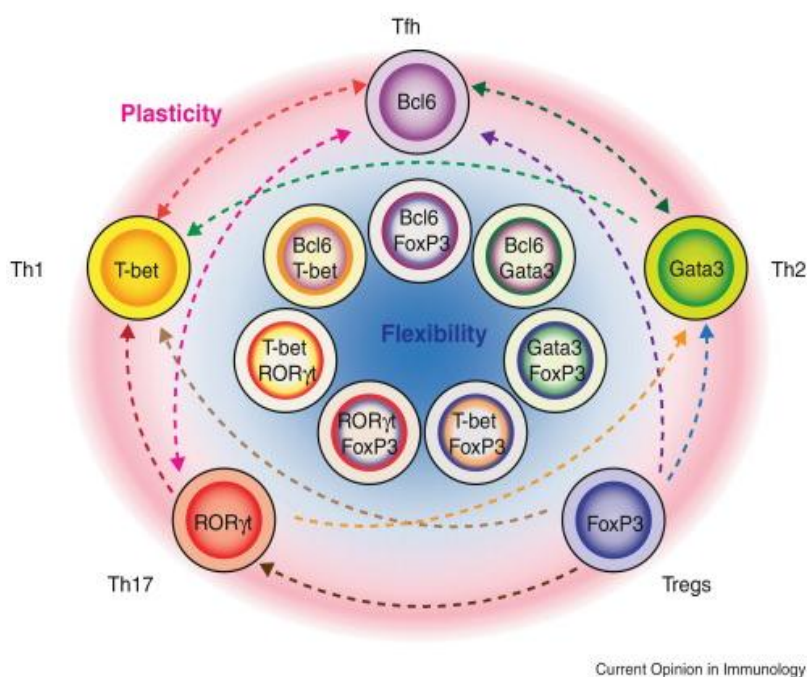


Figure 11 : Plasticité et flexibilité des principales sous-populations de LT CD4 helper. De récentes études ont mis en évidence une flexibilité dans l'expression des facteurs de transcription majeurs des différentes sous-populations de LT CD4, ces dernières pouvant en exprimer parfois plus d'un. De plus, il existe de nombreux exemples où les phénotypes des LT CD4 conduisent à un changement de leurs profils cytokiniques. (Nakayama et al. 2012).

Le phénotype et la restriction de l'expression des gènes dépendent non seulement de l'action de facteurs de transcription mais aussi de l'état de la chromatine qui va permettre ou non à ces facteurs d'accéder aux gènes et d'exercer leur effet. Ainsi les **modifications épigénétiques** qui vont avoir lieu durant la différenciation des LT CD4 vont contribuer à leur profil héritable et à leur plasticité (Hirahara et al. 2011; Kanno et al. 2012).

Le terme d'épigénétique désigne les changements héritaires dans le phénotype ou l'expression de gènes sans qu'aucune modification de la séquence ADN n'ait lieu. Plus récemment le terme d'épigénétique s'est vu attribué un aspect plus biochimique. Parmi les éléments qui

constituent cette information épigénétique on trouve notamment : i) des modifications au niveau de la queue N-terminale des histones par le biais de mécanismes d'acétylation, méthylation ou phosphorylation ; ii) l'état de méthylation de l'ADN ; iii) le positionnement des nucléosomes au travers d'un remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP ; iv) les interactions avec la chromatine / la conformation du chromosome. Par extension, le terme d'épigénétique peut également faire référence à d'autres mécanismes tels que les ARN non-codants ou les microARN. Les modifications épigénétiques ont la capacité de pouvoir persister en absence de signaux extérieurs continus ou des facteurs de transcriptions qui les ont initialement induites. C'est ainsi que ces mécanismes agissent pour préserver la mémoire cellulaire et le maintien de l'identité cellulaire.

La modification des histones est associée à la régulation de l'expression de gènes via la condensation ou la relaxation de la chromatine qui va respectivement réprimer ou activer la transcription. Notamment, la triméthylation de H3K4 (H3K4me3) est associée à une activation génique alors que la triméthylation de H3K27 (H3K27me3) va servir à réprimer l'expression des gènes. Les récents progrès réalisés dans l'étude des 'marques' épigénétiques des histones chez les LT CD4 humains et la cartographie de ces différentes modifications (H3K4me3 et H3K27me3) sur l'ensemble du génome des LT CD4 naïfs, Th1, Th2, Th17, iTreg et nTreg a permis d'expliquer certains comportements des LT 'helper' comme leur plasticité (Wei et al. 2009).

Les promoteurs proximaux de gènes de cytokines ont montré la présence de marques permissives à la transcription (H3K4me3) dans les sous-populations de LT CD4 respectivement polarisés selon les cytokines présentes dans le microenvironnement (par exemple, la présence de H3K4me3 au niveau du promoteur proximal du gène *ifng* pour les Th1) qui sont accompagnées par des marques suppressives (H3K27me3) dans les autres populations. De façon surprenante, le profil de méthylation des histones de gènes codant pour des facteurs de transcriptions majeurs impliqués dans la polarisation des LT CD4 présentait à la fois des marques permissives et répressives dans les sous-populations de cellules qui ne sont normalement pas censées l'exprimer. Par exemple, le promoteur du gène *Tbx21* (qui code pour le facteur de transcription T-bet) est associé aux marques H3K4me3 dans les Th1. Alors que la marque H3K27me3 est présente dans les Th2 et Th17, la marque H3K4me3 est également retrouvée bien que le facteur de transcription T-bet ne soit pas exprimé (Figure 12). De telles régions sont appelées des **domaines bivalents**. Ceci peut expliquer comment T-bet pourrait être induit dans les Th2, Th17 et Treg. Le locus *gata3* a aussi été rapporté comme présentant un domaine bivalent ce qui explique comment une nouvelle population de Th2 mémoire/effecteur, qui exprime GATA3 et RORγt et produit des cytokines Th17 et Th2, peut

émerger (Wang et al. 2010). De même, *Foxp3* est associé à la présence de marques H3K4me3 dans les Treg, et H3K27me3 est sans surprise détecté dans les Th1 et Th2. Cependant, aucune marque répressive n'est retrouvée au niveau du locus *Foxp3* chez les Th17 ce qui corrèle avec les preuves indiquant que *Foxp3* peut être exprimé par les Th17 (Zhou, Lopes et al. 2008).

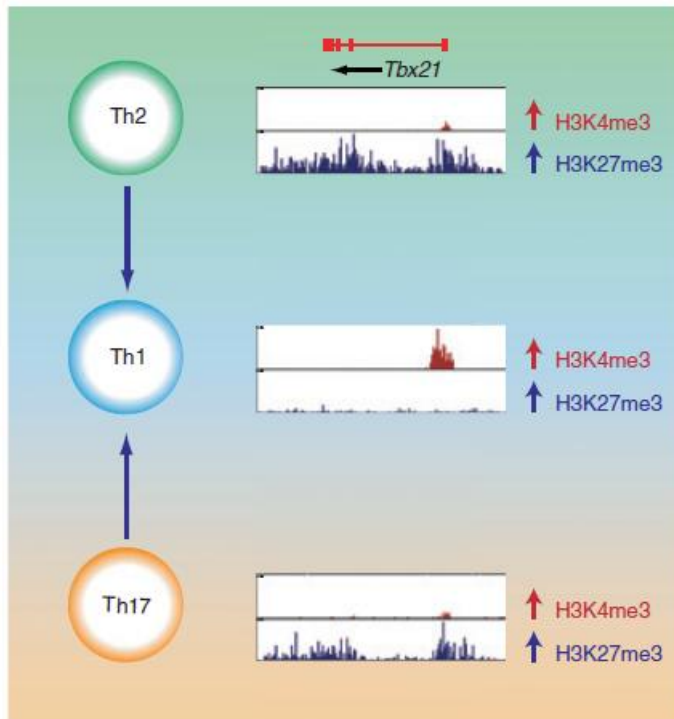


Figure 12 : Les modifications épigénétiques bivalentes de gènes régulateurs majeurs peuvent contribuer à la plasticité des sous-populations de LT CD4 helper. Les modifications H3K4me3 (rouge) et H3K27me3 (bleu) au niveau du locus *Tbx21* chez les Th1, Th2 et Th17 sont montrées. Dans les Th1, le promoteur de *Tbx21* est fortement enrichi en marques permissives (H3K4me3) et dépourvu de marques répressives (H3K27me3). Dans les Th2 et Th17, les deux marques H3K4me3 et H3K27me3 sont présentes le long du gène. C'est ce qu'on appelle une structure chromatine bivalente. (Hirahara et al. 2011).

Compte tenu des différents facteurs agissant sur l'hétérogénéité et la plasticité des LT CD4, il convient donc de bien cerner et suivre le profil d'orientation des LT CD4 induits au cours des stratégies d'immunothérapies antitumorales.

II. Les antigènes associés aux tumeurs

Pour que le système immunitaire réagisse contre une tumeur, cette dernière doit exprimer des antigènes reconnus comme 'étrangers'. De nombreuses modifications surviennent dans la cellule au cours du processus d'oncogenèse. Ainsi un large panel d'antigènes tumoraux capables d'être reconnus par les lymphocytes T a été identifié et certains sont actuellement utilisés en clinique.

Dans cette partie nous aborderons le rôle des antigènes tumeurs dans l'immunosurveillance des tumeurs et leur classification. Nous décrirons également les différentes méthodes utilisées pour l'identification d'épitopes T CD4 dérivés de ces antigènes.

1. Rôle des antigènes tumoraux dans l'immunosurveillance des cancers

L'identification et la caractérisation moléculaire du premier antigène tumoral chez l'homme au début des années 1990 a constitué une étape décisive pour l'immunologie des tumeurs et le développement d'immunothérapies anticancéreuses. A la suite de ce travail pionnier des centaines d'antigènes associés aux tumeurs et reconnus par le système immunitaire ont été isolés (Cheever et al. 2009). L'importance de ces antigènes tumoraux dans l'immunosurveillance a pu être mise en évidence dans un certain nombre de travaux. Le **niveau d'antigène exprimé par la tumeur** joue en particulier un rôle important dans la balance favorisant l'immunité ou la tolérance. L'étude in vitro de différentes lignées de mélanomes a montré que l'efficacité cytolytique des CTL contre ces cellules dépendait du taux d'antigène exprimé par la tumeur (Labarriere et al. 1997). Une étude menée chez la souris dans un modèle de mélanome a montré qu'à une certaine concentration, la sécrétion de TSA (tumor-specific antigen) par les cellules tumorales facilitait l'immunosurveillance des cancers et favorisait l'activation des LT CD4 naïfs spécifiques de la tumeur (Corthay et al. 2011).

En dépit de ces observations, il existe très peu d'informations concernant la capacité des antigènes exprimés par les tumeurs naissantes à induire une immunité anti-tumorale protectrice. A savoir si la présence de ces antigènes natifs suffit à une immunosurveillance efficace ou bien si leur expression est modulée par le système immunitaire. Ce n'est qu'en 2012 que l'équipe de Schreiber a pu adresser cette question à partir d'une approche

génomique analysant les séquences des exomes dans les cancers. Il a ainsi démontré que l'immunosurveillance d'une tumeur non éditée pouvait être attribuée à **l'expression d'antigènes tumoraux fortement immunogènes**, et que le développement de cellules tumorales ayant perdu ces antigènes via une immunosélection T-dépendante représentait un des mécanismes de l'immunoediting des cancers (Matsushita et al. 2012).

Compte tenu de l'hétérogénéité des différents types histologiques de cancers, un des obstacles majeurs rencontrés par les immunologistes réside néanmoins en la **nécessité de trouver des antigènes cibles appropriés** afin de concevoir des traitements idéalement applicables à un large panel de cancers chez l'homme.

2. Classification des antigènes tumoraux

La classification des antigènes tumoraux s'effectue en fonction de leur profil d'expression et leur origine (Boon et al. 1992; Dalglish and Pandha 2007). Les antigènes dits 'spécifiques de tumeur' (tumor-specific antigen, TSA) sont issus de mutations géniques et sont exprimés exclusivement par la tumeur. Néanmoins la plupart résultent d'altérations d'antigènes exprimés non seulement par les tumeurs mais aussi par d'autres tissus de l'organisme (tumor-associated antigen, TAA). On y distingue les antigènes spécifiques du type cancer/testis, les antigènes de différenciation et les antigènes surexprimés. Enfin, des antigènes viraux peuvent également être exprimés de façon non spécifique par la tumeur. Une liste non exhaustive de ces 5 catégories d'antigènes tumoraux est illustrée dans la figure 13.

2.1. Les antigènes mutés à spécificité unique (TSA)

Il est clairement établi que les nombreuses mutations génétiques caractérisant les cellules tumorales entraînent une modification de leur profil d'expression génique, aboutissant à l'expression de nouveaux antigènes associés aux tumeurs (Pardoll 2003). Ainsi les antigènes dits 'spécifiques de tumeur' (tumor-specific antigen, TSA) sont issus de mutations géniques à l'origine de la production de nouveaux antigènes de tumeurs. Différents antigènes de cette catégorie ont été identifiés telles que des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (CDK4) (Wolfel et al. 1995), dans le contrôle de la prolifération (β -caténine) (Robbins and Kawakami 1996) ou dans l'induction de l'apoptose (CASP-8) (Mandelboim et al. 1994). D'autres antigènes sont les produits de mutation touchant le proto-

oncogène ras ou le gène suppresseur de tumeurs p53 et sont reconnus par les cellules T (Gedde-Dahl et al. 1992; Theobald et al. 1995; Gjertsen et al. 2001).

Présentes uniquement dans les tumeurs, ces nouvelles protéines apparaissent donc comme des cibles idéales pour le système immunitaire. Cependant ces mutations - donnant souvent naissance à des protéines peu immunogènes - ne sont pas identiques à chaque tumeur et nécessitent l'identification de la protéine mutée au sein de la tumeur de chaque individu, afin de mettre en place un traitement personnalisé. Cet inconvénient exclut l'utilisation de ces nouveaux antigènes pour l'élaboration d'immunothérapies antitumorales à grande échelle.

2.2. Les antigènes du groupe cancer / testis

Ces antigènes sont codés par des gènes qui sont activés dans certaines tumeurs notamment, dans le mélanome, et complètement silencieux dans les tissus normaux à l'exception de quelques organes immuno-privilegiés. Cette classe d'antigènes est aussi nommée « Cancer/Testis » car ces antigènes sont exprimés en quantité significative dans les cellules germinales. A ce jour plus de 40 gènes ou familles de gènes ont été identifiés, comptant plus de 90 antigènes. Ils sont regroupés en superfamilles MAGE, puis familles (MAGE-A, MAGE-B, MAGE-C) et parfois isolés (BAGE). Ces antigènes spécifiques de tumeur sont les candidats les plus utilisés pour l'immunothérapie antitumorale, notamment dans le mélanome (Romero et al. 2006).

2.3. Les antigènes de différenciation

Les antigènes de différenciation sont exprimés dans la tumeur et dans le tissu sain dont elle est issue. Plusieurs antigènes de ce type ont été décrits dans le mélanome en particulier. Dans ce cas, les lymphocytes antitumoraux reconnaissent également les mélanocytes sains. Des études antérieures avaient associé la destruction des mélanocytes sains (vitiligo) avec une régression tumorale et une amélioration du pronostic clinique de patients atteints de mélanome (Duhra and Ilchyshyn 1991). Les antigènes de différenciation mélanocytaires exprimés à la fois dans les cellules saines et dans les cellules tumorales sont souvent reconnus par les TIL (Kawakami et al. 1995). De plus des études ont mis en évidence chez des donneurs sains l'existence de LT précurseurs réactifs vis-à-vis des antigènes dérivés de la tyrosinase ou de Melan-A/Mart-1 (van Elsas et al. 1996; Visseren et al. 1997). L'induction d'une rupture de tolérance immunitaire a rendu ces antigènes particulièrement intéressants pour une immunothérapie du mélanome. Ces données ont été confortées par les résultats de

nombreux essais cliniques de vaccination utilisant des antigènes de différenciation. L'induction d'une auto-immunité contre les mélanocytes et les mélanomes spécifiques de l'antigène vaccinal a été rapportée (Jaeger et al. 1996; Scheibenbogen et al. 2000).

2.4. Les antigènes surexprimés

Ces antigènes sont présents à des taux particulièrement faibles dans les cellules saines mais surexprimés spécifiquement dans un nombre important de cellules tumorales de différentes origines. Pour cette raison les LT spécifiques de ces antigènes reconnaissent directement ou indirectement les cellules tumorales, mais pas les cellules saines. En effet un seuil minimal d'expression d'antigène semble être nécessaire à l'activation des LT (Lethe et al. 1998). Deux antigènes typiques de cette catégorie sont la protéine HER-2/neu surexprimée dans environ 30% des cancers du sein et de l'ovaire (Pauletti et al. 1996; Press et al. 1997), ainsi que l'antigène TERT surexprimé dans près de 90% des cancers humains (voir chapitre 'télomérase').

2.5. Les antigènes viraux

Les tumeurs associées aux virus expriment des antigènes viraux identiques entre différentes tumeurs, et constituent donc des cibles thérapeutiques potentielles (Dalglish and Pandha 2007). C'est le cas par exemple des cancers génitaux associés au papillomavirus. Les protéines E6 et E7 exprimées par les souches virales oncogènes dont le prototype est le HPV16, peuvent être des cibles pour les LT anti-tumoraux. Des peptides immunogènes dérivés de E7 restreints HLA-A2 ont été détectés chez les patients atteints de cancer du col après restimulation *in vitro* (Ressing et al. 1995).

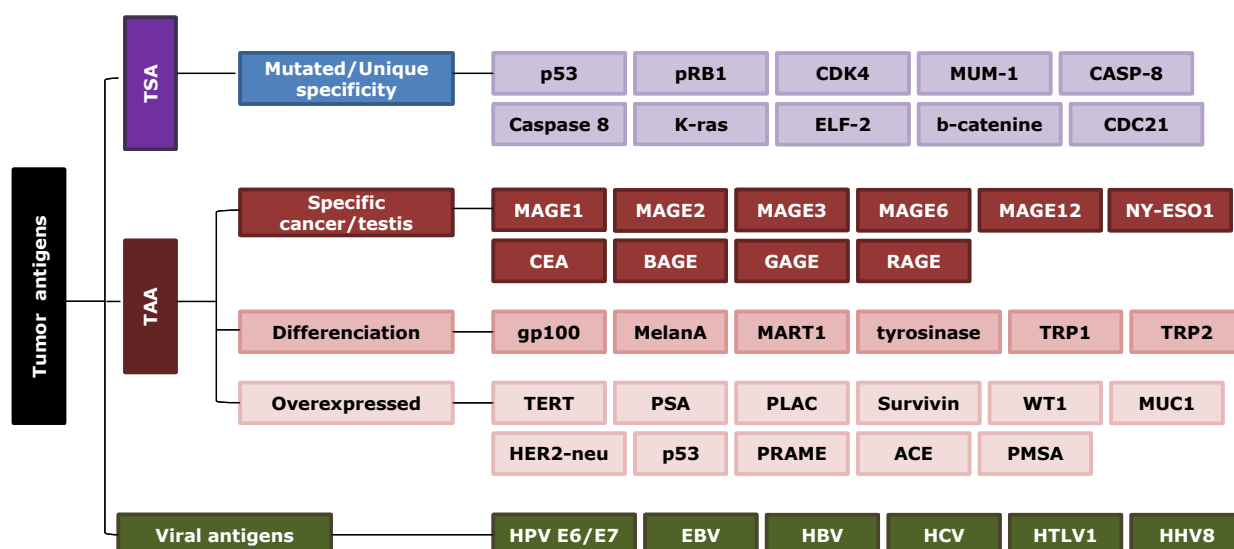


Figure 13 : Classification des antigènes tumoraux selon la nature de leur expression. pRB1 : Retinoblastoma type 1 ; MAGE : Melanoma associated antigen ; BAGE : B melanoma antigen ; RAGE : Renal associated antigen TERT : télomerase reverse transcriptase ; PSA : prostate-specific antigen ; PLAC : placenta specific protein 1 ; WT1 : Wilm's tumor gene-1 ; PRAME : preferentially expressed antigen of melanoma ; CEA : carcinoembryonic antigen ; PMSA : prostate specific membrane antigen ; HPV : human papillomavirus ; EBV : epstein-Barr virus ; HBV : hépatite B virus ; HCV : hépatite C virus ; HTLV1 : human T lymphotropic virus-1 ; HHV8 : human herpes virus 8.

Compte tenu de la grande hétérogénéité de ces TAA, celle-ci constitue une des limites au développement d'immunothérapies capables de cibler plusieurs cancers.

Dans cette optique, un groupe d'experts scientifiques a proposé d'autres critères permettant de classer les antigènes tumoraux relevant pour la clinique (Cheever, Allison et al. 2009) (Figure 14). Les critères majeurs définissant un antigène tumoral sont définis par : i) une fonction thérapeutique; ii) immunogénicité; iii) spécificité; iv) rôle important dans l'oncogenèse; v) expression dans la majorité des cellules cancéreuses y compris dans les cellules souches cancéreuses; vi) absence d'expression ou une expression réduite dans les tissus normaux.

Ces nouveaux critères de classification ajoutent une nouvelle piste pour la sélection d'un 'antigène tumoral idéal'. Cependant peu d'antigènes tumoraux rassemblent toutes ces propriétés. Parmi ceux s'en rapprochant le plus, on peut cependant trouver l'antigène télomerase dont nous décrirons les propriétés dans les paragraphes suivants.

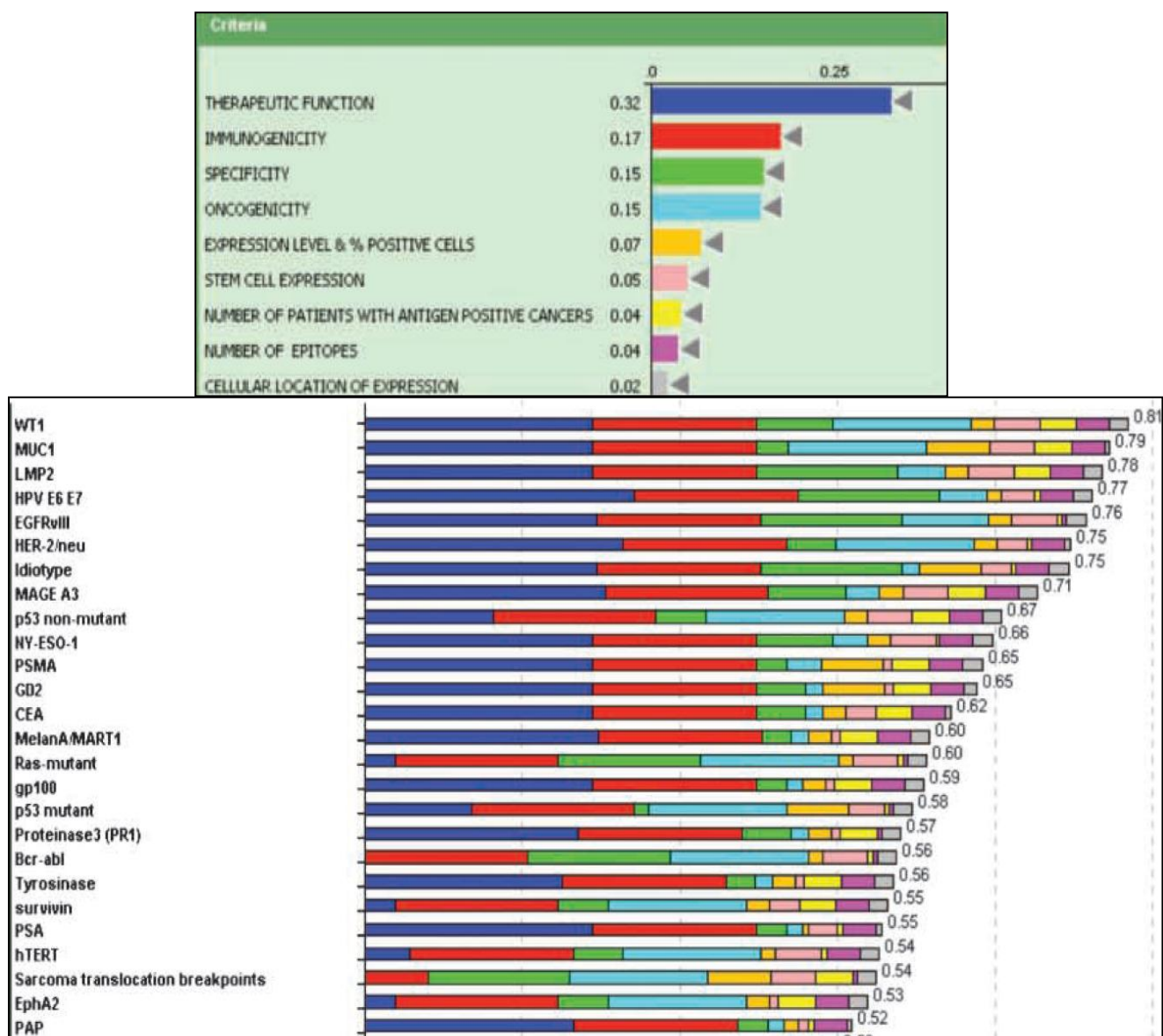


Figure 14 : Critères de classification d'un antigène idéal par ordre d'importance et représentation du rang de quelques antigènes tumoraux suivant les critères prédéfinis. Les couleurs représentent chaque critère et l'étendue du respect de ce critère pour chaque antigène. Les nombres au bout de chaque barre définissent leurs rangs relatifs.

3. La télomérase: antigène tumoral cible pour les lymphocytes T

Localisés à l'extrémité des chromosomes, les télomères sont constitués d'une répétition de courtes séquences de nucléotides (TTAGGG) ne codant aucune information génétique. Ils ont pour rôle de protéger le chromosome contre les phénomènes de dégradation et de recombinaison de l'ADN. En effet, chez les eucaryotes, à chaque fois qu'un chromosome se duplique lors d'une mitose, la réplication de ses extrémités s'avère imparfaite causant ainsi à chaque division cellulaire un raccourcissement des télomères de 50 à 200 bp. L'absence de télomères entraînerait donc une perte rapide de stabilité et d'intégrité de l'information génétique. La plupart des cellules somatiques normales ne peuvent maintenir une longueur constante des télomères au cours des cycles de réplication des chromosomes. Par conséquent, après un nombre limité de divisions, les télomères finissent par atteindre une taille critique. Ce phénomène appelé 'crise' provoque naturellement un arrêt permanent de la croissance cellulaire aboutissant à la sénescence et à la mort de la cellule par apoptose (Figure 15). Cependant dans les cellules immortelles, ce phénomène d'usure des télomères est contrecarré grâce à des systèmes d'entretien faisant appel à l'ALT (alternative lengthening of telomeres) ou, dans les 90% des cas, à un enzyme particulier : **la télomérase** (Counter et al. 1992).

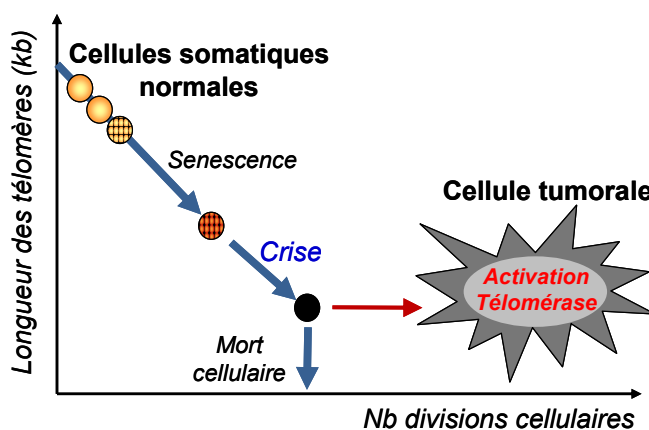


Figure 15 : L'horloge télomérique. Le modèle de l'« horloge télomérique » propose une relation de cause à effet entre d'une part, la perte progressive de télomères et le vieillissement des cellules, et d'autre part l'activation de la télomérase et l'immortalité cellulaire.

3.1. Structure de la télomérase

La télomérase est une enzyme très conservée qui fut décrite pour la première fois chez le cilié *Tetrahymena* en 1985 (Greider and Blackburn 1985). Chez l'homme, la télomérase intervient pour maintenir les télomères au cours des divisions cellulaires en ajoutant des séquences TTAGGG aux extrémités des chromosomes, compensant ainsi leur raccourcissement lié aux mitoses (Morin 1989). C'est un complexe ribonucléoprotéique à

activité transcriptase inverse composé de deux constituants essentiels : une sous-unité catalytique (**hTERT**, human Telomerase Reverse Transcriptase), et une sous-unité ARN (**hTR** ou **hTERC**, human Telomerase RNA ou human Telomerase RNA Component) comprenant la matrice pour la synthèse de l'ADN télomérique (Figure 16).

La sous-unité **hTERT** est une protéine de 127 kDa (1132 acides aminés), localisée dans le noyau cellulaire. Cette protéine possède 7 motifs transcriptases inverses (TI) (Lingner et al. 1997) et une région spécifique appelée motif T (Weinrich et al. 1997). Bien que la séquence de TERT ne présente en moyenne que 40% d'homologie entre les espèces, sa région N-terminale est en revanche très conservée. La matrice ARN **hTR** est quant à elle composée de 451 nucléotides et comprend une séquence matricielle (5'-CUAACCCUAAC-3') complémentaire à l'extrémité 3' simple brin des télomères (Feng et al. 1995). Si sa séquence primaire diverge notablement entre les espèces, sa structure secondaire est paradoxalement bien conservée (Chen et al. 2000).

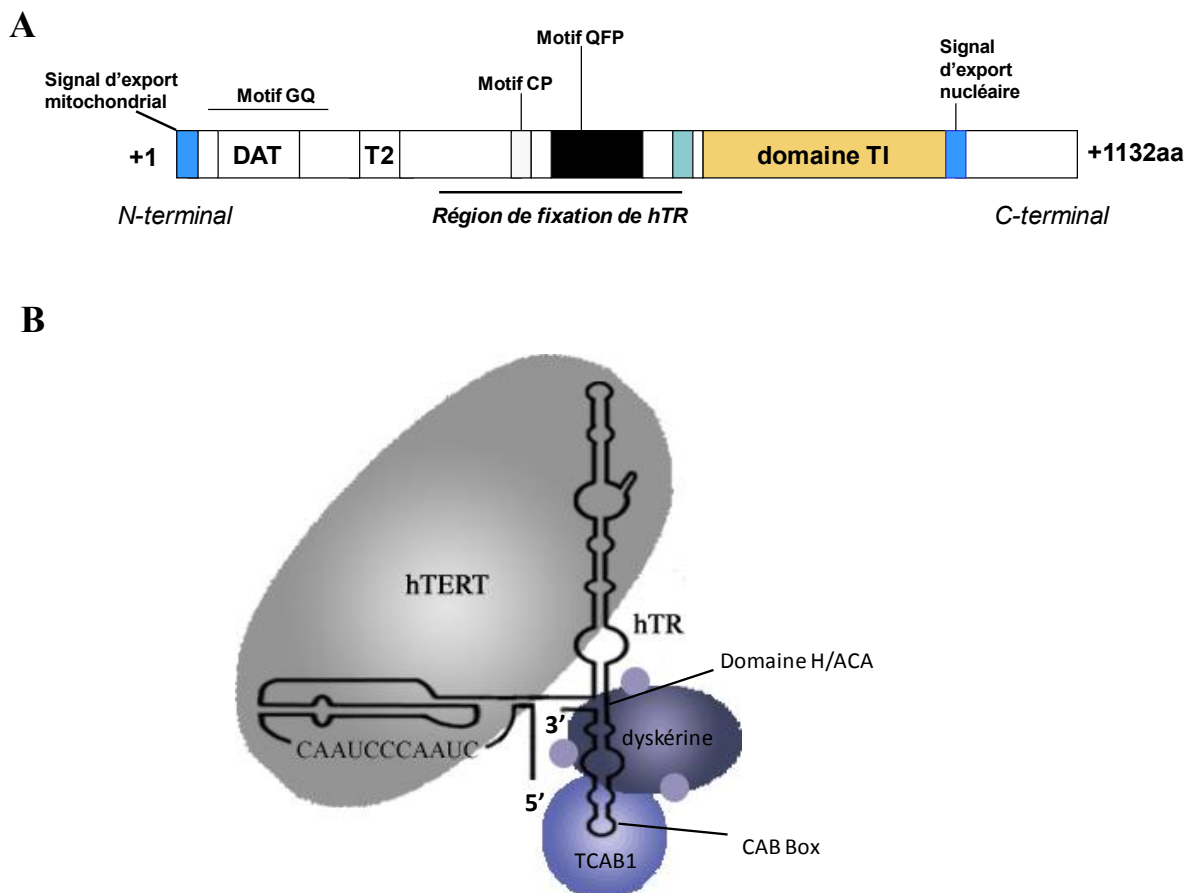


Figure 16 : TERT et le complexe télomérase. **A**, Schéma de la séquence protéique de TERT. Le domaine de fixation de hTR, le domaine transcriptase inverse (domain TI) et la localisation de séquences signal d'export mitochondrial et nucléaire sont indiqués. **B**, Le complexe télomérase est formé principalement de 2 sous-unités : une matrice ARN hTR, human telomerase RNA component) qui comprend la séquence 5'-CUAACCCUAAC-3' nécessaire à l'élongation des télomères, et une sous-unité catalytique à activité transcriptase inverse (hTERT, human telomerase reverse transcriptase). La télomérase comporte aussi des séquences internes spécifiques que sont le domaine H/ACA et la CAB box qui sont nécessaires au transport du complexe dans les corps de Cajal.

Pour faire son travail, en particulier dans les cellules humaines, la télomérase peut nécessiter la présence de séquences internes spécifiques et de composants supplémentaires favorables à une localisation dans les corps de Cajal, lieu d'assemblage du complexe. Ainsi la présence d'un **domaine H/ACA** et d'une **région CAB** (Cajal Body box), situés dans la région 3' terminale de la sous-unité TR, apparaît essentiel in vivo pour l'accumulation de TR dans les corps de Cajal. Plus récemment, la protéine **TCAB1** (Telomerase Cajal Box protein 1) a été identifiée comme faisant partie intégrante du complexe télomérase (Venteicher et al. 2009). Elle interagit avec la dyskérine et se lie à la région CAB de TR, favorisant ainsi une localisation du complexe dans les corps de Cajal plutôt que dans les nucléoles. La stabilité de la matrice ARN est quant à elle assurée par la liaison au domaine H/ACA de l'enzyme **dyskérine** complexée à d'autres petites protéines (NHP2, NOP10, GAR1). L'activité de la télomérase au niveau des extrémités des chromosomes est régulée par des protéines associées aux télomères contenues dans ce qu'on appelle le **complexe 'shelterin'**. Ce complexe est constitué de 6 protéines : TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1 et RAP1. Parmi elles, il a été montré que l'absence de RAP1 entraîne une diminution de la longueur des télomères, suggérant ainsi son rôle dans la régulation de la télomérase (Li and de Lange 2003). De même, TPP1 contient un domaine d'interaction avec la télomérase insinuant son rôle dans le recrutement de la télomérase au niveau du chromosome (Nandakumar et al. 2012).

3.2. Rôle de la télomérase dans l'oncogenèse

Comparée à une cellule normale, une cellule tumorale subit une sélection préférentielle en terme de **maintenances des télomères**, de **prolifération**, de **survie** et de **résistance à la mort cellulaire** induite par apoptose. Outre son rôle sur l'élongation des télomères, la télomérase est un facteur majeur impliqué dans les mécanismes de carcinogénèse. L'ensemble de ses propriétés est schématisé sur la figure 17.

L'implication de la télomérase dans le développement de tumeurs a clairement pu être mise en évidence par des modèles de souris transgéniques pour le gène TERT. Comparées à une souris normale, les souris 'knockout' pour TERT présentaient un nombre réduit de tumeurs cutanées tandis que celles dont le gène TERT était surexprimé développaient un grand nombre de lésions (Artandi and DePinho 2000; Gonzalez-Suarez et al. 2000).

Des analyses plus approfondies ont révélé que la télomérase agit effectivement sur un certain nombre de fonctions critiques pour la cellule, entraînant une modulation de son profil génique. Plusieurs expériences in vitro basées sur une expression ectopique de TERT dans différentes lignées cellulaires télomérase-négatives ont permis de mettre en évidence ces

modulations. Phénotypiquement, l'immortalisation de cellules normales, telles que des fibroblastes, peut être obtenue par une introduction de TERT (Smith et al. 2003; Jin et al. 2010). Les fibroblastes transduits sont alors capables d'être maintenus en culture durant plus de 300 générations. L'étude des mécanismes d'action de TERT a permis de montrer qu'une restauration de l'activité télomérase dans ces cellules est propice au déclenchement de **signaux de prolifération**. Ainsi il a été observé que la présence de TERT entraînait une expression accrue de gènes tels que la cycline D, la cycline A2 ou les protéines E2F1 (Mukherjee et al. 2011). De même, d'autres groupes ont observé qu'une surexpression de la télomérase stimulait la division cellulaire via une régulation positive des gènes EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ou FGF (Fibroblast Growth Factor) (Jin, Beck et al. 2010; Beck et al. 2011).

Comme mentionné précédemment, une autre caractéristique des cellules tumorales est leur **capacité à résister à l'apoptose**. Dudognon et al (2004) ont montré que TERT s'avère directement liée à l'inhibition de l'expression de TRAIL (TNF-apoptosis induced ligand) (Dudognon et al. 2004). La rupture des points de contrôle du cycle cellulaire est également un des mécanismes conduisant à l'immortalisation des cellules. Des études ont ainsi montré l'implication de TERT dans l'inactivation de protéines comme p53, régulateur négatif du cycle cellulaire. Notamment, TERT est capable d'inhiber la voie classique de 'mort cellulaire' dépendante de p53 via l'induction de FGF, accroissant ainsi la **survie** des cellules (Jin, Beck et al. 2010). L'utilisation d'un mutant de TERT a permis de démontrer que ces phénomènes de régulation sont liés uniquement à la présence du complexe TERT et non à son activité enzymatique (Dudognon, Pendino et al. 2004; Jin, Beck et al. 2010).

Plus récemment, un autre mécanisme identifié à partir d'expériences menées *in vivo*, a démontré que TERT est également un modulateur direct de la voie Wnt/b-catenin dont l'hyperactivité est associée au développement de différents cancers humains (Park et al. 2009).

Cependant même si la présence de TERT est clairement requise pour rendre les cellules oncogéniques, **in vitro**, l'expression ectopique de TERT seule ne suffit pas. En effet ces cellules ne présentent pas entièrement les caractéristiques d'une cellule tumorigène car elles conservent l'inhibition de contact, une sensibilité à la présence de sérum dans le milieu de culture, un génome stable et ne sont pas capables de générer des tumeurs chez l'animal. Pour achever la transformation de ces cellules en cellules malignes, il est nécessaire que cette expression de TERT soit associée à la présence de deux oncogènes, l'antigène T SV40 et la protéine Ras (Hahn et al. 1999; Artandi et al. 2002; Thomas et al. 2002).

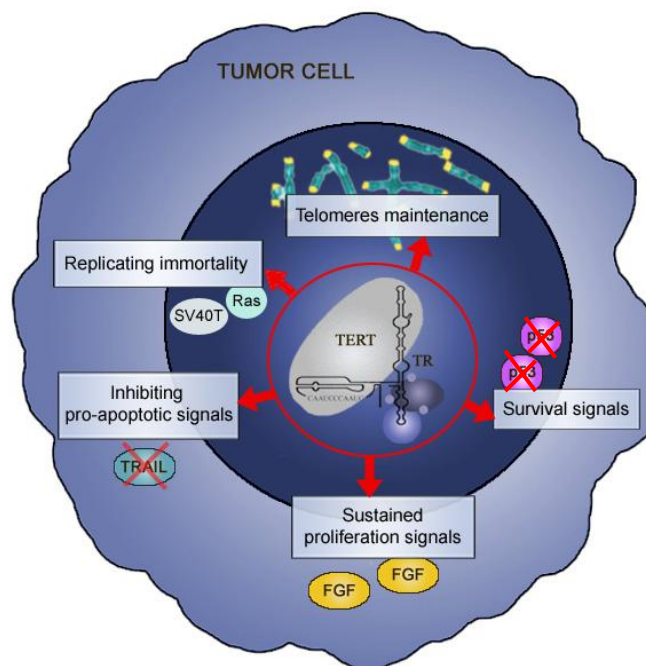


Figure 17 : Propriétés de la télomérase. Le rôle premier de la télomérase est de veiller à maintenir la longueur des extrémités des chromosomes afin d'éviter le phénomène de crise conduisant à la mort cellulaire. De plus la télomérase a révélé récemment d'autres propriétés indépendantes de l'élongation des télomères. En effet elle permet de délivrer des signaux de survie, de prolifération, d'inhibition de l'apoptose et, en association avec les oncogènes Ras et SV40T, elle permet la transformation de cellules en cellules malignes.

3.3. Expression et régulation de la télomérase dans les cancers

Contrairement à la composante TR présente de façon constitutive, **la majorité des cellules somatiques normales humaines n'expriment pas l'ARNm de TERT** et par conséquent ne présentent pas d'activité télomérase. Il existe cependant des exceptions incluant la plupart des tissus embryonnaires, les cellules germinales, les cellules souches hématopoïétiques, les cellules gonadiques, les lymphocytes activés et certaines sous-populations de cellules épithéliales. Néanmoins toutes ces cellules n'expriment transitoirement qu'un taux modéré à faible d'activité télomérase. Ces observations ont par ailleurs pu être confirmées à l'aide d'un modèle de souris transgénique exprimant une protéine fluorescente sous le contrôle du promoteur du gène TERT murin (Breault et al. 2008). Il est à noter cependant que, contrairement aux cellules somatiques humaines, les cellules somatiques murines présentent un taux basal de TERT.

Si l'expression de TERT est restreinte dans les cellules normales, elle est par opposition **constitutivement et fortement exprimée dans la plupart des tumeurs humaines (>90%)** et virtuellement dans tous les types de cancers (Tableau 3). Ce dernier point comporte un intérêt clinique car le diagnostic actuel du cancer repose principalement sur la détection d'antigènes exprimés dans des types spécifiques de cancers. Or, un diagnostic basé sur la télomérase pourrait de ce fait adresser une catégorie plus étendue de cancers (Hiyama and Hiyama 2002). Différentes études ont d'ailleurs montré qu'un niveau élevé de télomérase est associé à un mauvais pronostic et une agressivité tumorale marquée dans les cancers du poumon non-à petites-cellules (Marchetti et al. 2002; Wu et al. 2003; Zhu et al.

2006), les neuroblastomes (Poremba et al. 1999; Krams et al. 2003), les cancers du sein (Poremba et al. 2002; Elkak et al. 2006) et du foie (Oh et al. 2008), les leucémies (Cogulu et al. 2004; Tchirkov et al. 2004), les cancers gastriques (Lu et al. 2012), les cancers squameux de la tête et du cou (Liao et al. 2004; Lee et al. 2006) et les chondrosarcomes (Martin et al. 2004).

Type de cancer	Echantillon	Methode de détection de hTERT	Frequence (%)
Sein	Sang/Serum/Plasma	¹ RT-PCR	42,3 ± 24,4
	Tumeur	RT-PCR, ² ISH, ³ ICH	86,7 ± 5,1
Poumon	Sang/Serum/Plasma	RT-PCR	95
	Tumeur	ICH, ⁴ WB, TRAP	86,04 ± 6,9
Melanome	Sang/Serum/Plasma	RT-PCR	58
	Tumeur	TRAP, RT-PCR, IHC	91,6 ± 14,4
Pancreas	Sang/Serum/Plasma	-	-
	Tumeur	RT-PCR, TRAP, ICH	86,3 ± 2,9
Colon	Sang/Serum/Plasma	-	-
	Tumeur	RT-PCR, TRAP	95,5 ± 2,1
Prostate	Sang/Serum/Plasma	RT-PCR	80
	Tumeur	ICH, RT-PCR	82,85 ± 13,4
Gynécologique	Sang/Serum/Plasma	RT-PCR	74,4
	Tumeur	RT-PCR, TRAP, ICH	91,2 ± 5,4
Rein	Sang/Serum/Plasma	-	-
	Tumeur	TRAP, RT-PCR	78,1 ± 9,2
Cerveau	Sang/Serum/Plasma	-	-
	Tumeur	TRAP, ISH	87,8 ± 19,0
Leucémie	Sang/Serum/Plasma	RT-PCR, TRAP	86,9 ± 13,1
	Moelle osseuse	TRAP, RT-PCR	74,9 ± 4,3
Myélome	Sang/Serum/Plasma	-	-
	Moelle osseuse	IHC	100
Lymphome	Sang/Serum/Plasma	-	-
	Moelle osseuse	RT-PCR, ISH	78,6 ± 18,5

Tableau 3 : Expression de hTERT dans les cancers humains. ¹ Real-time Polymerase chain reaction ; ² In situ hybridization ; ³ Immunohistochemistry ; ⁴ Western-Blot

Etant donné le rôle essentiel de la télomérase dans la survie des cellules, cette enzyme est soumise en amont à des **systèmes de régulation** (Figure 18). Le promoteur du gène TERT contient en effet de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription et de méthylation (Horikawa et al. 1999), propices à l'activation ou la répression de l'expression de TERT. Les oncogènes Her2/Neu ou c-Myc (Park et al. 2001), les facteurs viraux tels que la protéine E6 du papillomavirus peuvent ainsi directement ou indirectement activer TERT (Klingelhutz et al. 1996). Le même effet est observé avec les protéines Sp1 (Park, Guo et al. 2001), Ets (Dwyer et al. 2007), Wnt/b-catenine (Hoffmeyer et al. 2012), STAT3, NF-kB, et les récepteurs activés des oestrogènes et androgènes (Guo et al. 2003).

Dans les cellules normales, il y a une forte probabilité pour que l'expression de TERT soit réprimée par des gènes suppresseurs de tumeurs. Plusieurs études ont ainsi mis en évidence l'implication de facteurs de transcriptions tels que Mad1 (Oh et al. 2000), AP1 (Takakura et al. 2005), WT-1 (Oh et al. 1999) ou en encore p53 (Yao et al. 2012), p73 (Racek et al. 2005)

et TGF- β (Hu et al. 2006) dans l'inhibition de l'expression de TERT.

En plus de la modulation de l'activation transcriptionnelle de TERT, une autre étape importante de sa régulation a lieu au niveau post-transcriptionnel et implique des phénomènes d'épissages alternatifs de l'ARN messager (ARNm) de TERT. Bien que les événements à l'origine d'un tel épissage restent inconnus, plusieurs groupes ont pu prouver l'existence de diverses formes d'ARNm épissé de TERT (Ulaner et al. 1998; Colgin et al. 2000; Hisatomi et al. 2003). Ces formes résultent d'une délétion complète ou partielle d'exons, ou d'insertion de parties d'introns. L'épissage alternatif serait un moyen pour la cellule de réguler l'activité télomérase au cours de son développement en changeant les profils d'expression des variants de TERT. A ce jour 10 variants alternatifs de l'ARNm TERT ont été identifiés. Les plus étudiés sont ceux présentant des délétions complètes ou partielles au niveau de motifs nécessaires à l'activité transcriptase inverse de l'enzyme. Ces variants peuvent alors générer des isoformes protéiques de TERT incapables d'exercer leur rôle de maintenance des télomères. Lorsqu'ils sont surexprimés, certains d'entre eux peuvent se comporter comme des inhibiteurs dominants-négatifs de l'activité télomérase dans les cellules normales comme dans les cellules tumorales (Colgin, Wilkinson et al. 2000). Cependant le rôle de ces variants sur des fonctions autres que la maintenance des télomères n'a pas encore été analysé.

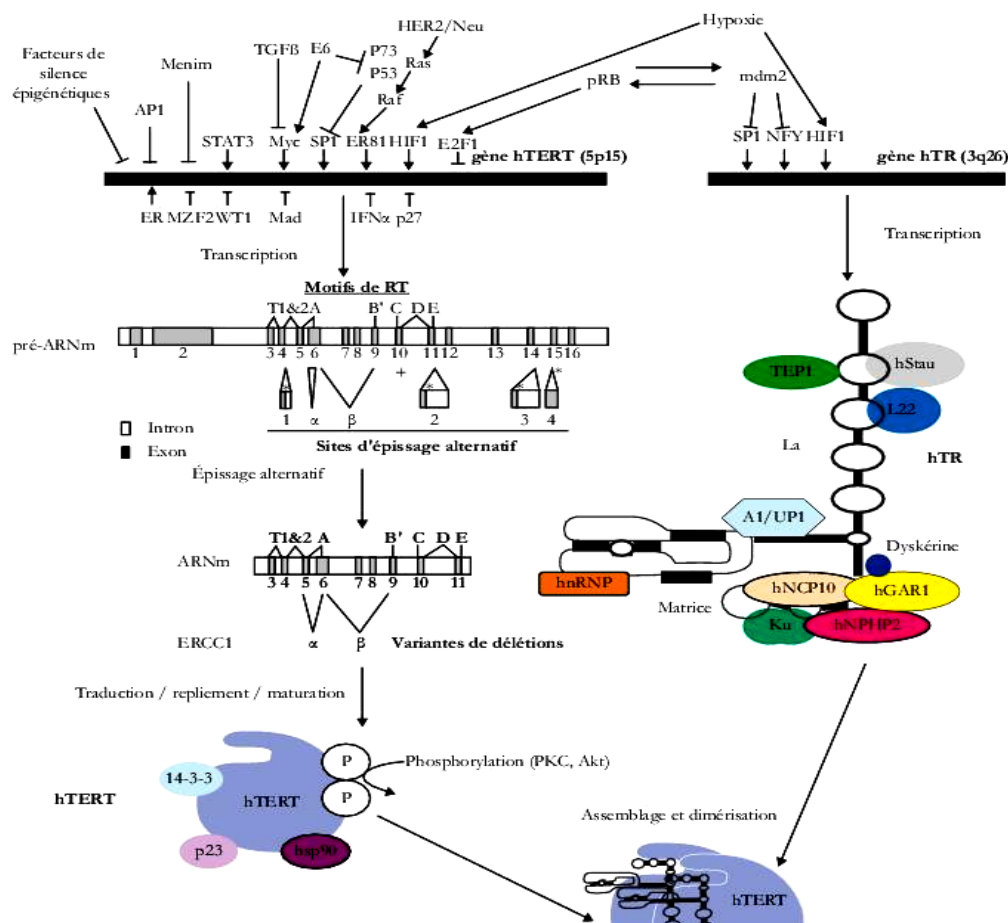


Figure 18 : Niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel de la télomérase.

(Souiden et al. 2010, Bulletin du cancer)

L'ensemble des différentes propriétés de la télomérase ainsi que son expression spécifique dans les cellules tumorales contribuent donc d'une part à clarifier son implication dans les mécanismes d'oncogénèse, et d'autre part fait de **TERT une cible privilégiée pour l'immunothérapie antitumorale** (Beatty and Vonderheide 2008). Plusieurs essais cliniques d'immunothérapies ciblant TERT ont été réalisés chez l'homme (Tableau 4).

	Vaccine formulation	Cancer type	Phase	Numb. of patients	Immune response	Clinical responses	Reference
Peptide-based vaccines	hTERT pY572 and p572 peptide in montanide (Vx-001)	Multiple solid tumors	II	55	70%	No major toxicity. Immune response correlated with improved clinical	Kotsakis et al. 2012
	hTERT pY572 and p572 peptide in montanide (Vx-001)	Multiple cancer	I/II	19	92%	No major toxicity. OS in correlation with immune response.	Mavroudis et al. 2006
	hTERT pY572 and p572 peptide in montanide (Vx-001)	NSCLC	I/II	22	76%	No major toxicity. OS in correlation with immune response. Median OS of 30 months for responders	Bolonaki et al. 2007
	hTERT p540 peptide + Montanide	Melanoma	II	14	54%	No objective tumor responses.	Parkhurst et al. 2004
	hTERT p540 in Montanide + GM-CSF	Breast	I	20	68%	No major toxicity. OS in correlation with immune response	Domchek et al. 2007
	hTERT GV1001 and p540+ GM-CSF	NSCLC	I/II	26	46% ag. GV1001 8% ag. p540	No major toxicity. Median OS of 8,5 months	Brunsvig et al. 2006
	hTERT GV1001+ GM-CSF	Pancreas	I/II	48	63%	No major toxicity. OS in correlation with immune response	Bernhardt et al. 2006
	hTERT GV1001+ temozolomide	Melanoma	I/II	25	78%	No major toxicity. OS in correlation with immune response. Median OS of 12 months for responders	Kyte et al. 2011
DC-based vaccines	DC loaded with hTERT peptides + KLH	Renal	I/II	10	25%	No major toxicity. 2 patients with mixed response, 1 with stable disease	Marten et al. 2006
	DC loaded with p540 + KLH	Breast, Prostate	I	7	57%	No major toxicity. 1 patient with partial tumor regression	Vonderheide et al. 2004
	DC transfected with hTERT-LAMP mRNA	Prostate	I	20	100%	No major toxicity. 4/9 patients have elevated PSA.	Su et al. 2005

Tableau 4 : Liste des principaux essais cliniques ciblant TERT.

III. Présentation et identification des peptides restreints par le CMH de classe II

Les LT CD4 reconnaissent des peptides antigéniques présentés sur les molécules d'histocompatibilité de classe II (CMH II) par les cellules. La fonction principale de ces molécules CMH est de signaler par ce biais la présence de structures étrangères à l'intérieur de la cellule.

Dans ce chapitre nous aborderons les différentes voies de présentation des antigènes par les molécules du CMH II et les méthodes utilisées pour l'identification de peptides dérivés d'antigènes tumoraux capables de stimuler spécifiquement des LT CD4.

1. Distribution et régulation de l'expression des CMH II

Les CMH II font partie d'un complexe génique situé sur le chromosome 6 chez l'homme (complexe HLA) et le chromosome 17 chez la souris (complexe H-2) (McDevitt and Bodmer 1974; Hansen et al. 1993). Les gènes des molécules du CMH II codent pour des glycoprotéines transmembranaires appartenant à la famille des immunoglobulines. Elles sont formées d'une chaîne lourde α (codée par le gène A) et d'une chaîne légère β (codé par le gène B) qui s'associent par des interactions non covalentes. Chaque molécule CMH II contient deux domaines externes : $\alpha 1/\alpha 2$ pour la chaîne lourde et $\beta 1/\beta 2$ pour la chaîne légère. Ces deux chaînes sont codées par les régions **HLA-DP, DQ et DR chez l'homme**, et par les régions **IA et IE chez la souris** (Figure 19). En plus des molécules CMH II, il existe aussi des gènes codant pour des molécules CMH II non-classiques que sont HLA-DM (H-2M chez la souris) et HLA-DO, et qui jouent un rôle important dans l'apprêtement des peptides. Le site de liaison au peptide est formé de 2 hélices alpha latérales et 8 feuilletts bêta. Contrairement aux molécules CMH I, la cavité de liaison au peptide du CMH II est ouverte à ses extrémités ce qui lui permet d'accueillir des peptides légèrement plus longs, de 13-20 acides aminés. Les caractéristiques de liaison sont déterminées par les 13 résidus centraux. Les peptides qui se lient à une molécule CMH II particulière ont souvent des 'motifs' internes conservés.

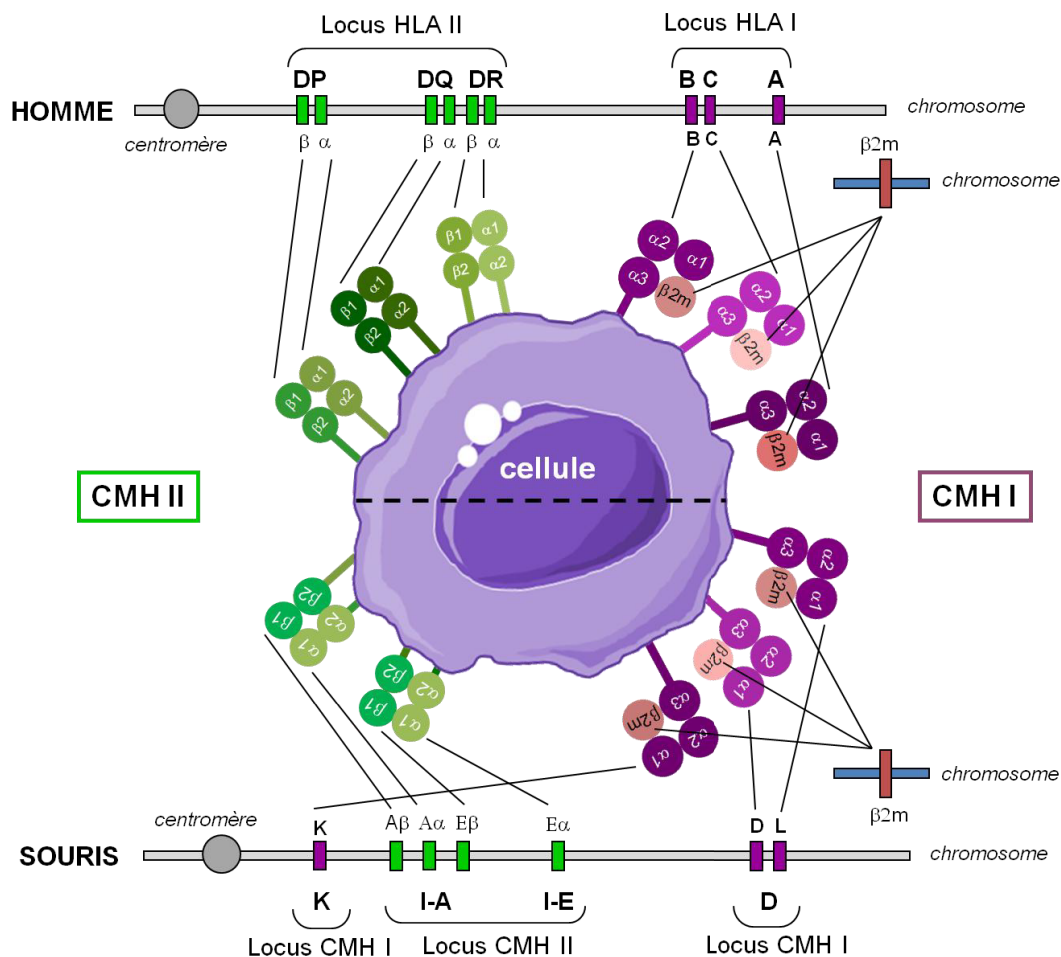
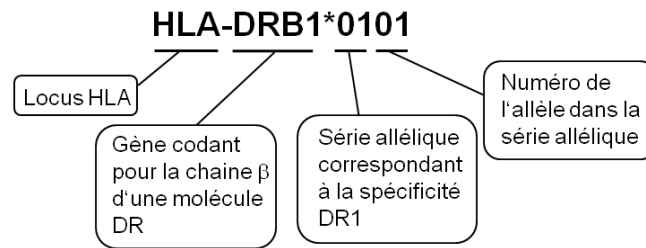


Figure 19 : Représentation des régions codant les molécules du CMH I et II humaines et murines

Les molécules CMH II peuvent différer significativement entre les individus d'une même espèce. Cette diversité trouve son origine dans le polymorphisme qui est lié à la présence de multiples allèles et à leurs associations. Chaque locus CMH II contient une série de spécificités (ex : DR1 à DR10 pour HLA-DR, DPw1 à 6 pour HLA-DP, DQ1 à DQ4 pour HLA-DQ) subdivisées en plusieurs variants alléliques. Le polymorphisme le plus important est observé pour les gènes HLA-DR et cette variabilité est essentiellement portée par la chaîne β . C'est cette variabilité qui détermine les motifs de liaison peptidique propres à chaque molécule HLA-II. Tous les individus expriment une molécule DRB1 ainsi que pour la plupart une deuxième molécule DRB, une molécule DQ et une molécule DP (soit un maximum de 6 à 8 molécules exprimées pour les hétérozygotes).

La distribution de ces allèles n'est pas uniforme dans la population mondiale (Figure 20). En Europe, seuls 9 allèles dépassent les 10% : DRB1*01, *03, *04, *07, *15; DPA1*01,*02 et DPB1*02, *04.

A



B

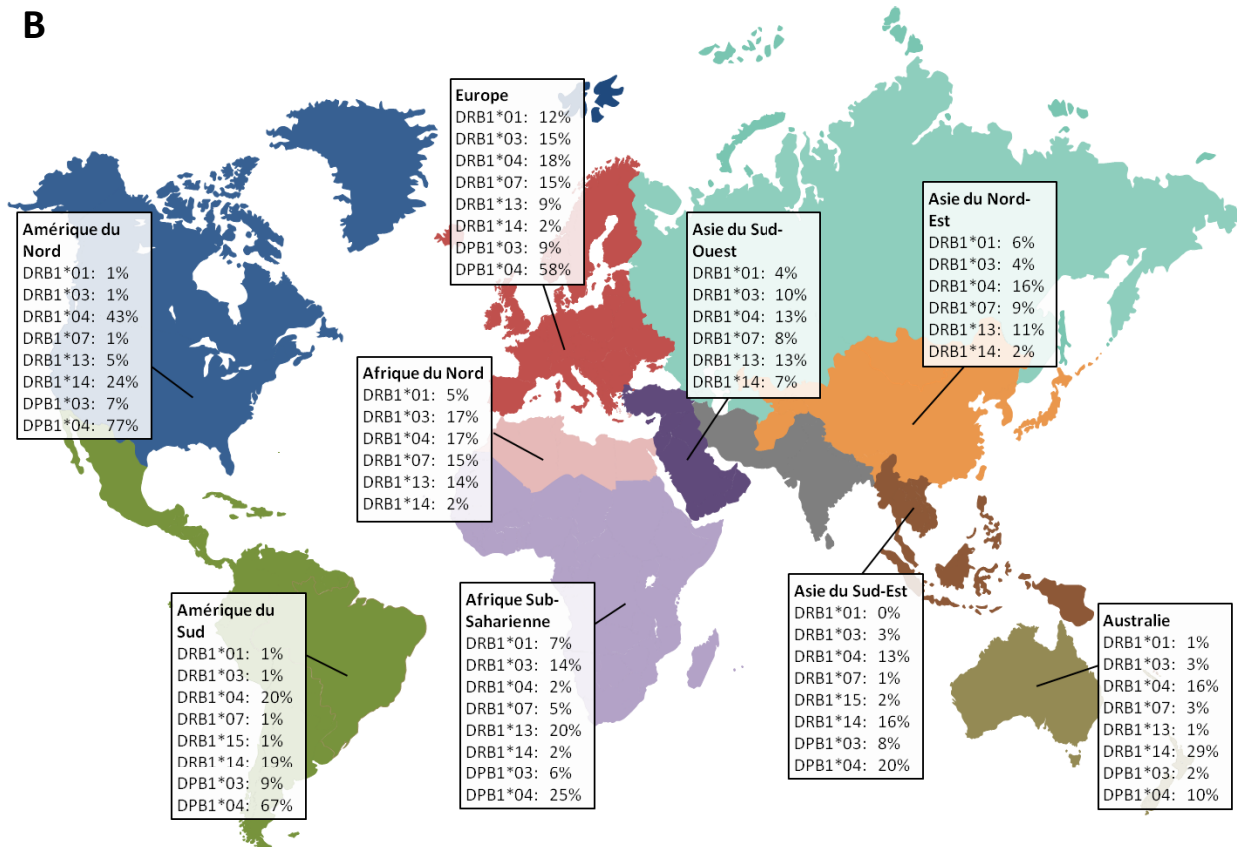


Figure 20 : Diversité des allèles HLA de classe II. A, Principe de nomenclature des allèles HLA-DRB. **B,** Prévalence de 6 molécules HLA-DRB1 et 2 molécules HLA-DPB1 dans la population mondiale (D'après la database MHC du site NCBI).

Contrairement aux molécules du CMH I, l'expression constitutive des molécules CMH-II est généralement restreinte aux CPA professionnelles telles que les DC, les LB et les macrophages activés. Quelques exceptions existent, c'est le cas des cellules épithéliales thymiques (TEC, thymic epithelial cells), les mastocytes, les précurseurs érythrocytaires et granulocytaires. Cependant l'expression des CMH II peut être induite sur les CPA non-professionnelles par de nombreux facteurs tels que l'IFN γ , le TNF- α , le LPS ou la voie CD40/CD40L. C'est le cas des cellules stromales mésenchymateuses, des fibroblastes, des cellules endothéliales, des cellules épithéliales ou des astrocytes. De plus, l'expression du CMH II peut être induite chez de nombreuses cellules après leur activation. A l'inverse, il existe des facteurs qui régulent négativement leur expression comme le TGF- β et de l'IL-10.

Dans les cancers, à l'exception des lymphomes T et B et de certaines formes de mélanome, les cellules tumorales n'expriment habituellement pas le CMH II. Leur expression peut cependant parfois être induite en présence d'IFN γ .

L'expression des CMH II est régulée par le transactivateur CIITA (MHC class II transactivator) (Muhlethaler-Mottet et al. 1997; LeibundGut-Landmann et al. 2004). Ainsi CIITA est fortement exprimé dans les CPA et il peut être induit par une stimulation IFN γ . La régulation de CIITA s'effectue au niveau de la transcription du gène MHC2TA. L'activité transcriptionnelle de MHC2TA est modulée par 4 types de promoteurs distincts (type I à IV). Parmi eux, 3 sont fortement conservés chez l'homme et la souris (type I, III et IV). Le type II est uniquement retrouvé chez l'homme mais son activité transcriptionnelle est très faible. La spécificité cellulaire et l'expression du gène MCH2TA sont contrôlées par les différentes activités de ces promoteurs (Tableau 5). Dans les DC immatures, le promoteur CIITA de type I est lié à 4 protéines : PU.1, IRF8 (interferon-regulatory factor 8), NF- κ B (nuclear factor- κ B) et SP1. Cette interaction conduit à une augmentation de l'expression de CIITA et donc du CMH II (bien que ce dernier ne soit pas exprimé de façon stable en surface). Pendant la maturation des DC, ce complexe est remplacé par un complexe contenant PRDM1 (PR domain zinc finger protein 1) qui inhibe la transcription de CIITA (Neefjes et al. 2011).

En plus de la régulation des molécules CMH II (HLA-DR, HLA-DP et HLA-DQ), CIITA module aussi l'expression des CMH II non-classiques (HLA-DM et HLA-DO) et de la chaîne invariante Ii qui sont des facteurs importants de la présentation antigénique par les CMH II.

	CIITA		
	type I	type III	type IV
CPA d'origine myéloïdes	++++	+	+
CPA d'origines lymphoïdes	+	++++	+
Induction par IFN γ	-	+/-	++++
TEC	-	-	++++
Autres cellules	-	-	-

D'après Muhlethaler-Mottet A. et al, 1997, The EMBO Journal

CPA: cellules présentatrices d'antigènes; TEC : cellules épithéliales thymiques

Tableau 5 : Régulation de l'expression du gène CIITA (MHC2TA) par l'activité de différents promoteurs. Le promoteur de type I est particulièrement actif dans les cellules d'origine myéloïdes (DC, macrophages activés. Le type III est utilisé par les cellules d'origines lymphoïdes (LB, LT activés humains, DC plasmacytoïdes). Le type IV est essentiel en réponse à une stimulation par IFN γ et aux cellules non-issues de la moelle osseuse (ex : cellules endothéliales, épithéliales, astrocytes et fibroblastes). Le type IV est aussi constitutivement exprimé dans les TEC (cellules épithéliales thymiques).

2. Les voies de présentation antigénique par le CMH II

Après la capture d'antigènes par les CPA, ces derniers doivent être apprêtés sur les molécules HLA de classes II pour être présentés à la membrane cellulaire sous forme de peptides. Cette étape est primordiale dans la nature des réponses immunes induites car elle oriente la reconnaissance des antigènes par les LT CD4. En règle générale, les molécules HLA-II présentent des peptides issus de la dégradation de protéines exogènes qui ont été internalisées par endocytose (présentation directe). Cependant des études ont montré que 20-30% des peptides naturellement présentés par les molécules CMH II proviennent des produits de dégradation de protéines endogènes (Lechler et al. 1996; Dengjel et al. 2005; Crotzer and Blum 2009).

2.1. Présentation directe des antigènes exogènes

La voie exogène de présentation des antigènes sur le CMH II est un processus largement documenté (Jensen 2007; Neefjes, Jongsma et al. 2011). Les CPA peuvent internaliser l'antigène par endocytose et/ou phagocytose. En règle générale seuls les macrophages ont la capacité d'utiliser ces deux processus, les autres CPA (DC ou LB) utilisent uniquement la voie d'endocytose. Les molécules du CMH II sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique à partir duquel elles doivent voyager jusqu'aux compartiments endocytiques afin de rencontrer et d'interagir avec les peptides qui leur sont destinés. Ce mécanisme de présentation antigénique implique:

- i) la présence d'un système d'adressage vers les voies d'endocytose
- ii) l'existence de récepteurs spécifiques qui vont pouvoir internaliser efficacement les antigènes (bactéries, virions, corps apoptotiques, complexes immuns...)
- iii) l'intervention de protéases qui vont dégrader les antigènes en peptides
- iv) la présence d'un système de redirection pour une présentation à la surface des cellules.

L'antigène internalisé met 1-3 heures pour parcourir la voie endocyttaire, être exprimé à la membrane puis être présenté sous forme de peptides par les molécules CMH II. La voie d'endocytose implique trois compartiments vésiculaires d'acidité croissante : les endosomes précoces (pH 6,0-6,5), les endosomes tardifs (pH 5,0-6,0) et les lysosomes (pH 4,5-5,0). Ces vésicules contiennent des enzymes hydrolytiques (protéases, nucléases, lipases, phospholipases et phosphatases) qui vont dégrader l'antigène en peptides de 13-20 résidus qui

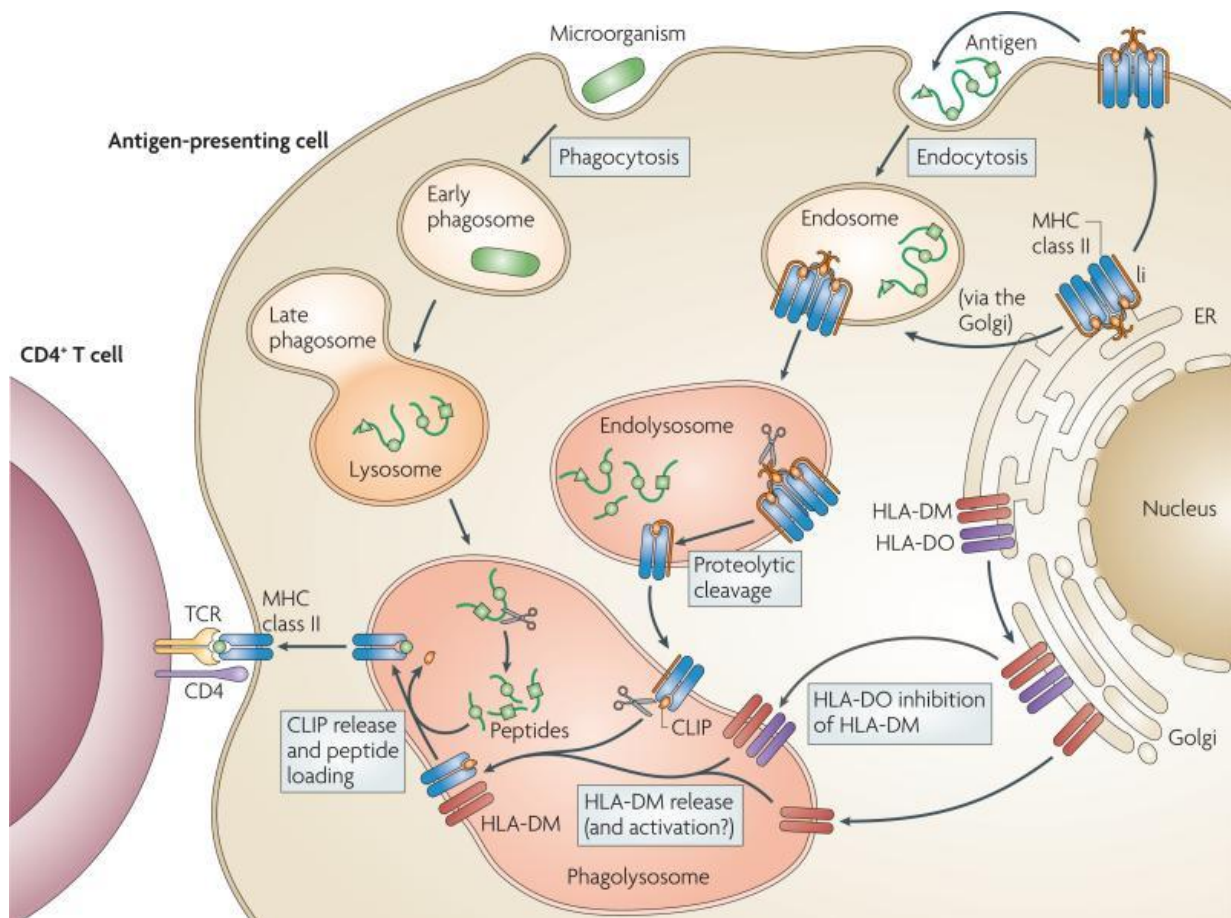
vont se lier aux molécules CMH II. L'apprêtement de l'antigène peut être inhibé par les agents chimiques tels que la chloroquine (qui augmente le pH des compartiments endocytaires) ou des inhibiteurs de protéases.

Les chaînes transmembranaires α et β des molécules du CMH II sont assemblées dans le réticulum endoplasmique et associées à la **chaîne invariante (Ii)**. La **chaîne Ii** est une protéine transmembranaire nécessaire à l'assemblage et au repliement correct des CMH II. Elle agit également en bouchant le site de liaison au peptide du CMH II évitant ainsi que des peptides de classe I, naturellement apprêtés dans le réticulum, viennent s'y charger. Sa partie N-terminale contient quant à elle un signal d'adressage qui dirige le complexe formé avec le CMH II à travers le complexe de Golgi et le réseau trans-Golgien vers les compartiments endocytaires. Compte tenu de l'augmentation de l'activité protéolytique des compartiments successifs, la chaîne Ii est graduellement et partiellement dégradée par des cystéines protéases telles que les cathepsines S et L, la protéase AEP (asparagine endopeptidase) ou GILT (gamma-interferon-induced lysosomal thiol reductase) (Honey and Rudensky 2003). Après dégradation de la chaîne Ii, seul un court fragment de la chaîne Ii, appelé CLIP (class-II associated invariant chain protein), subsiste et reste lié au CMH II en occupant la cavité de liaison au peptide. Or sans la chaîne Ii complète, le peptide CLIP en lui-même a une faible affinité pour le sillon du CMH II. Il peut donc soit conduire à une molécule CMH II vide, soit être stabilisé par HLA-DM (**DM**). Contrairement aux autres CMH II, DM n'est pas polymorphique et n'est pas exprimée à la membrane cellulaire, mais est trouvée essentiellement dans le compartiment endosomal. Cette molécule DM permet de catalyser l'échange entre le peptide CLIP et un peptide antigénique d'affinité supérieure. DM effectue alors un cycle en vérifiant l'affinité et la capacité de ce peptide à former une conformation correcte avec la molécule CMH II avant de se libérer de cette dernière. En absence de DM, ce processus d'échange de peptides échoue, conduisant à l'expression membranaire de peptides de faible affinité (en particulier CLIP) et de complexes CMH II/peptides structurellement immatures (Pu et al. 2004). Cependant, il est à noter que le polymorphisme important des molécules CMH II affecte la stabilité de la chaîne Ii et de DM. Ainsi il détermine le niveau d'importance de ces protéines dans la voie de présentation des peptides (Wolf et al. 1998; van Lith et al. 2010). La protéine HLA-DO (**DO**) est exprimée principalement dans les lymphocytes B. Son rôle est de prévenir l'activité de DM dans les endosomes précoces (pH~6) (Chen et al. 2002). Au fur et à mesure que les CMH II vont circuler dans les voies de l'endocytose et s'approcher des endosomes tardifs et lysosomes, DO va perdre son activité inhibitrice sur DM permettant le chargement des CMH II avec les peptides antigéniques. L'activité de DO est très importante pour le LB car l'antigène capturé par le BcR est très lié à

ce dernier et nécessite donc un environnement suffisamment acide pour un chargement optimal des peptides.

Le taux de présentation à la surface du CMH II est étroitement lié à l'activité protéolytique de la cellule. Cette activité est faible chez la DC immature et forte dans les DC activées (Villadangos et al. 2005). En effet, au repos il existe des inhibiteurs des protéases comme la cystatine et l'isoforme p41 de la chaîne Ii qui permettent de moduler la dégradation des antigènes et de la chaîne Ii, et de contrôler ainsi l'initiation de la réponse immunitaire en fonction d'un certain type ou d'une expression anormale d'antigènes. De plus, lorsque les DC sont immatures, les molécules CMH II sont ubiquitinyllées à la membrane par la protéine MARCH1 et réinternalisées en vue d'être dégradées (De Gassart et al. 2008). Ainsi la dynamique de transport des CMH II est très rapide entraînant un temps de résidence à la surface très réduit en absence d'activation. En revanche lors de la maturation des DC, les CMH II vont au fur et à mesure perdre cette ubiquitination ce qui va par conséquent stabiliser leur expression à la membrane. Les DC immatures synthétisent les CMH II en grande quantité mais ce n'est qu'après leur maturation que ces molécules sont chargées et transportées à la surface pour une présentation aux LT CD4. A l'inverse de l'augmentation de l'expression des CMH II à la membrane, la biosynthèse de CMH II est réduite pendant la maturation. Cet arrêt de synthèse chez les DC matures garantit que les complexes CMH II /peptide ne soient pas dilués et remplacés par de nouveaux complexes produits.

La voie de présentation classique des antigènes exogènes par le CMH II est illustrée dans la Figure 21.



Nat Rev Microbiol. 2010 April; 8(4): 296–307.

Figure 21 : Voie de présentation directe des antigènes exogènes par les molécules du CMH II. Les chaînes α et β du CMH II sont assemblées dans le réticulum endoplasmique et associées à la chaîne invariante li. Le complexe CMH II/li est transporté du RE vers le Golgi puis vers les compartiments des endosomes tardifs ou lysosomes (certains complexes transitent vers la membrane cellulaire avant d'être réinternalisés par endocytose). Les antigènes exogènes sont internalisés par endocytose et menés vers les phagolysosomes où ils sont dégradés. La chaîne Li est partiellement dégradée par des protéases, laissant le peptide dérivé de la chaîne invariante (CLIP) dans le site de liaison au peptide du CMH II. HLA-DM catalyse la dissociation du peptide CLIP et son échange avec un peptide antigénique de plus forte affinité. Dans certaines cellules, HLA-DO peut se lier à HLA-DM et inhiber sa fonction dans certains compartiments endocytaires. Le complexe CMH II/peptide est transporté à la membrane où il est alors présenté aux LT CD4.

2.2. L'autophagie dans la cross-présentation des antigènes de tumeurs

L'importance de la présentation par le CMH II d'antigènes tumoraux localisés dans le cytoplasme ou le noyau a été démontrée aussi bien dans des modèles animaux que dans les cancers humains. Des études ont montré que des cellules tumorales transfectées par le CMH II peuvent directement présenter les antigènes tumoraux aux LT CD4, induisant une immunité antitumorale efficace (Armstrong et al. 1998). Ces observations suggèrent que des antigènes endogènes intègrent les endosomes pour rencontrer les molécules du CMH II.

L'**autophagie** est un processus intracellulaire majeur de dégradation et de recyclage d'organites, de protéines ou de pathogènes qui joue un rôle essentiel dans l'homéostasie cellulaire. C'est un mécanisme impliqué dans l'adaptation au stress, le vieillissement et le développement cellulaire. Il existe 3 types d'autophagies : l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes, la microautophagie et la macroautophagie (Figure 22). De nombreux travaux ont montré que l'autophagie fait parti des processus impliqués dans l'apprêtement et la présentation des antigènes intracellulaires par le CMH II aux LT CD4 (Dengjel, Schoor et al. 2005; Paludan et al. 2005; Crotzer and Blum 2010; Munz 2012).

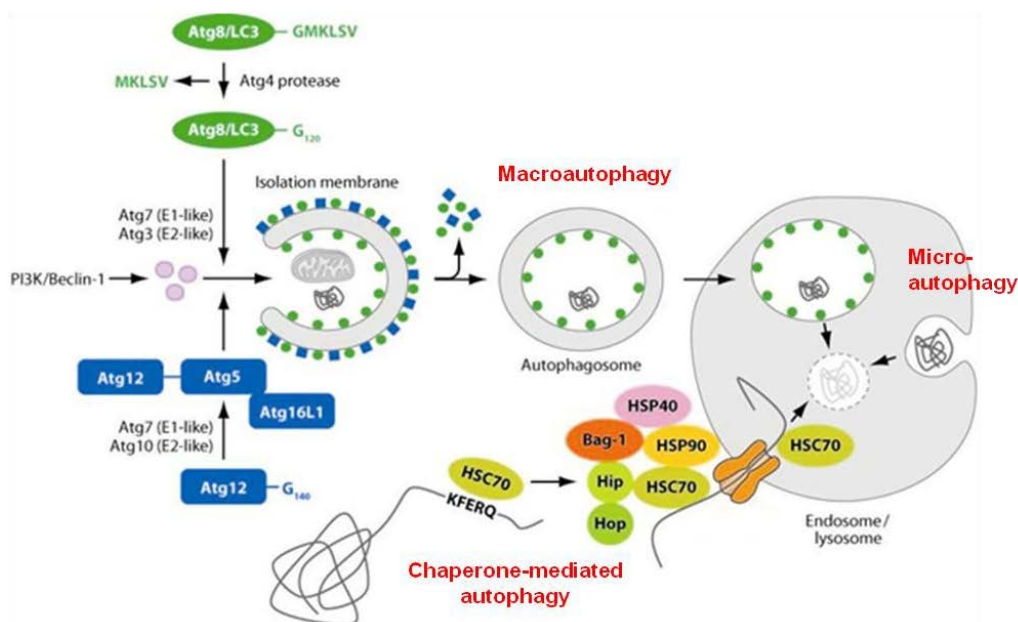


Figure 22 : Trois types d'autophagies et les mécanismes impliqués. Il existe 3 types d'autophagies. Dans la macroautophagie qui constitue la voie principale de dégradation cellulaire, un autophagosome (vésicule à double membrane) se forme et fusionne avec les lysosomes qui dégradent les constituants cellulaires et pathogènes contenus dans l'autophagosome. La microautophagie est caractérisée par l'invagination de corps vésiculaires d'origine endosomique qui internalisent des protéines ou des agrégats protéiques. Dans les processus d'autophagie médiée par des protéines chaperonnes, les antigènes cytoplasmiques sont pris en charge par la chaperone HSC70 via la protéine LAMP-2A afin d'accéder au lysosome. (Munz et al. 2009)

La macroautophagie est à ce jour le type d'autophagie le mieux caractérisé et semble la plus impliquée dans les tumeurs. En effet, il apparaît que la macroautophagie dans les cellules tumorales est essentielle à la cross-présentation des antigènes par les cellules dendritiques *in vitro* et *in vivo* (Li Y2008). La macroautophagie représente un processus dynamique impliquant le réarrangement de membranes subcellulaires qui séquestrent une partie du cytoplasme afin de les livrer aux lysosomes ou endosomes tardifs (Munz 2012). Ainsi ce processus contribue à l'augmentation de la présentation par le CMH II de protéines cytoplasmiques (du soi ou virales) et extracellulaires (Munz 2012) (Figure 23).

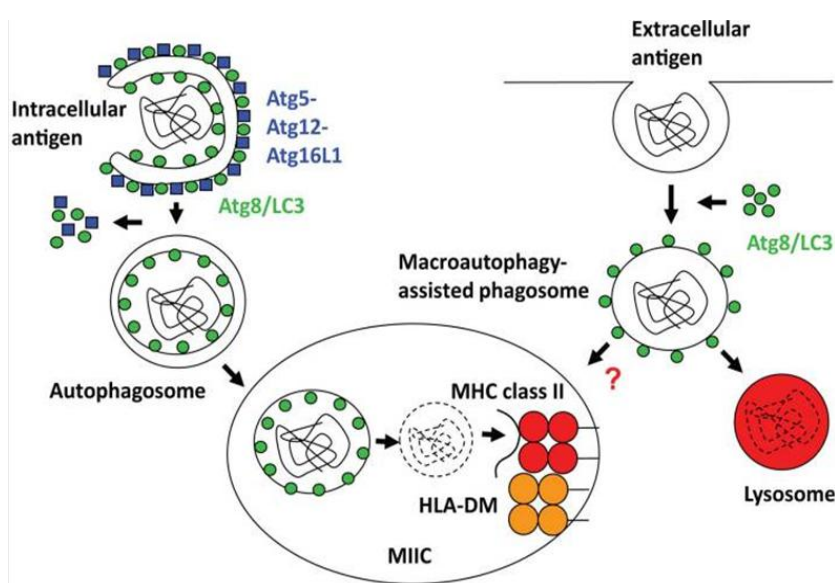


Figure 23 : Régulation de l'apprêtement des antigènes intra et extracellulaires par le CMH II via la macroautophagie. **A gauche :** Les autophagosomes qui recrutent leur cargo via une interaction avec Atg8/LC3 fusionnent avec les compartiments CMH II. **A droite :** Les phagosomes, en particulier ceux comportant des TLR (Toll-like receptors) ou des cellules apoptotiques sont entourés de Atg8/LC3 qui fusionnent avec le lysosome ce qui pourrait aussi contribuer à augmenter la présentation par le CMH II (Munz et al. 2012)

La voie de la macroautophagie se déroule en trois étapes majeures (Rabinowitz and White 2010; Schlie et al. 2011; Wang et al. 2011; Munz 2012). L'étape d'initiation consiste en la formation d'une structure isolée en double membrane qui est régulée par les protéines mTor (mammalian target of rapamycin), Beclin-1 (Atg6) et hVPS-34 (type III phosphatidylinositol-3-kinase). L'origine de cette double membrane n'est pas connue, bien qu'elle soit suggérée provenir du réticulum endoplasmique (Dunn 1990) ou d'un compartiment alternatif appelé phagophore (Stromhaug et al. 1998). Durant la seconde étape, l'élongation de la membrane permet la séquestration de constituants comme des organites défectueux, des agrégats de protéines ou des pathogènes. L'extension de la membrane et le recrutement de substrats à l'intérieur de l'autophagosome nécessitent l'interaction de la protéine Atg5 avec deux systèmes apparentés à l'ubiquitine, Atg8/LC3 et Atg12. Une fois la double membrane refermée, ces protéines se détachent de la membrane externe qui permet la fusion de l'autophagosome avec les lysosomes et sa maturation en autolysosome. Le transfert et la

fusion complète de l'autophagosome avec le lysosome dépendent des microtubules et du maintien de l'acidification du milieu.

Des études ont montré que la phosphorylation via la kinase p70S6 de la protéine ribosomale S6 corrèle fortement avec une inhibition du mécanisme de macroautophagie (Blommaert et al. 1995). L'inactivation par un traitement rapamycine de la kinase mTOR, régulateur positif de p70S6 (Brown et al. 1995), restaure ce processus y compris dans un milieu riche en nutriments. Actuellement, mTOR est la voie de régulation de l'autophagie la mieux caractérisée (Carew et al. 2012).

Par ailleurs, la macroautophagie peut aussi intervenir dans l'apprêtement de protéines extracellulaires par les molécules CMH II (Munz 2012). Dans ce cas, les phagosomes, en particulier ceux comportant des TLR (Toll-like recepteurs) ou des cellules apoptotiques, sont entourés par le système Atg8/LC3 qui fusionne avec les lysosomes, ou potentiellement directement avec les compartiments CMH II. Lee et al. ont montré que l'ovalbumine extracellulaire est moins efficacement présentée aux LT CD4 *in vivo* lorsque les cellules dendritiques sont incapables d'autophagie (Lee et al. 2010). Cependant ce processus de macroautophagie des antigènes extracellulaires reste encore mal compris (Munz 2012).

Dans les cancers, la croissance et la prolifération des cellules dans le microenvironnement tumoral peut devancer à des stades tardifs le développement vasculaire local censé apporter les nutriments et l'oxygène nécessaire à leur survie. Conséquent à ces états de carences en nutriments et d'hypoxie, la macroautophagie mise en place vise à recycler les nutriments afin de favoriser la survie des cellules, tumorales y compris (Schlie, Spowart et al. 2011). Ainsi il a été observé que l'autophagie exerce un effet ambivalent sur l'activation du système immunitaire.

En effet ce processus peut conduire à une stimulation ou au contraire une inhibition des réponses immunes antitumorales. Dans un modèle de mélanome murin, l'inhibition de l'autophagie combinée à une vaccination peptidique antitumorale favorise la régression des tumeurs (Noman et al. 2011). D'autres études ont également mis en évidence un effet immunosuppresseur de l'autophagie et son impact négatif sur la différenciation et la fonctionnalité des LT dans des modèles animaux comme chez l'homme (Ben-Shoshan et al. 2008; Hubbard et al. 2010; Noman, Janji et al. 2011).

En revanche, chez la souris, l'autophagie induite par chimiothérapie entraîne la libération par les cellules tumorales d'ATP (adenosine 5'-triphosphate), un ligand chimioattractant des récepteurs purinergiques exprimés par les cellules de l'immunité, conduisant à l'attraction et la stimulation des cellules de l'immunité antitumorale (Amaravadi ; Michaud et al. 2011). De

même, son induction peut aussi favoriser la maturation des CPA (Ferguson et al. 2011), en augmentant leur capacité à dégrader les protéines et les cellules tumorales mortes (Schlie, Spowart et al. 2011). De plus, il a été montré que l'inhibition des processus de macroautophagie abolit presque entièrement la cross-présentation des antigènes tumoraux. Des expériences menées sur des autophagosomes purifiés ont montré que ceux-ci sont des porteurs efficaces d'antigènes pour une présentation indirecte en partie dépendante de CLEC9A, un récepteur lectine de type C récemment caractérisé et exprimé chez les DC conventionnelles et plasmacytoïdes (Huysamen et al. 2008; Li et al. 2008). De plus, l'utilisation chez la souris d'un vaccin thérapeutique antitumoral enrichi en autophagosomes retarde significativement la croissance de mélanome ou le développement de métastases pulmonaires comparés aux groupes ayant reçu un vaccin à base de cellules tumorales (Li et al. 2011).

Compte tenu de l'ensemble de ces observations, des études complémentaires sont nécessaires à la compréhension des mécanismes et des facteurs influant sur l'action pro- et antitumorale de l'autophagie.

3. Stratégie d'identification d'épitopes T CD4 antitumoraux

Contrairement aux épitopes T CD8, l'identification d'épitopes T CD4 antitumoraux connaît un retard important. Ceci s'explique en partie par le fait que les LT CD4 reconnaissent des peptides présentés par les molécules de CMH II qui, contrairement aux molécules CMH de classe I, sont très peu exprimées par les cellules tumorales. Cependant, compte tenu du rôle crucial des LT CD4 dans la génération de l'immunité antitumorale, l'identification de peptides dérivés d'antigènes tumoraux et restreints par le CMH II est apparue récemment comme une étape importante pour le développement de stratégies d'immunothérapies efficaces (Wang 2001).

Quatre principales méthodes ont été développées pour identifier les peptides exprimés à la surface des cellules tumorales et reconnus par les LT CD4 anti-tumoraux : la stratégie par élution de peptides, l'approche basée sur les TILs, le criblage de bibliothèques de peptides et la méthode prédictive ou immunologie inverse qui reste la plus utilisée pour l'identification d'épitopes T CD4 (Boon, De Plaen et al. 1992; Cox et al. 1994).

3.1. La stratégie par élution de peptides

Une stratégie employée pour identifier les peptides appropriés est basée sur l'identification de peptides naturellement présentés par les molécules de HLA I et HLA II sur des cellules tumorales. Ces peptides ont été isolés par élution acide des molécules HLA purifiées par immunoaffinité et séquencés. Leur séquence permet de remonter à la protéine qui leur a donné naissance et qui constitue l'antigène tumoral. L'inconvénient principal de cette approche est que beaucoup de cellules tumorales expriment des niveaux bas des molécules de HLA, en particulier HLA-II, et le rendement de peptides est faible. De plus l'élution de peptides est un travail lourd qui nécessite l'utilisation de beaucoup de techniques et d'instruments très sensibles pour séquencer les peptides élués. Néanmoins quelques peptides immunogènes (classe I ou classe II) ont été identifiés par ces dernières méthodes tels que des peptides dérivés de la protéine sauvage p53 ou de l'antigène associé au mélanome MART-1.

3.2. Approche basée sur les TILs

Similaire à la méthode génétique pour l'identification d'antigènes tumoraux, cette approche consiste à la base à induire des LT par la restimulation répétée in vitro de TILs (lymphocytes infiltrant la tumeur) avec les cellules tumorales autologues. La transfection des cellules présentant un haplotype HLA approprié par des fragments du gène codant l'antigène permet de localiser précisément la région comportant l'épitope. Finalement, des peptides correspondants à la région identifiée et possédant les résidus d'ancrage à la molécule HLA considérée sont synthétisés et testés pour leur capacité à stimuler des LT. Quelques épitopes HLA II ont été identifiés par cette méthode. C'est le cas de TILs CD4⁺ isolés de patients de cancer cervical reconnaissant 2 peptides dérivés de la protéine E7 du HPV présentés par HLA-DR4 (Hohn et al. 1999). Wang et al. ont également identifié un nouvel antigène généré par réarrangement chromosomal et reconnu par des TILs CD4⁺ (Wang et al. 1999). 34 peptides correspondant à la séquence identifiée ont été synthétisés et testés. Parmi eux, seuls 2 peptides restreints HLA-DR1 et reconnus par des TILs CD4⁺ ont été mis en évidence.

3.3. Criblage de bibliothèques de peptides chevauchants

Le criblage de bibliothèques de peptides synthétiques représente le moyen le plus rapide et le plus efficace pour localiser des épitopes T CD4 à partir d'une séquence protéique connue et

complète de l'antigène sélectionné (Rodda 2002). La détection d'épitopes et l'analyse de réponses T spécifiques peuvent être évaluées à partir de clones, de lignées ou de LT fraîchement isolés. Des méthodes spécifiques ont été développées pour la synthèse d'un large panel de peptides (Maeji et al. 1990).

Des peptides restreints HLA II et dérivés des antigènes tumoraux NY-ESO-1 ont été identifiés par cette méthode (Jager et al. 2000). L'avantage de cette approche est que les résultats sont exhaustifs, couvrant la séquence entière de l'antigène. Cependant l'inconvénient majeur réside dans le coût de la synthèse d'une librairie de peptides chevauchants couvrant la totalité de l'antigène.

3.4. Stratégie prédictive

La stratégie prédictive ou immunologie inverse utilise des outils bioinformatiques modelant le système immunitaire et joue un rôle primordial dans la progression de la découverte des vaccins peptidiques. Elle est actuellement la plus utilisée pour l'identification d'épitopes T CD4 dérivés d'antigènes de tumeurs. Des épitopes T CD4 dérivés de TERT (Schroers et al. 2003), Survivine (Wang et al. 2008), gp100 (Cochlovius et al. 1999), MAGE-A3 (Consogno et al. 2003) ou encore RAGE-1 (Stassar et al. 2001) ont été identifiés grâce à cette approche.

Cette stratégie prédictive se déroule généralement selon les étapes décrites ci-dessous (Kobayashi and Celis 2008) (Figure 24) :

a) sélection de l'antigène tumoral

Plusieurs critères entrent en jeu pour le choix de la protéine la plus appropriée à étudier. Le plus évident repose sur la connaissance exacte de la séquence en acides aminés de l'antigène ciblé. De plus la sélection de grosses protéines est préférable car la possibilité de trouver un ou plusieurs épitopes liant les molécules du CMH II augmente par la même occasion. Un autre critère idéal pour la sélection de l'antigène serait de sélectionner uniquement des protéines exprimées uniquement par les cellules tumorales et pas par les cellules normales. Ceci permettrait d'éviter une éventuelle induction des mécanismes de tolérance dirigés contre les antigènes du soi qui réduiraient l'efficacité de la réponse immune antitumorale. De plus, même si une forte immunité antitumorale est induite, il existerait un risque significatif d'autoimmunité contre les tissus sains exprimant l'antigène. Ainsi les TAA candidats les plus

appropriés font partis du groupe 'cancer-testis' (voir chapitre 'les antigènes associés aux tumeurs'). D'autres TAA possibles ont une expression limitée dans certains tissus considérés comme non-vitaux (prostate, sein, mélanocytes). Ainsi, en fonction du type de tumeur, l'analyse prédictive de peptides restreints par le CMH II peut se porter sur une ou plusieurs protéines candidates.

b) sélection des épitopes T CD4 à l'aide de programmes de prédiction

Les premiers essais de prédiction ont débuté en se basant sur la découverte de résidus spécifiques (ou de type de résidus : hydrophobiques, chargés positivement ou négativement) présents à des positions particulières de la courte séquence peptidiques (9-20 résidus). Ces motifs sont spécifiques à chaque allèle CMH II mais ne sont pas clairement définis. S'il est possible d'identifier avec exactitude les motifs des peptides élués des molécules CMH I purifiées du fait de leur taille restreinte (8-10 résidus), ce n'est pas le cas des peptides liant les CMH II dont la taille varie de 9-20 acides aminés. Ainsi l'analyse des séquences est rendue plus complexe. Une avancée majeure dans le développement des algorithmes de prédiction repose sur le développement de tests de liaisons des peptides aux CMH II. En se basant sur cette approche, Southwood et al. ont élaboré un algorithme informatique à partir d'une large base de données de peptides capables de lier les CMH II (Southwood et al. 1998). D'autres études ont permis par la suite de compléter cette base de données (Wang et al. 2010). Ainsi plusieurs algorithmes basés sur la prédiction des motifs de liaison peptidique aux molécules HLA de classe II et/ou sur la quantification de l'affinité des peptides pour ces mêmes molécules ont été développés (Wang, Sidney et al. 2010) (Tableau 6).

Prediction program	HLA-II	URL
SYFPEITHI	DR	http://www.syfpeithi.de/
NetMCHIIpan 2.1	DR, DP, DQ	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMCHIIpan/
NetMCHII 2.2	DR, DP, DQ	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMCHII/
ProPred	DR	http://www.imtech.res.in/raghava/propred/
SVRMHC	DR, DQ	http://svrmhc.biolead.org/
MHCpred	DR	http://www.ddg-pharmfac.net/mhcpred/MHCPred/

Tableau 6 : Algorithmes de prédiction d'épitopes HLA de classes II

c) Evaluation in vitro de l'immunogénicité des peptides chez l'homme

Une fois qu'un nombre raisonnable de peptides a été sélectionné à partir de l'analyse des algorithmes, des peptides synthétiques sont développés et testés in vitro pour leur capacité à

stimuler des réponses T CD4. Les techniques d'immunisation *in vitro* utilisées pour la génération de lignées T CD4 et de clones utilisés sont décrites ci-après. Brièvement des lymphocytes issus de sang de donneurs sains ou de patients atteints de cancers sont cultivés *in vitro* en présence des peptides et d'IL-2. Après un ou plusieurs cycles de stimulation les lignées T ou de clones (obtenus par dilutions limites), l'immunogénicité des peptides est évaluée par des tests de prolifération *in vitro* et des tests ELISPOT/ELISA mesurant la production de cytokines. La restriction HLA des lignées ou des clones T générés est testée contre des fibroblastes murins (cellules L) transfectés avec un unique allèle CMH II humain et chargés avec les peptides. Une courbe de titration peptidique peut être effectuée pour estimer l'avidité des peptides.

d) Evaluation de l'apprêtement naturel des peptides tumoraux par les CMH II in vitro et in vivo par l'utilisation de souris transgéniques HLA

Généralement la réactivité des lymphocytes T CD4 spécifiques des peptides sélectionnés, est ensuite testée contre des cellules tumorales CMH II-positives et exprimant l'antigène tumoral. Cette reconnaissance tumorale directe est une autre étape de validation indiquant que le peptide est naturellement apprêté et présenté par la tumeur. Néanmoins, à l'exception des lymphomes T et B, très peu de cellules tumorales expriment naturellement les molécules de CMH II. Celles-ci peuvent cependant être induites après un traitement de 24-72H par IFN γ avant de réaliser le test. Un autre facteur limitant de cette technique repose sur le fait que la cellule tumorale doit exprimer le même allèle HLA que celui qui restreint la réponse T CD4 spécifique du peptide.

Une autre technique utilisée pour parer à ces inconvénients consiste à 'nourrir' des cellules dendritiques autologues soit avec la protéine antigénique (si celle-ci est disponible), soit un lysat de cellules tumorales (obtenu après des cycles de congélation-décongélation) ou des cellules tumorales apoptotiques (obtenues par irradiation). Les cellules dendritiques vont alors pouvoir capturer, apprêter et présenter les peptides dérivés des protéines tumorales aux LT CD4. Dans certains cas, il peut être possible d'utiliser un ADN recombinant codant l'antigène tumoral. Dans ces situations, il n'est pas nécessaire que la lignée tumorale exprime les molécules CMH II car les LT CD4 reconnaissent les complexes CMH II/peptide présents à la surface des DC. La spécificité antigénique est validée par l'utilisation d'une lignée tumorale contrôle qui n'exprime pas l'antigène ciblé et par la démonstration que l'utilisation d'anticorps bloquant anti-CMH II est capable d'inhiber la réactivité des LT CD4 dirigée contre les DC présentant l'antigène.

Récemment, l'immunisation de souris transgéniques HLA avec la protéine tumorale ou de l'ADN codant pour l'antigène est apparue comme un moyen efficace d'évaluer l'apprêtement *in vivo* des peptides sélectionnés (Touloukian et al. 2000; Zeng et al. 2000). Ces souris expriment des molécules CMH II humaines et, idéalement, elles peuvent être aussi invalidées par leur propre CMH II murin afin que les molécules CMH II humaines soient les seules disponibles pour l'éducation thymique et la mobilisation des LT CD4 en réponse aux antigènes (Taneja and David 1998; Ru et al. 2012).

Actuellement seul un petit nombre d'épitopes T CD4+ capables de lier plusieurs HLA II (pan-HLA II) est décrit dans les tumeurs, la majorité stimulant des réponses T CD4 helper de type-1 (Kobayashi and Celis 2008)(Tableau 7).

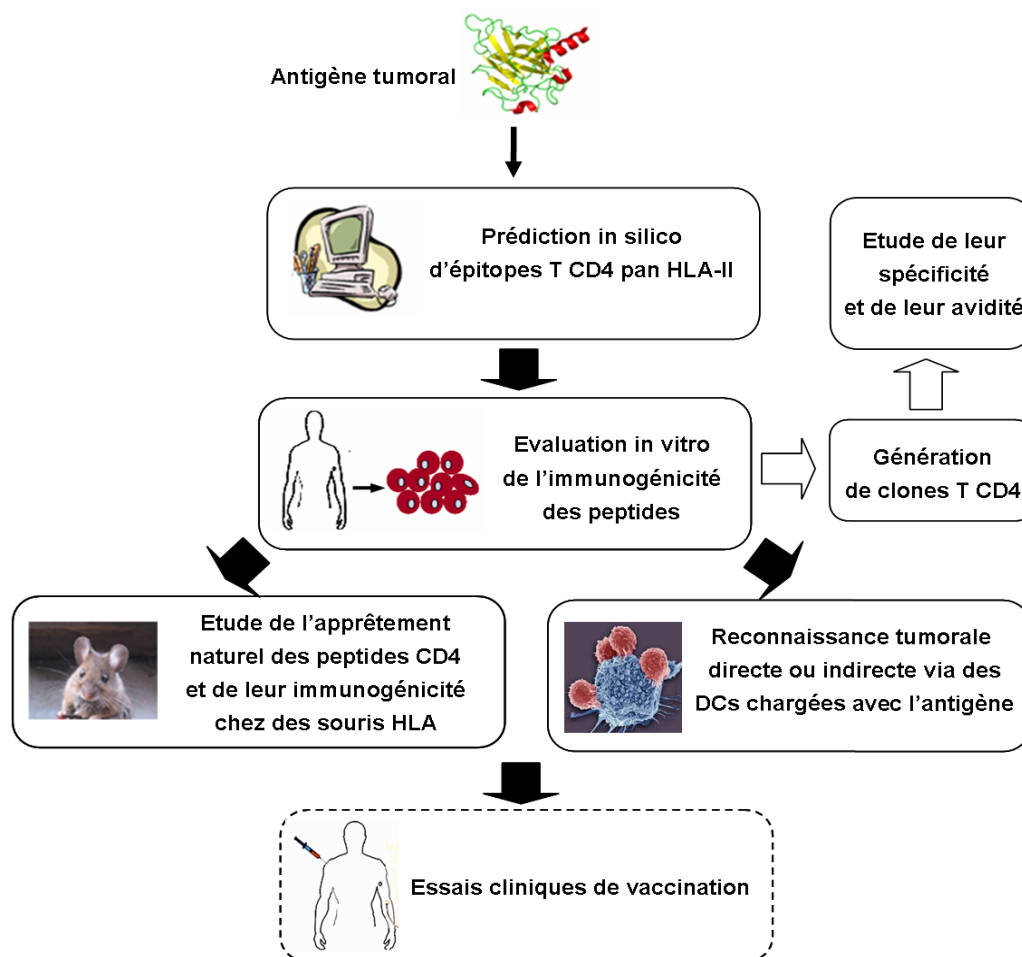


Figure 24 : Etapes de la stratégie classique d'immunologie inverse pour la prédiction d'épitopes T CD4.

Antigène	Position du peptide	Séquence peptidique	HLA-II restriction
EBNA2	280 - 290	TVFYNIPPML	DR1, DR7, DR16, DR52, DQ2
EBV LMP1	159 - 175	YLQQNWWTLLVDLLWLL	DR9, DR15, DR53
HTLV-1 Env	196 - 210	LDHILEPSIPWKSIL	DR9
	317 - 331	AVWLVSALAMGAGVA	DQ6
	384 - 398	LLFWEQGGGLCKALQE	DR15
HTLV-1 Tax	191 - 205	IEELLYKISLTTGAL	DR1, DR9
	305 - 319	LHLLFEEYTNIPISL	DR15, DQ9
HER2/neu	883 - 899	KVPIKWMALLESILRRRF	DR1, DR4, DR52, DR53
gp100	74 - 89	GPTLIGANASFSIALN	DR7
	175 - 189	GRAMLGTHTMEVTYV	DR53, DQ6
	576 - 590	SLAVVSTQLIMPGQE	DR7
MAGE-A3	146 - 160	FFPVIFSKASSSLQL	DR4, DR7
WT1	124 - 138	QARMFPNAPYLPSCIL	DR15, DR53
STEAP	102 - 116	HQQYFYKIPILVINK	DR1, DR9, DR53
	192 - 206	LLNWAYQQVQQNKED	DR9, DR53
TARP	1 - 14	MQMFPPSPPLFFFLQ	DR53
	14 - 27	QLLKQSSRRLEHTF	DR1, DR9, DR13, DR15
PSMA	334 - 348	TGNFSTQKVKMHIHS	DR4
	687 - 701	YRHVIYAPSSHNKYA	DR9, DR53
	730 - 744	RQIYVAAFTVQAAAE	DR53
CEA	625 - 639	YSWRINGIPQQHTQV	DR4, DR53
	653 - 667	YACFVSNLATGRNNS	DR4, DR7
TERT	44 - 58	PAAFRALVAQCLVCV	Promiscuous DR, DP, DQ
	578 - 592	KSVWSKLQSIGIRQH	Promiscuous DR, DP, DQ
	611 - 626	EARPALLTSRLRFIPK	Promiscuous DR, DP, DQ
	672 - 685	RPGLLGASVLGLDDI	DR1, DR7, DR15
	766 - 780	LTDLQPYMRQFVAHL	DR4, DR11, DR15
	916 - 930	GTAFFVQMPAHGLFPW	Promiscuous DR, DP, DQ
	1041 - 1055	SLCYSILKAKNAGMS	Promiscuous DR, DP, DQ

Tableau 7 : Liste d'épitopes T CD4 dérivés d'antigènes tumoraux identifiés et naturellement apprêtés. (Extrait et adapté de Kobayashi and Celis, 2008).

OBJECTIF

Parmi les différentes sous-populations de LT CD4 identifiées, les Th1, caractérisés par la production de cytokines telles que IFN γ , TNF α , et IL-2, jouent un rôle majeur dans l'activation des réponses immunitaires antitumorales. Ils sont nécessaires à l'initiation et la fonction des cellules cytotoxiques, et préviennent également l'induction d'un état tolérogène. Par conséquent, durant cette dernière décennie, une attention croissante est portée à l'identification d'épitopes restreints HLA-II issus de nombreux TAA et capables d'induire des réponses CD4 Th1. Cependant peu d'épitopes CD4 helper sont actuellement utilisés en clinique. Ainsi l'identification de peptides dérivés d'antigènes tumoraux pertinents et capables de lier plusieurs allèles HLA II permettrait d'améliorer l'efficacité des vaccins anti-cancers ainsi que le suivi des réponses T CD4 antitumorales chez les patients. Au cours de cette thèse nous avons caractérisé des réponses T CD4 spécifiques de TERT, un prototype d'antigène tumoral universel, et étudié l'influence des LT CD4 anti-TERT dans les cancers.

L'objectif de la première partie de ce travail a été :

- i) Identifier de nouveaux peptides restreints HLA-DR dérivés de TERT capables de stimuler *in vitro* des réponses CD4 Th1 spécifiques.
- ii) Etudier l'influence de la réponse spontanée T CD4 anti-TERT chez des patients atteints de cancer bronchique.

Après avoir réalisé l'étude *in vitro* de l'immunogénicité de ces nouveaux peptides CD4, nous avons dans un deuxième travail :

- i) Validé la présence de LT CD4 anti-TERT dans différents cancers humains.
- ii) Etudié *in vivo* l'immunogénicité des peptides TERT CD4 et validé leur intérêt thérapeutique dans un modèle tumoral préclinique.

RESULTATS

PARTIE 1 : Identification de nouveaux peptides immunogènes dérivés de la télomérase restreints HLA-DR et analyse des réponses lymphocytaires T CD4 anti-TERT chez des patients atteints de cancer du poumon.

ARTICLE 1 : Analysis of Spontaneous Tumor-Specific CD4 T-cell Immunity in Lung Cancer Using Promiscuous HLA-DR Telomerase-Derived Epitopes: Potential Synergistic Effect with Chemotherapy Response.

Yann Godet, Elizabeth Fabre*, Magalie Dosset, Michele Lamuraglia, Emeline Levionnois, Patrice Ravel, Nadine Benhamouda, Aurélie Cazes, Françoise Le Pimpec-Barthes, Beatrice Gaugler, Pierre Langlade-Demoyen, Xavier Pivot, Philippe Saas, Bernard Maillère, Eric Tartour, Christophe Borg and Olivier Adotévi.*

*Contributed equally - Clin Cancer Res;18(10); 2943–53. 2012 AACR

REVUE 1 : Is preexisting antitumor CD4 T cell response indispensable for the chemotherapy induced immune regression of cancer?

Yann Godet, Magalie Dosset, Christophe Borg, and Olivier Adotévi.

But : Identifier de nouveaux peptides restreints HLA-DR dérivés de TERT capables de stimuler *in vitro* des réponses CD4 Th1 spécifiques et étudier l'influence de la réponse spontanée T CD4 anti-TERT chez des patients atteints de cancer.

Méthode expérimentale : Nous avons utilisé une méthode prédictive pour identifier des peptides restreints HLA-DR dérivés de TERT. Trois algorithmes différents ont été utilisés pour prédire les séquences peptidiques de 15 amino-acides pouvant lier les allèles HLA-DR les plus représentés dans la population, à savoir sept molécules codées par les gènes HLADRB1, trois molécules codées par les gènes HLA-DRB3*0101, HLA-DRB4*0101, HLA-DRB5*010. La capacité des peptides à lier les molécules HLA-DR a été mesurée par un test de liaison HLA. L'immunogénicité des peptides a été évaluée en utilisant un protocole de stimulation *in vitro* à partir de cellules mononucléées de donneurs sains. L'étude de la polarisation des LT CD4 spécifiques d'UCP a été réalisée à l'aide de tests RT-PCR,

ELISPOT et cytokines multiplex. Des clones T spécifiques des UCP ont été générés par dilution limite. L'évaluation de la présence naturelle de LT CD4 anti-UCP chez les patients a été réalisée par ELISPOT- γ après 8-10 jours de sensibilisation *in vitro* par les peptides UCP. L'étude de l'influence de la réponse spontanée T CD4 spécifique des UCP a été mesurée avant chimiothérapie au sein d'une cohorte de patients atteints de cancer bronchique métastatique.

Résultats :

L'utilisation d'algorithmes de prédiction nous a permis de retenir 4 peptides nommés 'universal cancer peptides' UCP1, -2, -3 et -4. Les propriétés de liaison des peptides évaluées par un test de liaison aux molécules HLA-DR ont montré que chaque UCP peut lier au minimum 6 allèles HLA-DR différents avec de fortes affinités ($RA < 100$).

En utilisant un protocole de stimulation *in vitro* en présence d'IL-2 et IL7, nous avons généré *in vitro* des LT CD4 spécifiques des UCP à partir de lymphocytes de donneurs exprimant différents allèles HLA-DR. La réactivité de ces lymphocytes CD4 anti-UCP a été évaluée par ELISPO IFN γ . La production d'IFN γ par les LT CD4 anti-UCP est inhibée en présence d'un anticorps anti-HLA-DR bloquant mais pas en présence d'anticorps anti-HLA-DP ou anti-pan-HLA classe I, confirmant ainsi la restriction HLA-DR de ces LT. Nous avons détecté par ELISPOT IFN γ , la présence de réponses spontanées T CD4 anti-UCP chez des patients atteints de cancer bronchique métastatique. Les réponses spécifiques de UCP2 et UCP4 sont plus fréquemment retrouvées ($> 60\%$ des cas). Les clones T CD4 spécifiques de ces peptides ont une forte avidité et produisent majoritairement après une stimulation peptidique des cytokines Th1 telles que le TNF- α , l'IFN γ et l'IL-2.

L'étude et l'influence de la réponse lymphocytaire T CD4 anti-UCP a été ensuite évaluée au sein d'une cohorte de 84 patients atteints de cancer bronchique métastatique. A l'aide de tests ELISPOT IFN γ en présence d'un pool peptidique contenant les 4 UCP, nous avons retrouvé la présence de lymphocytes T CD4 anti-UCP chez 38 % des patients alors que cette réponse est indétectable chez les individus sains testés ($n = 22$). L'analyse statistique a montré une absence de corrélation entre la présence ou non de réponses T CD4 anti-UCP et les principales caractéristiques cliniques et biologiques des patients ainsi que sur l'évolution de la maladie. Cependant, un impact positif de cette réponse sur la survie a été observé dans le sous groupe de patients ayant eu un bénéfice clinique après une chimiothérapie à base de sels de platine (13 vs 10 mois, $P < 0.03$). La présence d'une réponse T CD4 anti-UCP n'a aucun effet chez les patients ayant progressé après la première ligne de traitement. Les réponses T anti-

virales mesurées dans le même temps chez les patients n'avaient aucune influence quelque soit le groupe de patients (répondeurs ou progressseurs).

Conclusion : Nous avons identifié de nouveaux peptides CD4 restreints HLA-DR dérivés de la télomérase et capables de stimuler *in vitro* des réponses lymphocytaires T CD4 de type Th1 chez des patients atteints de cancer. Nos résultats suggèrent fortement que la présence d'une réponse spontanée T CD4 anti-TERT chez les patients pourrait agir en synergie avec l'efficacité de la chimiothérapie. L'ensemble de ces résultats souligne l'intérêt thérapeutique potentiel de stimuler des réponses CD4 Th1 spécifiques de TERT et ouvre des perspectives pour l'utilisation des UCP comme outils de monitoring innovant des réponses T CD4 antitumorales.

Analysis of Spontaneous Tumor-Specific CD4 T-cell Immunity in Lung Cancer Using Promiscuous HLA-DR Telomerase-Derived Epitopes: Potential Synergistic Effect with Chemotherapy Response

Yann Godet^{1,2,3}, Elizabeth Fabre⁵, Magalie Dosset^{1,2,3}, Michele Lamuraglia^{5,6}, Emeline Levionnois⁵, Patrice Ravel⁸, Nadine Benhamouda⁵, Aurélie Cazes⁵, Françoise Le Pimpec-Barthes⁵, Beatrice Gaugler^{1,2}, Pierre Langlade-Demoyen⁷, Xavier Pivot^{1,3,4}, Philippe Saas^{1,2,3}, Bernard Maillère⁹, Eric Tartour⁵, Christophe Borg^{1,2,3,4}, and Olivier Adotévi^{1,2,3,4}

Abstract

Purpose: To investigate the presence and impact of spontaneous telomerase-specific CD4 T-cell responses in cancer patients.

Experimental Design: A multistep approach was used to design novel pan-HLA-DR-restricted peptides from telomerase. T-cell clones isolated from cancer patients were used to characterize the polarization of telomerase-specific CD4 response. The presence of spontaneous CD4 T-cell response against telomerase was monitored in 84 metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC) patients before first-line chemotherapy (CT) using IFN- γ ELISPOT assay. Then we analyzed the impact of the pretherapeutic telomerase-specific CD4 T immunity on clinical outcome in patients according to their respective response to CT.

Results: We described four novel telomerase-derived CD4 epitopes referred as universal cancer peptides (UCP) that effectively bind to most commonly found human MHC class II alleles. UCP-specific CD4 T-cell repertoire is present in human and UCP-specific CD4 T-cell clones generated from cancer patients exhibited high avidity and are Th1 polarized. Significant frequency (38%) of naturally occurring UCP-specific T-cell responses were detected before CT in advanced NSCLC but not in healthy volunteers. This response was shown to significantly increase overall survival (OS) of patients responding to CT (Median OS: 53 vs. 40 weeks, $P = 0.034$).

Conclusions: These results show for the first time a potential synergistic effect of telomerase-specific CD4 T-cell response with CT response in NSCLC and underline the potential role of tumor-specific CD4 T-cell response on the efficiency of conventional anticancer therapy. *Clin Cancer Res*; 18(10): 2943–53. ©2012 AACR.

Authors' Affiliations: ¹INSERM, Unité Mixte de Recherche 1098; ²Etablissement Français du Sang de Bourgogne Franche-Comté, UMR1098; ³Université de Franche-Comté, UMR1098, SFR IBCT; ⁴CHRU de Besançon, Service d'Oncologie, F-25020 Besançon cedex; ⁵INSERM U970 PARCC, Université Paris Descartes, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d'Immunologie Biologique (AP-HP); ⁶UMPC Université Paris 6, UMR 7623, Laboratoire d'imagerie Paramétrique; ⁷Invectys, Institut Pasteur Biotop, Paris; ⁸Centre de Biochimie Structurale, CNRS, Unité Mixte de Recherche 504, Université Montpellier, Montpellier; and ⁹Commissariat à l'Energie Atomique, Institut de Biologie et de Technologies de Saclay, Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines, Gif-sur-Yvette, France

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Y. Godet and E. Fabre contributed equally to this work.

Corresponding Authors: Olivier Adotévi, INSERM, Unité Mixte de Recherche 1098, F-25020 Besançon Cedex, France. E-mail: olivier.adotevi@univ-fcomte.fr and Yann Godet, Phone: 00-333-8161-5615; Fax: 0381-615-617; E-mail: yann.godet@efs.sante.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3185

©2012 American Association for Cancer Research.

Introduction

The recent introduction of immunotherapy in clinical practice (1, 2) emphasized the influence of immune responses on cancer prognosis and chemotherapy (CT) effectiveness. Among adaptive immune cells involved in antitumor responses, CD8 T cells (CTL) have been considered to be the main protagonists because they exhibit cytotoxic activity toward tumor cells expressing tumor-associated antigens (TAA). However, it is now clear that CD4 T helper 1 (Th1) lymphocytes also play a critical role in orchestrating the antitumor response. These cells mainly characterized by IFN- γ production are critical for the induction and maintenance of CD8 T cells against tumors by providing help through multiple interactions (3, 4). CD4 Th1 cells can also exert antitumor activity that is independent of CD8 T cells by recruiting and activating innate immune cell such as natural killer and macrophages (5, 6). The IFN- γ secreted by CD4 Th1 cells also mediates direct antitumor or antiangiogenic effect (7). A new dimension of CD4 helper T cells role during cancer is

Translational Relevance

This article reports the role of naturally occurring telomerase-specific CD4 T-cell responses in lung cancer. We describe telomerase-derived CD4 epitopes referred as universal cancer peptides (UCP) that bind to most commonly found human MHC class II alleles. Spontaneous UCP-specific CD4 T-cell response was detected in 38% of patients' prior first-line chemotherapy (CT). The presence of this response significantly increases overall survival of patients responding to CT ($P = 0.034$). These results provide a new tool for comprehensive monitoring of antitumor CD4 T-cell response and support the concept of immune modulation of CT efficacy. In addition, it could be used to provide compensatory measures to restore or improve anticancer immune responses.

also reported. It has been shown that CD4 T cells must pave the way for killer T-cell entry at tumor site (8) or infected mucosa (9). Furthermore CD4⁺ T cells are required for the induction of cellular senescence and angiogenesis inhibition, resulting in sustained tumor regression upon inactivation of the MYC or BCR-ABL oncogene in a mouse tumor model (10). In human, high density of tumor-infiltrating Th1 cells has been shown as good prognostic marker in colorectal cancer (11). This study also showed that patients with high expression of the Th17 cluster gene had a poor prognosis. In non-small cell lung cancer (NSCLC) both immune cells infiltration and localization have been correlated with clinical outcome (12, 13).

On other hand, recent progress in the fields indicates that pretherapeutic immune parameters affect the efficacy of conventional chemotherapies (14, 15). Moreover, the efficacy of many of the currently used chemotherapeutic agents depends on the active contribution of both innate and adaptive immune effectors (16). For example, spontaneous and induced leukemia-specific CD4⁺ Th1 cells in patients bearing chronic myelogenous leukemia and successfully treated with imatinib mesylate were associated with clinical benefit suggesting a synergy between the treatment tumor-specific CD4 T-cell response (17). However, little is known about the relationship between tumor-specific CD4 Th1 immunity and efficacy of CT. This could be related to technical reasons that limit the ability to easily monitor this response in patients. All above emphasize the critical function of CD4 Th1 responses in cancer immunosurveillance and strongly encourages to use/develop relevant tools to study tumor-specific CD4 helper T-cell responses and raise the interest to stimulate these cells during antitumor immunotherapy.

During the past 10 years, increasing attention has focused on identifying MHC class II epitopes from multiple TAAs (18). Nevertheless, only few CD4 helper epitopes derived from tumor antigens have been used in clinical settings.

Although HLA class II locus is very polymorphic, degenerate peptides capable of binding multiple allelic variants of HLA-DR have been described (19, 20). Identification of degenerate peptides of relevant TAAs may lead to improved cancer vaccine and for effective monitoring of CD4 T-cell immunity. On this view telomerase reverse transcriptase (TERT) has emerged as a promising universal target (21). TERT maintains telomere length in dividing cells and its overexpression is the predominant mechanism developed by malignant cells to escape telomere-dependent cell death (22). Therefore TERT activity has been observed in all studied cancer forms, including stem cell-like tumor cells (23) and is therefore a hallmark of cancer cells (24). Furthermore, recent clinical studies using a TERT-derived CD4 epitope vaccine called GV1001 was able to increase survival of cancer patients when combined with radio or CT (25, 26). These results suggested the interplay between anti-TERT-CD4 T-cell immunity and conventional anticancer therapy. However, the natural occurring TERT-specific CD4 helper T-cell responses in patients are unknown.

In this study, we described 4 novel TERT-derived CD4 epitopes referred as universal cancer peptide (UCP) that bind to most commonly found HLA-DR alleles. By prospectively studying a cohort of 84 advanced NSCLC patients, we found spontaneous UCP-specific CD4 immune response in 38% prior CT. Although CD4 T-cell response against TERT was not correlated with main clinical characteristics of the patient, the presence of this response was shown to be significantly associated with a better outcome in CT-responding patients. These results support the relationship between antitumor immune status and CT regimen in NSCLC.

Materials and Methods

Patients

Patients were enrolled at the university hospital Georges Pompidou (Paris, France) and university Hospital Jean Minjoz (Besançon, France) from January 2009 to September 2011. Tumor stage and grading were determined according to the International Union against Cancer (UICC) classification. After informed consent patients with histologically proven NSCLC were prospectively included in the clinical trial. This study was conducted in accordance with French laws and after approval by the local ethics committee. Blood cells were collected from anonymous healthy donors at the Etablissement Français du Sang (EFS, Besançon, France) as apheresis kit preparations after informed consent and following EFS guidelines. HLA-DR genotyping was done by using the Olerup SSP DRB1 typing kit (Olerup, Sweden).

Telomerase-derived CD4 T epitopes selection and binding assay

The 4 peptides derived from TERT referred as UCP [UCP1 (PAAFRALVAQCLVCV), UCP2 (KSVWSKLQSIGIRQH), UCP3 (GTAFVQMPAHGLFPW), and UCP4

(SLCYSILKAKNAGMS)] were predicted to bind multiples HLA-DR molecules by using SYFPEITHI (www.syfpeithi.de), NetMHCpan 2.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/>) and NetMHCII 2.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>) softwares (18). Synthetic peptides (>80% purity) were purchased from Activotec. The binding capacity to HLA-DR molecules was assessed by competitive ELISA as previously reported (27).

Generation of UCP-specific T cell lines from healthy donors

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density centrifugation on Ficoll-Hyperpaque gradients (Sigma-Aldrich) and plated at 4×10^6 cells per well in a 24-well plate in RPMI 5% human serum with 10 $\mu\text{mol/L}$ of pool of the 4 UCPs. Recombinants interleukin (IL) 7 (5 ng/mL; Peprotech) and IL-2 (20 UI/mL; Novartis) were added at days 1 and 3, respectively. At days 7 and 14, cells were stimulated with γ -irradiated autologous PBMCs pulsed with 10 $\mu\text{mol/L}$ of UCPs and 20 UI/mL IL-2 was added at days 8 and 15 as previously reported (27, 28). At day 21, CD4 T cells were purified (Miltenyi) and the specificity of T cell lines was investigated by IFN- γ ELISPOT. Briefly, CD4 T cells (10^5 per well) were cultured in anti-human IFN- γ monoclonal antibody precoated ELISPOT plate with each UCP (5 $\mu\text{mol/L}$) in AIM V medium (Invitrogen) for 18 hours at 37°C. Cells cultured with medium alone or PMA (100 ng/mL; Sigma-Aldrich) and ionomycin (10 $\mu\text{mol/L}$; Sigma-Aldrich) were used as negative and positive controls, respectively. The IFN- γ spots were revealed following the manufacturer's instructions (Gene Probe). The number of specific T cells expressed as spot-forming cells/ 10^5 cells was calculated after subtracting negative control values (background). Spot-forming cells were counted using the C.T.L. Immunospot system (Cellular Technology Ltd.). For HLA-DR restriction, the following blocking antibodies anti-HLA class I (clone W6.32), HLA-DR (clone L243), and HLA-DP (clone B7/21; 10 $\mu\text{g/mL}$) were added in cell culture during the ELISPOT. All the experiments were conducted in triplicates.

CD4 T-cell clones isolation and amplification

T-cells clones were isolated by limiting dilution and amplified after stimulation by PHA in presence of irradiated allogenic PBMCs, B-EBV cell line, and 150 UI of IL-2 according to previously described procedure (29). Functional analyses of UCP-specific CD4 T-cell clones were done by using intracytoplasmic TNF- α staining and Human Ten-plex cytokines assay (Human Th1/Th2/Inflammation Diaplex; Diaclone).

Assessment of spontaneous UCP-specific CD4 T-cell responses

Ficoll-isolated PBMCs from cancer patients or healthy volunteers were cultured with 10 $\mu\text{mol/L}$ of pool of UCPs in a 24-well plate (4×10^6 cells per well) in RPMI 5% human serum and IL-7 (5 ng/mL) and IL-2 (20 UI/mL) were added at days 1 and 3, respectively (27). For the recall response

against viruses, cells were similarly cultured with the mix of 32 peptides from cytomegalovirus, influenza virus, and Epstein-Barr virus (CTL). After 1 week of cell culture, the presence of UCP-specific T cells was measured by IFN- γ ELISPOT as detailed above (30–32).

Flow cytometry

For intracytoplasmic cytokine staining, after a 5-hour stimulation period with or without 10 $\mu\text{mol/L}$ peptide, T cells were labeled with anti-CD4 (BD Bioscience) and anti-TNF- α (ebioscience) using Cytofix/Cytoperm KIT (BD Bioscience). For flow cytometry Treg analysis, PBMCs were first stained with surface antibodies (anti-CD4, anti-CD25), fixed, permeabilized, and then stained with anti-hFoxp3 (PCH101; eBioscience). Samples were acquired on a FACS Canto II (BD Biosciences) and analyzed with the DIVA software. Neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) was defined as the absolute neutrophil count divided by the absolute lymphocyte count (13).

Statistics

Statistical analyses were carried out with NCSS 2007 software (Number Cruncher Statistical Systems). The level of significance was set at $P < 0.05$ for all tests. Variables were expressed as a mean $\pm$ SD or median and tested with the Wilcoxon Rank-Sum test when suited. Survival curves were calculated with the Kaplan-Meier method and compared with the Log-rank test.

Results

Identification of universal HLA-DR-restricted CD4 T-cell epitopes from TERT

To predict the existence of CD4 epitopes within the amino acid sequence of TERT capable of binding to multiple HLA-DR molecules, we combined results from 3 algorithms Syfpeithi, NetMHCpan-2.1, and NetMHC2.2. We selected four 15-mers peptide sequences referred as UCP1 to UCP4 that scored high in the probability scale for their binding capacity to the commonly found human HLA-DR alleles (Supplementary Table S1). To confirm this result, we carried out an *in vitro* binding assay based on competitive ELISA as previously reported. The data were presented as relative affinities (RA) to easily compare their binding properties to high binder peptides that we used as references and the strong binders have a relative affinity less than 100. Results confirmed the ability of all the peptides to effectively bind to the most common alleles encoded by the HLA-DR (Table 1). The 4 peptides exhibited a strong capacity to bind 7 different HLA-DR molecules, including DR1, DR4, DR7, DR11, DR15, DRB3, and DRB5. Particularly, UCP1 and UCP2 were able to bind every HLA-DR molecules tested with RA from intermediate (100–500) to low RA (< 100). Thus, according to phenotypic frequencies of the 10 prevalent HLA-DR antigens, these peptides could cover more than 90% of population (27). Furthermore, CD4 T-cell responses against UCPs were induced in humanized HLA-DR1*0101/HLA-A2 transgenic mice following immunization with a DNA plasmid encoding the full-length TERT

Table 1. The binding capacity of predicted peptides was tested using competitive ELISA binding assays

Peptides	Sequences	Relative avidity									
		DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR13	DR15	DRB3	DRB4	DRB5
UCP1	PAAFRALVAQCLVCV	3	0.4	50	3	25	1	4	30	4	1
UCP2	KSVWSKLQSIGIRQH	0.2	144	112	1	4	231	8	154	229	1
UCP3	GTAFVQMPAHGLFPW	0.1	173	2	2	0.2	134	0.2	53	>500	0.2
UCP4	SLCYSILKAKNAGMS	0.3	>500	34	8	0.3	>500	3	154	>500	0.5

NOTE: Data are expressed as relative activity RA (ratio of the IC₅₀ of UCPs to the IC₅₀ of the reference peptide) and are the means of 3 experiments. Good binders have a RA less than 100 and weak binders are RA more than 500.

protein (28, 33) and indicating that they are endogenously processed and presented to CD4 T-cell *in vivo* (Dosset and colleagues; manuscript in preparation).

Then the ability of UCP to stimulate human CD4 T cells was tested. For this purpose, lymphocytes isolated from peripheral blood of healthy volunteers were *in vitro* stimulated using a pool of UCP and the generation of UCP-specific CD4 T cell lines was screened using ELISPOT assay. As shown in Fig. 1A, CD4 T cells were able to recognize at least one UCP. The HLA-DR restriction of the UCPs specific CD4 T-cell response was confirmed with the inhibition of IFN- γ secretion in presence of pan HLA-DR blocking antibody (Fig. 1B). The HLA-DR spectra typing revealed that the HLA-DR alleles of normal individual were not shared, supporting the promiscuous nature of the UCPs (Fig. 1C). Thus these results implied that precursor CD4 T cells against UCPs were present in human peripheral T repertoire and they recognized these peptides in multiple HLA-DR contexts. To further characterize these responses, we isolated CD4 T-cell clones specific for UCP2 and UCP4 from cancer patient. All the UCP4-specific CD4 T-cell clones were strongly reactive in the presence of cognate peptide and showed a half-maximal TNF secretion observed at very low peptide concentration (<0.1 μ mol/L; Fig. 2A and B). Similar results were obtained for UCP2-specific clones with a half-maximal TNF secretion observed at approximately 4 μ mol/L (Fig. 2C and D). In addition, we showed after peptide stimulation that the clones mainly produced IFN- γ and TNF- α , but not IL-4 nor IL-17A, in agreement with a Th1 polarization (Fig. 2E). The reactivity of these CD4 T-cell clones were inhibited by HLA-DR blocking antibody indicating their HLA-DR restriction (data not shown). Thus, these results showed that high-avidity UCP-specific CD4 T-cell clones can be generated from cancer patients and were Th1 polarized. They also showed that these UCPs are naturally processed and presented to CD4 T-cell in the context of malignancies.

Presence of naturally occurring CD4 T cells against UCPs in NSCLC patients

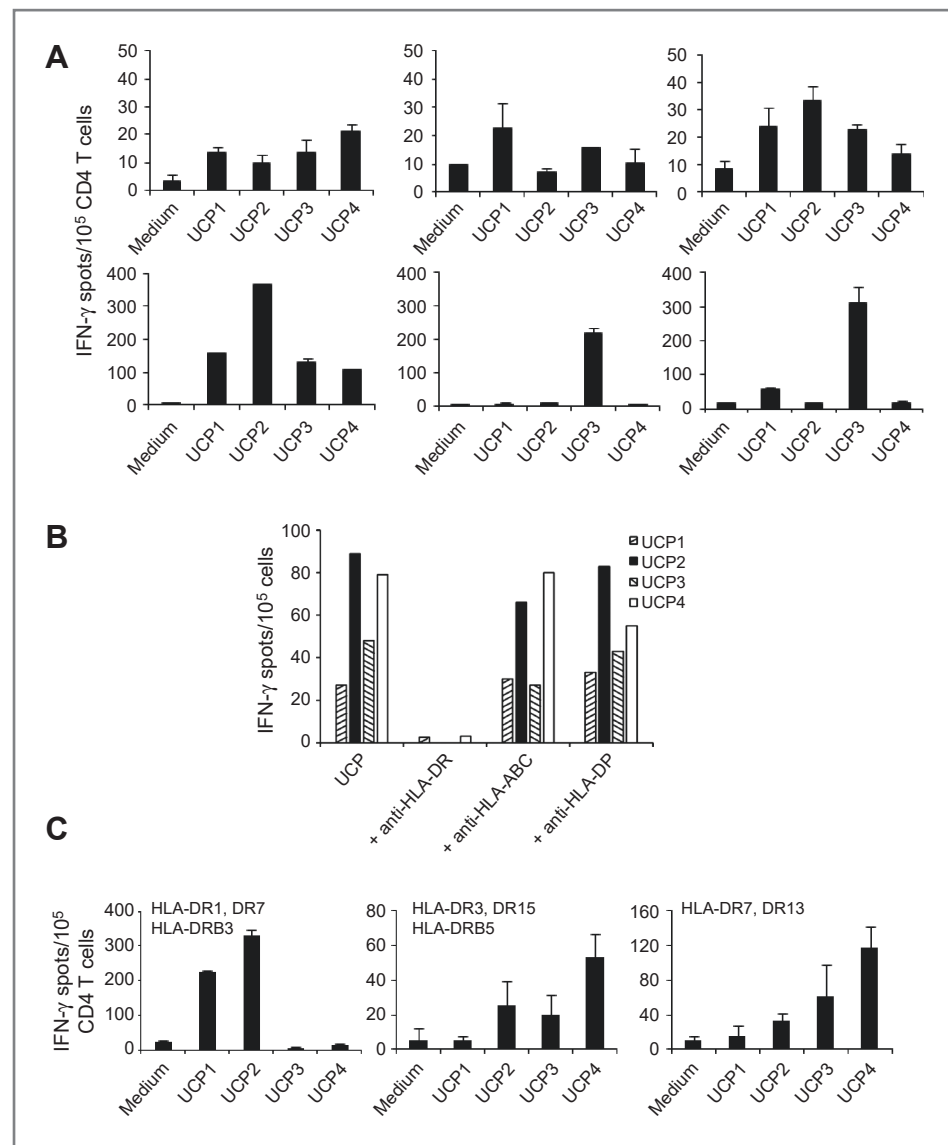
Telomerase gene polymorphisms have been associated with lung cancer susceptibility and TERT expression is found in all types of NSCLC (34, 35). Therefore, we carried out a comprehensive analysis of spontaneous UCP-specific

CD4 T-cell responses in NSCLC. Ficoll-isolated blood lymphocytes from 84 advanced NSCLC patients were collected before first-line CT and cultured shortly (one week) with the pool of UCPs, and the specific T cells were measured by IFN- γ ELISPOT. Blood lymphocytes from 22 healthy volunteers were used as control. Responses were considered positive when the number of IFN- γ secreting cells was at least 2-fold above the negative control. This experimental design enabled us to measure specific CD4 T-cell memory responses. As shown in Fig. 3A, UCP-specific memory immune responses were found in 32 of 84 patients (38%), whereas no specific IFN- γ responses against UCPs were detected in 22 consecutive healthy donors (Fig. 3A). Analysis of the cytokine secretion profile of these responses revealed high production of TNF- α and IFN- γ in the absence of IL-4, IL-17, and IL-10 indicating a Th1 polarization (data not shown). Analyzed individually, each of the 4 UCPs is able to generate a CD4 T-cell response in patients. However, the frequency of T-cell responses to UCP2 and UCP4 suggest that these peptides are more immunogenic (Fig. 3B). The absence of UCPs specific immune responses in patients could not be related to a global T-cell anergy, as illustrated by the presence of effective antiviral recall responses in patients without UCPs specific response (Fig. 3C). To exclude the influence of a number of immune parameters that have been reported to decrease antitumor response in NSCLC (13), we measured circulating CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg) and the plasmatic IL-10 in the patients with or without UCP-specific immune response. We showed similar level of circulating Tregs in the 2 groups (Fig. 3D) and absence of plasmatic IL-10 detection by ELISA was observed regardless of the UCP-immune status (data not shown). In addition, the total lymphocyte counts and NLR were quite similar in these 2 groups (Fig. 3D). Our results indicated that patients with NSCLC are able to spontaneously mount TAA-specific CD4 T-cell responses and that UCPs are prototypic peptides to monitor antitumor immune response in NSCLC.

Spontaneous UCP-specific T-cell immune response increase overall survival of patients responding to chemotherapy

There is increasing knowledge that host immune status can modulate the efficiency of conventional CT. Then, the

Figure 1. UCP-specific T cell lines obtained from healthy donors. CD4 T cell lines were obtained from PBMCs of healthy donors after 3 round of stimulation with a mixture of the 4 UCP and IFN- γ -producing CD4 T cells were assessed by ELISPOT. A, responses against individual UCPs are shown for 6 healthy donors. B, UCP-specific T cell lines were stimulated with the relevant peptide in presence of anti-HLA class I (W6.32), HLA-DR (L243), or HLA-DP (B7/21) blocking antibodies. C, responses against individual UCPs for 3 healthy donors with various HLA-DR genotype.



impact of naturally occurring UCP-specific CD4 immune response before CT on clinical outcome was analyzed in patients that responded or progressed after first-line CT. For this purpose, we focused on 55 stage IV NSCLC patients included between November 2009 and February 2011 with a median follow-up of 10 months. Patient's main clinical characteristics are shown in Table 2. T-cell responses against TERT were not correlated with clinical or prognostic variables such as age, tobacco, ECOG PS status, or histologic subtype (Table 2). Except 6 patients who received erlotinib therapy, all patients were treated with platinum doublet. Thirty of the 55 patients received a second-line CT mainly with erlotinib, pemetrexed, or taxanes. After first line, control disease (CD) based on RECIST criteria were achieved in 36 of 55 (65%), 25% of them achieved a partial response (PR; 14 of 55), and 40% a stable disease (SD; 22 of 55). Progressive disease (PD) was observed in 19 of 55

(35%). The frequency of spontaneous TERT-specific CD4 immune response was similar in patient with CD or PD after CT (Fig. 4A). In contrast, patients displaying a TERT-specific immunity before CT had an increased overall survival (OS) in the CD group compared with patients with no TERT-specific immunity [Median OS: 53 vs. 40 weeks, $P = 0.034$, HR = 0.54, 95% confidence interval (CI): 0.3–1). The preexistence of UCP-specific immune response nonsignificantly increased the progression-free survival (PFS) of CD patients (Median PFS: 33 vs. 24 weeks, $P = 0.391$, HR = 0.76, 95% CI: 0.4–0.7; Fig. 4B). Similar results were observed when we focused on patients that received platinum-based CT, after excluding the erlotinib-treated patients (Median OS: 53 vs. 40 weeks, $P = 0.049$, HR = 0.52 95% CI: 0.3–0.9; Fig. 4C and D). No differences have been observed based on the second-line CT regimen received (data not shown). By contrast, in patients with

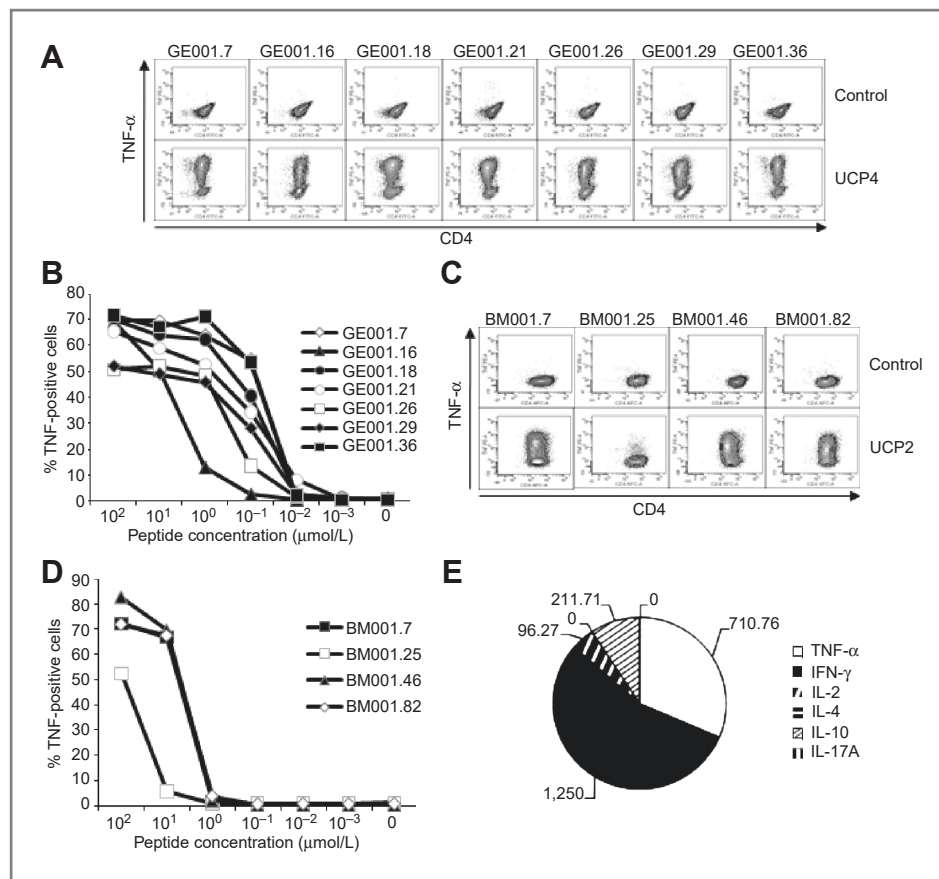


Figure 2. Functional characterization of UCP-specific CD4 T-cell clones. T-cell clones were obtained by limiting dilution of cancer patients T cell lines stimulated one time with the pool of UCPs. A and C, percentage of TNF-producing T cells and of T-cell clones isolated from patients GE001 in response to 10 $\mu\text{mol/L}$ of the relevant UCP; 10⁵ T cells were incubated for 5 hours in the presence of Brefeldin A, stained with CD4 antibody, fixed, and stained with anti-TNF antibody in a permeabilization buffer; 10⁴ T cells were then analyzed in flow cytometry. B and D, reactivity of the CD4 T-cell clones in response to relevant UCP. CD4 T-cell clones were culture with a range of the indicated peptide concentration. TNF secretion was assessed for 5 hours in the presence of Brefeldin A, by flow cytometry. E, detection of cytokines produced by GE001.36 T-cell clone in response to 10 $\mu\text{mol/L}$ of UCP4 using human 10-plex cytokines assay.

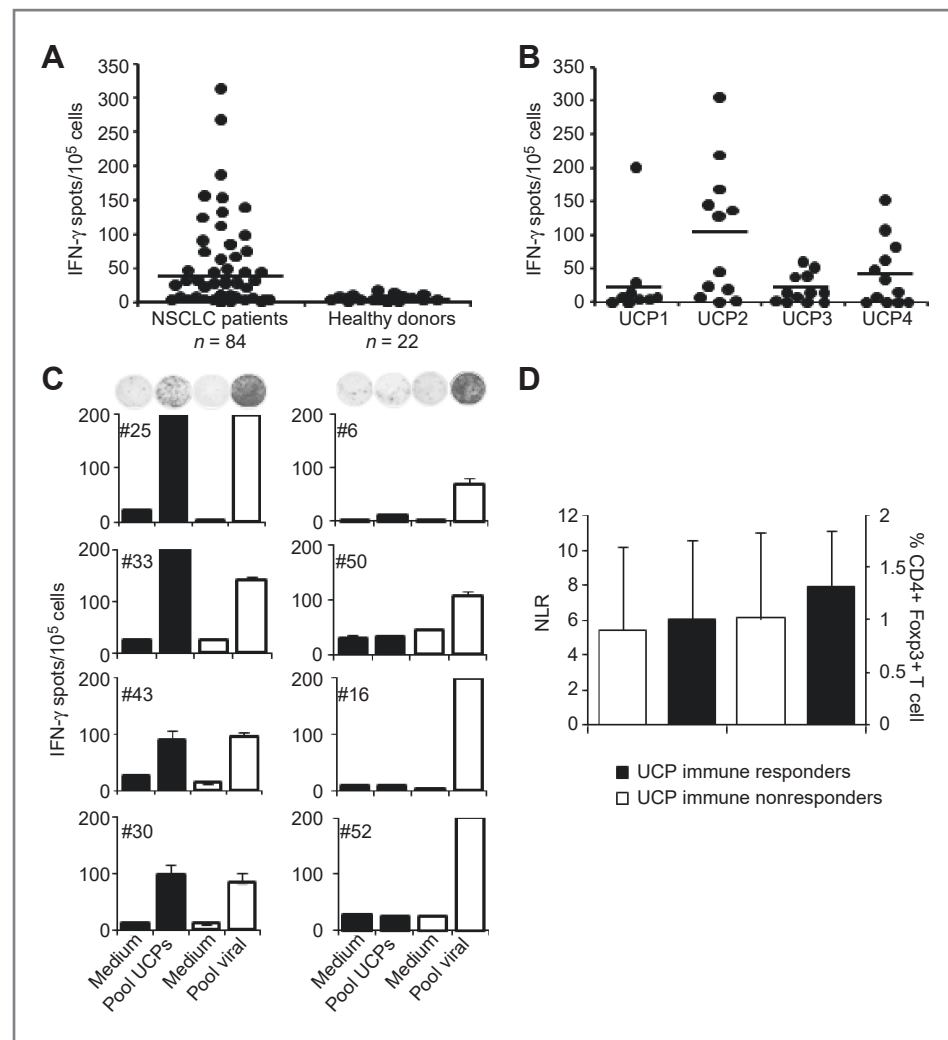
PD after first-line CT, we found no survival difference regardless of UCP-specific immune status (data not shown). Thus, the presence of natural TERT-specific CD4 Th1 responses in patients whose tumors are sensitive to CT is correlated to a higher OS. These results provided an innovative method to monitor antitumor CD4 immunity in cancer patients and emphasized the potential relationship between CT regimen and antitumor immune responses in NSCLC.

Discussion

CD4 helper T cells play a major role in the generation and maintenance of effective antitumor immune responses (36). In this study, we characterized CD4 T-cell responses against novel pan HLA-DR-restricted epitopes derived from TERT and referred as UCP. The UCP-specific CD4 T-cell clones have generated a high avidity and are Th1 polarized. We found that IFN- γ producing CD4 T-cell responses against UCPs are naturally present in advanced NSCLC patients. The presence of this anti-TERT Th1 immunity increased the survival in the group of patients that achieved disease control after CT. By contrast, the antiviral responses measured at the same time had no effect on survival (data not shown). Thus, our results showed for the first time to our knowledge an association between spontaneous TERT-specific CD4 T immunity and CT response in lung cancer.

There are several distinct mechanisms through which conventional CT modifies the interactions between tumor and immunologic environment (15). Through their action on cancer cells, chemotherapeutics can restore or enhance the expression of tumor antigens, making them more recognizable by the immune system (37, 38). The pioneering works from L. Zitvogel and G. Kroemer highlighted the capacity of some CT drug, such as anthracyclines and oxaliplatin, to induce immunogenic cell death resulting in activation of DC and priming of antitumor immune response (39). These drugs have the particular ability to facilitate the engulfment of the tumor cell by DCs through mechanism involving the chaperone calreticulin, HMGB1 or ATP pathway (40). However, little is known about the relationship between specific CD4 Th1 immunity and efficacy of CT in cancer patients. Nevertheless our results can be compared with those having shown the presence of leukemia-specific CD4⁺ T cells in patients bearing chronic myelogenous leukemia and successfully treated with imatinib (17). Other reports also showed that antibody titers against antiphospholipids were associated with prolonged survival after retinoic acid treatment in promyelocytic leukemia (41). Although we have not studied the UCP-specific T-cell response after CT, we can speculate that, in responding NSCLC patients, the tumor lysis induced by CT releases TERT molecules that are available for antigen presenting cell

Figure 3. Naturally occurring UCPs specific response in metastatic NSCLC patients. **A**, spontaneous UCP-specific T-cell responses were assessed in 84 NSCLC patients and 22 healthy donors as control. After short time stimulation (one week) with a mixture of the 4 UCPs, the presence of specific T cells was detected using IFN- γ ELISPOT assay. The results represented specific IFN- γ spots after subtraction of background. Responses were positive when IFN- γ spots were more than 10 and more than 2-fold the background. **B**, frequency of individual UCP-specific T-cell responses in 12 NSCLC patients was shown. **C**, illustration of UCPs versus viral specific immune responses in 8 NSCLC patients after one week *in vitro* stimulation. **D**, baseline neutrophils on lymphocytes ratio (NLR) and CD4⁺ Foxp3⁺ T-cell frequency in patients according to the UCP-specific immune status.



uptake and presentation of UCP to memory CD4 T cells. By contrast, when CT was ineffective, tumor lysis was low and consequently TERT antigen release was less available for the activation of the UCP-specific CD4 T naturally present *in vivo*. This would explain the lack of impact of UCP-specific immune response observed in patients with PD after CT. Ongoing monitoring of the UCP-specific immunity before and after CT would confirm the amplification of this immune response in patients that successfully respond to chemotherapeutic agents. Additional mechanisms exist through which chemotherapeutics increase the susceptibility of tumor cells to immune attack. DNA damaging agents may activate oncogene-based pathways that result in the upregulation of Fas or other death receptors such as the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor (42), which can increase the susceptibility of tumor cells to lysis by immune effectors such as CD4 Th1 cells expressing CD95 ligand or TRAIL (5). The expression Fas/CD95 ligand and TRAIL on UCP-specific T cells was not evaluated in this study and need future investigations. Chemotherapeutic drugs have also direct effects on the immune system

that may contribute to an improved anticancer immunity. For example, low metronomic doses of cyclophosphamide or paclitaxel deplete and/or inhibit Tregs that have immunosuppressive properties (43). We reported recently a progressive reduction in Foxp3⁺ Treg after sunitinib therapy (44). In this study, Tregs levels at baseline cannot explain the difference observed as both patients with control or PD have similar rate of circulating Treg cells. In addition, no difference was shown in the two groups with regard to the plasmatic level of IL 10, an immunosuppressive cytokine. According to the all aforementioned above, our results in advanced NSCLC patients suggest that patients responding to CT enter this positive circle and could benefit natural antitumor immune response targeting TERT. To address more precisely the cross-talk between UCP-specific CD4 T cells and CT, it would be interesting to evaluate the TERT-specific responses before and after CT. This purpose will be evaluated in future study.

They also support the synergy between CT and therapeutic vaccination targeting TERT that has been recently reported in lung cancer (25, 45).

Table 2. Baseline clinical characteristic of patient

Characteristics	Global	Spontaneous UCP-specific CD4 T-cell responses		p
		Positive	Negative	
All patients no.	55	22 (40)	33 (60)	n.s.
Age (y) median no. (%)	29	13 (45)	16 (55)	n.s.
<65	26	9 (35)	17 (65)	n.s.
≥65				
Sex no. (%)	37	15 (41)	22 (59)	n.s.
Male	18	7 (39)	11 (61)	n.s.
Female				
Smoking status no. (%)	45	17 (38)	28 (62)	n.s.
Current or former smoker	10	5 (50)	5 (50)	n.s.
Never smoker				
ECOG PS no. (%)	2	1 (50)	1 (50)	n.s.
0	25	10 (40)	15 (60)	n.s.
1	28	11 (39)	17 (61)	n.s.
2				
Histologic subtype no. (%)	38	19 (50)	19 (50)	n.s.
Adenocarcinoma (ADK)	13	1 (8)	12 (92)	n.s.
Squamous cell carcinoma	4	2 (50)	2 (50)	n.s.
Other				
Chemotherapy (%)	49	19 (39)	30 (61)	n.s.
Platinum doublet	6	3 (50)	3 (50)	n.s.
Erlotinib				

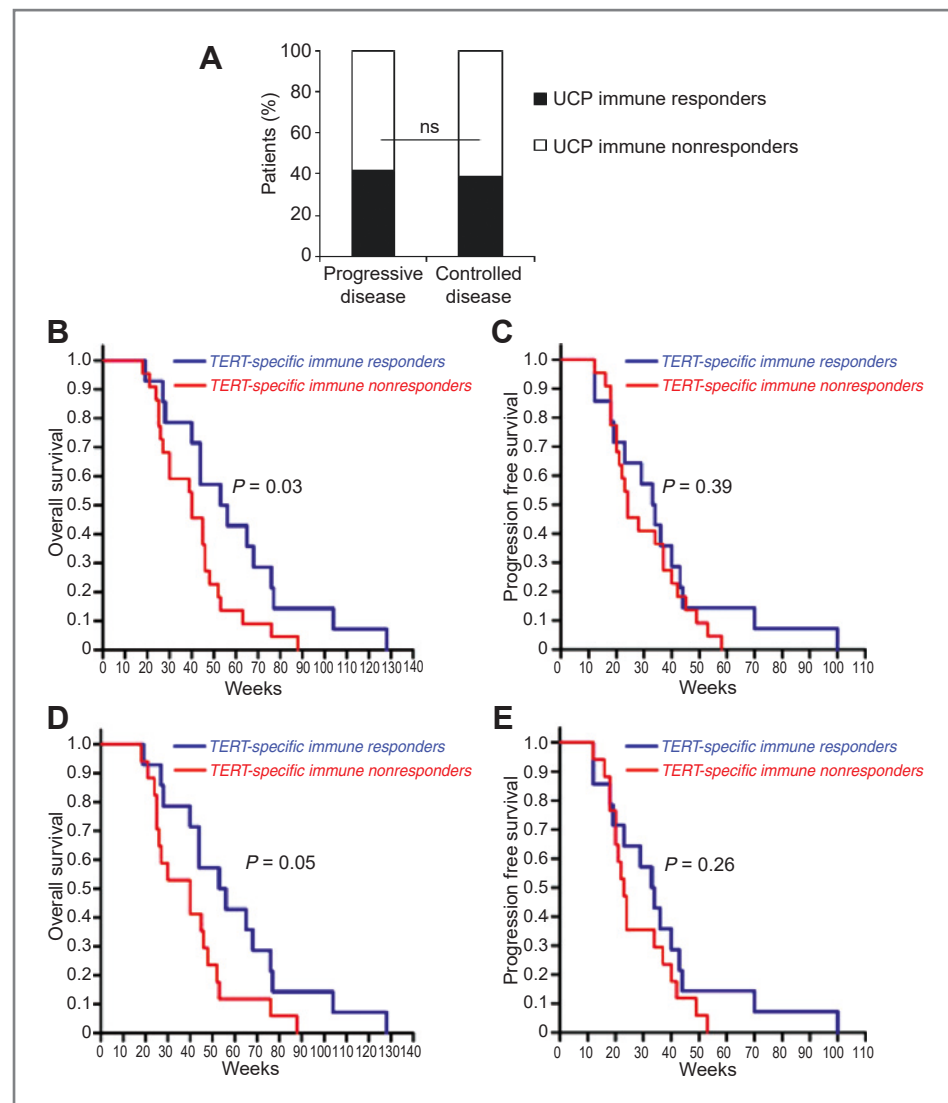
NOTE: Spontaneous UCP-specific T-cell responses measured by standardized IFN- γ ELISPOT assay as detailed in Material and Method section. ECOG indicate Eastern Cooperative Oncology Group.

For technical reasons, there are very few studies that address the frequency of tumor-specific effector or memory T cells or antibody titers before and after CT. During the past years, different groups have focused on the identification of CD4 T-cell epitopes from TAA that could be used to improve anticancer immunotherapy and for the monitoring of anti-tumor CD4 T-cell responses (18). This study illustrates the potential of TERT-derived UCPs for a dynamic monitoring of tumor-specific CD4 T-cell responses in cancer patients. It also underlines the importance of tumor antigen selected to monitor the tumor-specific immune responses in cancer patients. It also underlines the importance of tumor antigen selected to monitor the tumor-specific immune responses in cancer patients. On this view TERT present several advantages: (i) it is expressed in most human cancers, (ii) its oncogenic role is essential for cell immortality and tumor growth and this prevents the antigenic loss tumor escape mechanism, (iii) its constitutively high expression in cancer cells and cancer stem cells, and (iv) its immunogenicity (22, 24). Schroers and colleagues have first reported 2 TERT-derived promiscuous HLA-DR-restricted peptides hTERT672 and hTERT766 (46, 47). However, the capacity of these 2 peptides to bind several HLA-DR alleles was not evaluated using binding assay and the presence in cancer patients of spontaneous CD4 T-cell

response against these peptides was not clearly studied. Another promiscuous TERT-derived CD4 epitope called GV1001 was reported by Gaudernack and colleagues (48). This peptide has been used in clinical trials with encouraging results when combining to CT in melanoma and NSCLC (25, 26). Nevertheless, the impact of spontaneous GV1001-specific immune response on vaccination efficiency and clinical outcome has not been investigated yet. Note that in our cohort the present GV1001-specific immune response was less frequent than UCP's (data not shown).

In this article, we report widely promiscuous HLA-DR TERT-derived peptides recognized by CD4 T cells, and naturally occurring CD4 T-cell responses against these peptides were found in advanced NSCLC patients before treatment. Interestingly, this TERT-specific, DR-restricted T-cell response positively impact OS in CT responding patients. In a complementary study, the spontaneous T-cell response against UCPs was confirmed in other malignancies such as colon cancer, leukemia, and renal carcinoma, and the helper role of UCP-based antitumor vaccine was also established in a HLA-DR1*0101/HLA-A2 transgenic mice (Dosset and colleagues; manuscript in preparation). Taken together, this study identified UCP that should be used as a powerful tool to evaluate the

Figure 4. Impact of spontaneous UCPs CD4 T-cell response in metastatic NSCLC patients. A, UCPs responder and nonresponder frequencies in patients with PD or CD. B, Kaplan–Meier estimates of OS and (C) PFS of CD patients. D, OS and (E) PFS of CD patients treated with platinum-based first-line CT.



interplay between conventional anticancer therapy and tumor-specific CD4 T-cell responses. These findings also indicate that targeting TERT with promiscuous immunogenic CD4 T epitopes is of particular interest for cancer vaccine.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

P. Langlade-Demoyen is a Member of Advisory Board, INVECTYS Co. (current patent holder for UCPs). The other authors disclosed no potential conflicts of interest.

Authors' Contributions

Conception and design: Y. Godet, E. Fabre, F. Le Pimpec-Barthes, E. Tartour, O. Adotévi

Development of methodology: Y. Godet, M. Dosset, E. Levionnois, B. Gaugler, O. Adotévi

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): Y. Godet, E. Fabre, M. Dosset, E. Levionnois, N. Benhamouda, A. Cazes, B. Maillere, O. Adotévi

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): Y. Godet, M. Dosset, M. Lamuraglia, P. Ravel, O. Adotévi

Writing, review, and/or revision of the manuscript: Y. Godet, M. Dosset, M. Lamuraglia, P. Langlade-Demoyen, X. Pivot, P. Saas, B. Maillere, E. Tartour, C. Borg, O. Adotévi

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): E. Fabre, E. Levionnois, N. Benhamouda, C. Borg, O. Adotévi

Study supervision: E. Fabre, F. Le Pimpec-Barthes, P. Langlade-Demoyen, X. Pivot, E. Tartour, O. Adotévi

Acknowledgments

The authors thank the Center d'investigation Clinique en Biothérapie (CIC-BT506) and the PRB-HEGP for their technical support.

Grant Support

This work was supported by Ligue contre le Cancer, Institut National du Cancer (INCA).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received December 10, 2011; revised February 19, 2012; accepted February 23, 2012; published OnlineFirst March 8, 2012.

References

- Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2010;363:411–22.
- Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, M D JW, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011;364:2517–26.
- Bevan MJ. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol* 2004;4:595–602.
- Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 2003;300:337–9.
- Kennedy R, Celis E. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev* 2008;222:129–44.
- Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, Chan WF, Anderson CC, Lantz O, et al. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood* 2007;109:5346–54.
- Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 2001;97:192–7.
- Bos R, Sherman LA. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res* 2010;70:8368–77.
- Nakanishi Y, Lu B, Gerard C, Iwasaki A. CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. *Nature* 2009;462:510–3.
- Rakhra K, Bachireddy P, Zabuawala T, Zeiser R, Xu L, Kopelman A, et al. CD4(+) T cells contribute to the remodeling of the microenvironment required for sustained tumor regression upon oncogene inactivation. *Cancer Cell* 2010;18:485–98.
- Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 2011;71:1263–71.
- Fridman WH, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Cremer I, Fisson S, Damotte D, et al. Immune infiltration in human cancer: prognostic significance and disease control. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011;344:1–24.
- Suzuki K, Kachala SS, Kadota K, Shen R, Mo Q, Beer DG, et al. Prognostic immune markers in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:5247–56.
- Fridman WH, Galon J, Pages F, Tartour E, Sautes-Fridman C, Kroemer G. Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res* 2011;71:5601–5.
- Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:151–60.
- Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 2008;8:59–73.
- Chen CI, Maecker HT, Lee PP. Development and dynamics of robust T-cell responses to CML under imatinib treatment. *Blood* 2008;111:5342–9.
- Kobayashi H, Celis E. Peptide epitope identification for tumor-reactive CD4 T cells. *Curr Opin Immunol* 2008;20:221–7.
- Campi G, Crosti M, Consogno G, Facchinetti V, Conti-Fine BM, Longhi R, et al. CD4(+) T cells from healthy subjects and colon cancer patients recognize a carcinoembryonic antigen-specific immunodominant epitope. *Cancer Res* 2003;63:8481–6.
- Kobayashi H, Wood M, Song Y, Appella E, Celis E. Defining promiscuous MHC class II helper T-cell epitopes for the HER2/neu tumor antigen. *Cancer Res* 2000;60:5228–36.
- Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2008;8:167–79.
- Martinez P, Blasco MA. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat Rev Cancer* 2011;11:161–76.
- Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 2010;31:9–18.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–74.
- Brunsvig PF, Kyte JA, Kersten C, Sundström S, Møller M, Nyakas M, et al. Telomerase peptide vaccination in NSCLC: a phase II trial in stage III patients vaccinated after chemoradiotherapy and an 8-year update on a phase I/II trial. *Clin Cancer Res* 2011;17:6847–57.
- Kyte JA, Gaudernack G, Dueland S, Trachsel S, Julsrud L, Aamdal S. Telomerase peptide vaccination combined with temozolomide: a clinical trial in stage IV melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2011;17:4568–80.
- Wang XF, Kerzerho J, Adotevi O, Nuytens H, Badoual C, Munier G, et al. Comprehensive analysis of HLA-DR- and HLA-DP4-restricted CD4+ T cell response specific for the tumor-shared antigen survivin in healthy donors and cancer patients. *J Immunol* 2008;181:431–9.
- Adotévi O, Mollier K, Neuveut C, Cardinaud S, Boulanger E, Mignen B, et al. Immunogenic HLA-B*0702-restricted epitopes derived from human telomerase reverse transcriptase that elicit antitumor cytotoxic T-cell responses. *Clin Cancer Res* 2006;12:3158–67.
- Godet Y, Desfrancçois J, Vignard V, Schandendorf D, Khammari A, Dreno B, et al. Frequent occurrence of high affinity T cells against MELOE-1 makes this antigen an attractive target for melanoma immunotherapy. *Eur J Immunol* 2010;40:1786–94.
- Bercovici N, Haicheur N, Massicard S, Vernel-Pauillac F, Adotevi O, Landais D, et al. Analysis and characterization of antitumor T-cell response after administration of dendritic cells loaded with allogeneic tumor lysate to metastatic melanoma patients. *J Immunother* 2008;31:101–12.
- Iyer JG, Afanasiev OK, McClurkin C, Paulson K, Nagase K, Jing L, et al. Merkel cell polyomavirus-specific CD8+ and CD4+ T-cell responses identified in Merkel cell carcinomas and blood. *Clin Cancer Res* 2011;17:6671–80.
- Barth RJ Jr, Fisher DA, Wallace PK, Channon JY, Noelle RJ, Gui J, et al. A randomized trial of ex vivo CD40L activation of a dendritic cell vaccine in colorectal cancer patients: tumor-specific immune responses are associated with improved survival. *Clin Cancer Res* 2010;16:5548–56.
- Pajot A, Michel ML, Fazilleau N, Pancré V, Aurault C, Ojcius DM, et al. A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1-/HLA-DR1-transgenic H-2 class I-/class II-knockout mice. *Eur J Immunol* 2004;34:3060–9.
- Lantuejoul S, Salon C, Soria JC, Brambilla E. Telomerase expression in lung preneoplasia and neoplasia. *Int J Cancer* 2007;120:1835–41.
- Rafnar T, Sulem P, Stacey SN, Geller F, Gudmundsson J, Sigurdsson A, et al. Sequence variants at the TERT-CLPTM1L locus associate with many cancer types. *Nat Genet* 2009;41:221–7.
- Müller-Hermelink N, Braumüller H, Pichler B, Wieder T, Mailhammer R, Schaak K, et al. TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell* 2008;13:507–18.
- Boni A, Cogdill AP, Dang P, Udayakumar D, Njauw CN, Sloss CM, et al. Selective BRAFV600E inhibition enhances T-cell recognition of melanoma without affecting lymphocyte function. *Cancer Res* 2010;70:5213–9.
- Kono M, Dunn IS, Durda PJ, Butera D, Rose LB, Haggerty TJ, et al. Role of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the regulation of human melanocytic antigen expression. *Mol Cancer Res* 2006;4:779–92.
- Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, Kepp O, Martins I, Ghiringhelli F, et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* 2010;29:482–91.
- Aymeric L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Martins I, Kroemer G, et al. Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Res* 2010;70:855–8.
- Robin M, Andreu-Gallien J, Schlageter MH, Bengoufa D, Guillemot I, Pokorna K, et al. Frequent antibody production against RARalpha in both APL mice and patients. *Blood* 2006;108:1972–4.
- Kondo K, Yamasaki S, Sugie T, Teratani N, Kan T, Imamura M, et al. Cisplatin-dependent upregulation of death receptors 4 and 5 augments induction of apoptosis by TNF-related apoptosis-inducing ligand against esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2006;118:230–42.
- Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor

- immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 2004;34:336–44.
44. Adotevi O, Pere H, Ravel P, Haicheur N, Badoual C, Merillon N, et al. A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. *J Immunother* 2010;33:991–8.
45. Quoix E, Ramlau R, Westeel V, Papai Z, Madroszyk A, Riviere A, et al. Therapeutic vaccination with TG4010 and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a controlled phase 2B trial. *Lancet Oncol* 2011;12:1125–33.
46. Schroers R, Huang XF, Hammer J, Zhang J, Chen SY. Identification of HLA DR7-restricted epitopes from human telomerase reverse transcriptase recognized by CD4+ T-helper cells. *Cancer Res* 2002;62:2600–5.
47. Schroers R, Shen L, Rollins L, Rooney CM, Slawin K, Sonderstrup G, et al. Human telomerase reverse transcriptase-specific T-helper responses induced by promiscuous major histocompatibility complex class II-restricted epitopes. *Clin Cancer Res* 2003;9:4743–55.
48. Shaw VE, Naisbitt DJ, Costello E, Greenhalf W, Park BK, Neoptolemos JP, et al. Current status of GV1001 and other telomerase vaccination strategies in the treatment of cancer. *Expert Rev Vaccines* 2010;9:1007–16.

Is preexisting antitumor CD4 T cell response indispensable for the chemotherapy induced immune regression of cancer?

Yann Godet,^{1,2,3} Magalie Dosset,^{1,2,3} Christophe Borg^{1,2,3,4} and Olivier Adotevi^{1,2,3,4,*}

¹INSERM; Unité Mixte de Recherche; Besançon, France; ²Etablissement Français du Sang de Bourgogne Franche-Comté; Besançon, France; ³Université de Franche-Comté; Besançon, France; ⁴CHRU de Besançon, Service d'Oncologie; Besançon, France

Keywords: telomerase, immunomonitoring, models of immunochemotherapy and immunoradiotherapy, new targets

Insights into antitumor T-cell responses may help the development of more efficient treatments for lung cancer. The interplay between preexisting antitumor CD4⁺ T-cell responses and platinum-based chemotherapy is crucial to improve patient survival. Accumulating evidence confirms that selecting cancer patients in whom chemotherapy can activate an anticancer immune response would largely improve the success of novel therapeutic approaches.

According to the cancer immunoediting hypothesis, tumor cells—at least initially—are immunogenic and the adaptive immune system is involved in their active elimination.¹ Among the immune cells that participate in this process, CD4⁺ helper T cells seem to play a major role in the generation and maintenance of effective antitumor immunity.² Thus, in humans, a high density of tumor-infiltrating Th1 cells has been shown to constitute a good prognostic marker in several cancers.³ Pioneering work from Laurence Zitvogel and Guido Kroemer highlighted the capacity of some chemotherapy drugs to modulate antitumor immunity.⁴ Understanding how the efficiency of chemotherapy is influenced by its effects on the immune system is one of the most challenging questions for tumor immunology. However, the impact of preexisting tumor-specific Th1 responses on the therapeutic potential of anticancer drugs has been poorly studied, mostly due to technical reasons.

In a recent study, we used newly identified pan-HLA-DR-derived epitopes from the human telomerase reverse transcriptase (TERT), which we called universal cancer peptides (UCP), to monitor tumor-specific CD4⁺ Th1 cell responses. These UCPs could be recognized by CD4⁺ T cells isolated from different

types of cancer.⁵ The naturally occurring UCP-specific CD4⁺ T-cell response was studied in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) patients using an interferon γ (IFN γ)-specific ELISPOT assay.

Among 84 metastatic NSCLC patients prospectively monitored prior to first line platinum-based chemotherapy, we detected spontaneous UCP-specific CD4⁺ Th1 responses in 38% of patients, while no response was found in healthy volunteers ($n = 22$). We then investigated the impact of the presence of UCP-specific CD4⁺ Th1 cells on the clinical outcome, in particular the response to chemotherapy. We demonstrated that the presence of anti-UCP immunity prior to treatment significantly increases the survival of chemotherapy-responding patients, as compared with patients that do not manifest UCP-specific T-cell immunity (median overall survival: 13.25 vs. 10 mo, $p = 0.034$).⁵ On other hand, patients with progressive disease after first line chemotherapy do not benefit from UCP-specific immune responses. Of note, antiviral T-cell responses measured at the same time in the two groups of patients were similar and had no effect on survival, regardless of the response to chemotherapy. In our knowledge, these results demonstrate for the first time a synergistic effect between preexisting tumor-specific

Th1 CD4⁺ T cell responses and chemotherapy in cancer patients.

There are several distinct mechanisms through which some chemotherapeutic agents can modify the interactions between tumor cells and the host immune system.⁶ Through their action on cancer cells, chemotherapeutics can restore or enhance the expression of tumor antigens, making them more easily recognizable by the immune system. Anthracyclines and oxaliplatin have been shown to induce immunogenic cell death, resulting in the priming of antitumor immune responses.⁶ In line with these observations, our data suggest that the tumor cell lysis induced by platinum-based chemotherapy promotes the release of TERT, which is taken up by antigen presenting cells that subsequently amplify preexisting tumor-specific T cells. By contrast, when chemotherapy was ineffective, tumor cell lysis and the consequent release of TERT were insufficient for the amplification of antitumor immune cells (Fig. 1). This would explain why preexisting UCP-specific immune responses did not influence overall survival in patients with chemotherapy-refractory progressive disease. UCP-specific CD4⁺ Th1 responses after first line chemotherapy will be further monitored in NSCLC patients to confirm their persistence or

*Correspondence to: Olivier Adotevi; Email: olivier.adotevi@univ-fcomte.fr

Submitted: 07/14/12; Accepted: 07/17/12

<http://dx.doi.org/10.4161/onci.21513>

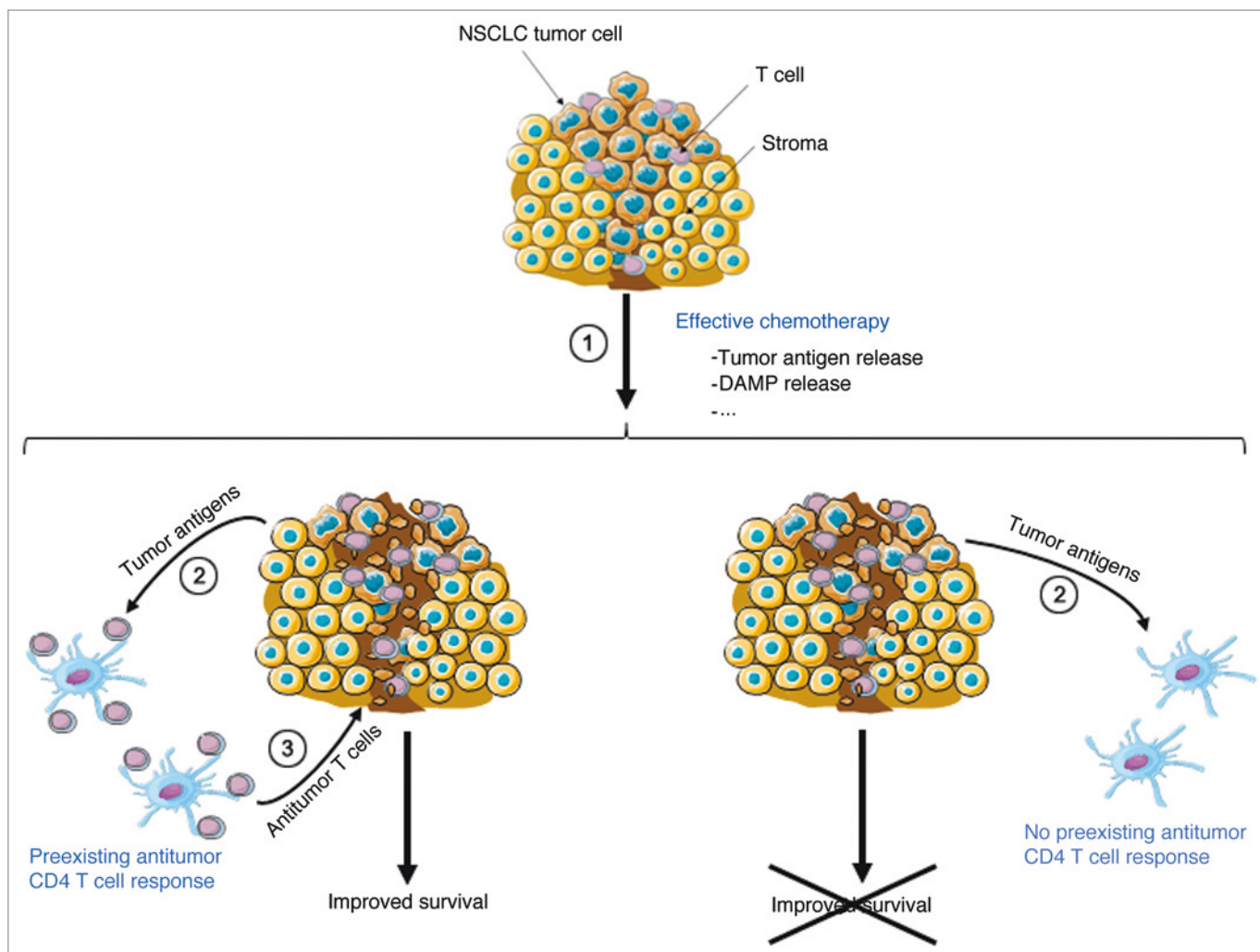


Figure 1. Role of preexisting antitumor CD4⁺ T-cell responses in the chemotherapy-induced immune regression of cancer. (1) Effective chemotherapy induces immunological tumor cell death and tumor antigen release. (2) Tumor antigens are uptaken and processed by dendritic cells. (3) Activation of preexisting tumor-specific CD4 Th1 cells promote an antitumor immunity that acts in synergy with chemotherapy effect.

amplification. In line with our results, Weide et al. have recently reported that the presence of circulating Th1 cells responding to Melan-A or NY-ESO-1 has a strong independent prognostic impact on survival among chemotherapy-treated advanced melanoma patients.⁷ The importance of the interplay between antitumor T cells and conventional anticancer therapy is also supported by the improvement of tumor-specific immune responses observed in patients successfully treated by targeted agents such as imatinib mesylate or vemurafenib (which inhibits c-KIT and BRAF, respectively).^{8,9}

In addition, the implication of antitumor T-cell responses on the clinical outcome of NSCLC patients is supported by the impressive results recently obtained

with the blockade of the PD1 pathway.¹⁰ The use of antibodies that alleviate the inhibition of antitumor T-cell responses clearly require the presence of spontaneous antitumor immunity prior to treatment. Thus, monitoring NSCLC patients for the presence of naturally occurring antitumor T-cell responses will allow for a better selection of patients for anti-PD1 therapy.

Collectively, our results provide a new tool for comprehensive monitoring of antitumor CD4⁺ Th1 responses and support the concept of the immunomodulation of chemotherapy efficacy in cancer patients. Our findings also point to the therapeutic relevance of TERT as a target for immunotherapy. Thus, UCPs may be used to provide compensatory measures to restore or improve anticancer immune responses.

References

- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331:1565-70; PMID:21436444; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1203486>.
- Kennedy R, Celis E. Multiple roles for CD4⁺ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev* 2008; 222:129-44; PMID:18363998; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00616.x>.
- Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:298-306; PMID:22419253; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3245>.
- Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8:151-60; PMID:21364688; <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.223>.
- Godet Y, Fabre E, Dosset M, Lamuraglia M, Leionnois E, Ravel P, et al. Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T-cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes: potential synergistic effect with chemotherapy response. *Clin Cancer Res* 2012; 18:2943-53; PMID:22407833; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3185>.

6. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:59-73; PMID:18097448; <http://dx.doi.org/10.1038/nri2216>.
7. Weide B, Zelba H, Derhovanessian E, Pflugfelder A, Eigentler TK, Di Giacomo AM, et al. Functional T cells targeting NY-ESO-1 or Melan-A are predictive for survival of patients with distant melanoma metastasis. *J Clin Oncol* 2012; 30:1835-41; PMID:22529253; <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2011.40.2271>.
8. Chen CI, Maecker HT, Lee PP. Development and dynamics of robust T-cell responses to CML under imatinib treatment. *Blood* 2008; 111:5342-9; PMID:18326818; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-12-128397>.
9. Hong DS, Vence L, Falchook G, Radvanyi LG, Liu C, Goodman V, et al. BRAF(V600) inhibitor GSK2118436 targeted inhibition of mutant BRAF in cancer patients does not impair overall immune competency. *Clin Cancer Res* 2012; 18:2326-35; PMID:22355009; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2515>.
10. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366:2443-54; PMID:22658127; <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>.

PARTIE 2 : Etude *in vivo* des fonctions helper et antitumorales de nouveaux peptides pan-HLA-DR dérivés de la télomérase

ARTICLE 2 : Universal Cancer Peptide-based therapeutic vaccine breaks tolerance against telomerase and eradicates established tumor.

M Dosset, Y Godet, C Vauchy, L Beziaud, YC Lone, C Sedlik, C Liard, E Levionnois, B Clerc, F Sandoval, E Daguindau, S Wain-Hobson, E Tartour, P Langlade-Demoyen, C Borg, O Adotévi.

But : Après avoir montré la capacité des UCP à stimuler des réponses T CD4 *in vitro*, l'objectif de cette étude était de : i) Vérifier la présence de CD4 T spécifiques d'UCP dans différents types de cancers humains, ii) Etudier *in vivo* l'immunogénécité des UCP, iii) Evaluer le rôle et le mécanisme helper de lymphocytes T CD4 spécifiques de UCP sur les réponses CTL et iv) valider l'intérêt thérapeutique des UCP dans un modèle tumoral préclinique .

Méthode expérimentale : Nous avons utilisé un modèle de souris transgéniques humanisées HLA-A*0201/HLA-DRB1*0101 (souris Tg A2/DR1) pour l'analyse de l'immunogénécité des peptides UCP. L'étude de l'apprêtement *in vivo* des UCP a été réalisée chez des souris immunisées avec un ADN plasmidique codant TERT. L'évaluation des propriétés 'helper' des LT CD4 anti-UCP sur les réponses CTL a été réalisée en immunisant des souris avec un peptide CD8 dérivé d'un antigène tumoral avec ou sans UCP. Un modèle de mélanome B16 exprimant HLA-A*0201 a été utilisé chez les souris Tg A2/DR1 pour évaluer une vaccination thérapeutique avec un UCP.

Résultats :

Compte tenu de l'expression étendue de TERT dans les tumeurs, nous avons étudié la présence de réponses T CD4 spontanées anti-UCP dans différents cancers. Une prolifération accrue et un nombre important de LT CD4 anti-UCP de type-1 ont été retrouvés dans le sang de patients atteints de cancer du colon, rein, prostate ou de leucémies.

En utilisant chez la souris Tg A2/DR1 une vaccination ADN codant hTERT, nous avons montré que les UCP sont efficacement apprêtés et présentés aux LT CD4.

Par ailleurs, l'immunisation de souris Tg A2/DR1 avec les UCP stimule des LT CD4 spécifiques de type Th1 de forte avidité. Nous avons montré que la présence *in vivo* de LT CD4 anti-UCP est nécessaire à l'induction de réponses CTL spécifiques et efficaces. Ainsi chez des souris co-immunisées en présence d'un peptide UCP, nous avons observé un accroissement du nombre et de la qualité fonctionnelle des CTL spécifiques antitumoraux. L'efficacité des réponses CTL est corrélée à la qualité de la réponse T CD4 anti-UCP induite *in vivo* indiquant un rôle 'helper' efficace des UCP.

Après vaccination UCP, l'induction de LT CD4 spécifiques s'accompagne d'une activation des cellules dendritiques. La co-culture *in vitro* de cellules dendritiques immatures en présence de LT CD4 anti-UCP a montré que cet effet activateur passe par un mécanisme impliquant CD40L, l'IFN γ et le GM-CSF.

L'efficacité d'une vaccination thérapeutique comportant un peptide UCP a été évaluée dans un modèle de mélanome transplantable chez les souris Tg A2/DR1. Une régression tumorale complète a été observée chez 63% des souris ayant reçu un vaccin contenant UCP contre 13% dans le groupe contrôle immunisé avec le peptide CD8 seul. Cette amélioration de l'efficacité antitumorale chez les souris ayant reçu un peptide UCP était associée à un meilleur recrutement des CTL dans les tumeurs.

Conclusion : Cette étude a montré que la vaccination avec les UCP stimule des LT CD4 spécifiques qui produisent sélectivement des cytokines Th1. Les LT CD4 spécifiques des UCP exercent des fonctions 'helper' efficaces sur les réponses CTL antitumorales *in vivo*. L'ensemble de nos résultats souligne l'intérêt potentiel de l'utilisation des UCP pour le développement d'immunothérapies antitumorales chez l'homme.

Universal Cancer Peptide-Based Therapeutic Vaccine Breaks Tolerance against Telomerase and Eradicates Established Tumor

Magalie Dosset^{1,2,3}, Yann Godet^{1,2,3}, Charline Vauchy^{1,2,3}, Laurent Beziaud^{1,2,3}, Yu Chun Lone⁵, Christine Sedlik⁶, Christelle Liard⁷, Emeline Levionnois⁸, Bertrand Clerc^{1,2,3}, Federico Sandoval⁸, Etienne Daguindau^{1,2,3}, Simon Wain-Hobson⁷, Eric Tartour⁸, Pierre Langlade-Demoyen⁷, Christophe Borg^{1,2,3,4}, and Olivier Adotévi^{1,2,3,4}

Abstract

Purpose: To evaluate CD4⁺ helper functions and antitumor effect of promiscuous universal cancer peptides (UCP) derived from telomerase reverse transcriptase (TERT).

Experimental Design: To evaluate the widespread immunogenicity of UCPs in humans, spontaneous T-cell responses against UCPs were measured in various types of cancers using T-cell proliferation and ELISPOT assays. The humanized HLA-DRB1*0101/HLA-A*0201 transgenic mice were used to study the CD4⁺ helper effects of UCPs on antitumor CTL responses. UCP-based antitumor therapeutic vaccine was evaluated using HLA-A*0201-positive B16 melanoma that express TERT.

Results: The presence of a high number of UCP-specific CD4⁺ T cells was found in the blood of patients with various types of cancer. These UCP-specific T cells mainly produce IFN- γ and TNF- α . In HLA transgenic mice, UCP vaccinations induced high avidity CD4⁺ T_H1 cells and activated dendritic cells that produced interleukin-12. UCP-based vaccination breaks self-tolerance against TERT and enhances primary and memory CTL responses. Furthermore, the use of UCP strongly improves the efficacy of therapeutic vaccination against established B16-HLA-A*0201 melanoma and promotes tumor infiltration by TERT-specific CD8⁺ T cells.

Conclusions: Our results showed that UCP-based vaccinations strongly stimulate antitumor immune responses and could be used to design efficient immunotherapies in multiple types of cancers. *Clin Cancer Res*; 18(22); 1–12. ©2012 AACR.

Introduction

The introduction of immunotherapy in the clinical cancer practice emphasizes the role of immune responses in cancer prognosis and has led to a growing interest to extend this approach to several human cancers (1). Considerable knowledge has been obtained on the elements that are relevant in antitumor immune responses, hence,

CD8 CTLs have been identified as the most powerful effector cells (2). As a consequence, most previous cancer vaccines target class I MHC-restricted peptides derived from tumor antigens to stimulate CTL responses. However, the clinical impact of CTL peptide-based cancer vaccines remains still modest, even if a recent gp100-derived peptide vaccination was shown to increase patient survival in melanoma (3, 4).

In the meanwhile, CD4 helper T cells have gained interest in antitumor immunity and immunotherapy (5). The concept of CD4⁺ T-cell help initially emerged from studies showing that successful generation of antitumor CTL depends on the presence of CD4⁺ T cells. Adoptive cell transfer with CD4⁺ T cells induces tumor protection or regression, whereas depletion of CD4 T cells inhibits vaccine-induced protective immunity (6–8). CD4⁺ T cells have been thought to play a key role in "helping" antigen-specific CD8⁺ T cells to undergo efficient activation and proliferation (9). In particular, tumor-reactive CD4⁺ T-helper 1 cells (T_H1) produce several cytokines [such as IFN- γ , TNF- α , and interleukin-2 (IL-2)] essential for the induction of cell-mediated immunity against tumors (10). One widely

Authors' Affiliations: ¹INSERM, UMR1098; ²Université de Franche-Comté; ³EFS Bourgogne Franche-Comté; ⁴CHU Besançon, Oncologie médicale, Besançon; ⁵INSERM U1014, Hôpital Paul Brousse Bâtiment INSERM Lavoisier, Villejuif; ⁶Institut Curie, Département de Transfert, INSERM U932; ⁷Invectys, Institut Pasteur Biotop; and ⁸INSERM U970 PARCC, Université Paris Descartes, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d'Immunologie Biologique, (AP-HP), Paris, France

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Olivier Adotévi, INSERM, UMR1098, 1 Boulevard A Fleming BP 1937, Besançon cedex, F-25020, Besançon, France. Phone: 33-381-615-615; Fax: 33-381-615-617; E-mail: olivier.adotevi@univ-fcomte.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0896

©2012 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

The stimulation of CD4⁺ T-helper cell responses has gained considerable interest for cancer immunotherapy. This article reports a systematic analysis of CD4⁺ T-helper cell functions in response to universal cancer peptides (UCP), novel promiscuous HLA-DR-restricted, and TERT-derived peptides. Using a relevant preclinical HLA transgenic mouse model, we showed that UCP-specific CD4⁺ T cells induced after vaccination fulfilled helper features necessary to generate antitumor immune responses. UCP-based vaccinations break self-tolerance against TERT and greatly increase primary and memory CTL responses. Furthermore, the use of UCPs in therapeutic vaccination eradicates established mouse melanoma by promoting massive TERT-specific CD8⁺ T-cell recruitment at the tumor site. Together with the presence of natural UCP-specific T-cell responses in many human cancers, these results support that the stimulation of UCP-specific CD4⁺ helper T cells is a powerful method to improve the efficiency of cancer vaccines.

accepted model shows the ability of CD4⁺ T cells to license dendritic cells (DC) for efficient CD8⁺ T-cell priming through the interaction of costimulatory receptors (11, 12). The cytokines secreted by CD4⁺ T_H1 cells also exert direct antitumor and antiangiogenic effects (13). More importantly, only tumor-reactive CD4⁺ T cells have been found to ensure efficient effector CTL recruitment at the tumor site (14). In human cancers, a high density of tumor-infiltrating CD4⁺ T_H1 cells has been shown as a good prognostic marker in patients with colorectal cancer emphasizing the role of these cells in cancer immunosurveillance (15). Altogether, these results underline the growing interest in stimulating tumor-specific CD4⁺ T_H1 cells for anti-tumor immunotherapy.

As a result, increasing attention has focused on identifying MHC class II epitopes from tumor antigens to actively target antitumor CD4⁺ T cells *in vivo* (16). However, the CD4⁺ helper T-cell subpopulation is known to be plastic (17, 18). Thus, the choice of tumor-reactive CD4 epitopes should require special caution to prevent the induction of detrimental CD4⁺ T-cell responses.

Recently, we characterized potent immunogenic CD4 epitopes referred as universal cancer peptides (UCP) derived from telomerase reverse transcriptase (TERT; ref. 19). TERT expression has been detected in all studied cancer forms including stem cell-like tumor cells (20, 21). Thus TERT has emerged as a clinically relevant tumor antigen for cancer vaccines (22). These TERT-derived UCPs effectively bind to the most commonly found HLA-DR alleles (19).

In the present study, we found naturally occurring CD4⁺ T-cell responses against UCPs in patients with various types of cancers. We then evaluated the potential of UCP for active immunotherapy in a preclinical tumor

model. By using the humanized HLA-DRB1*0101/HLA-A*0201 transgenic mice, we found that UCP vaccinations stimulate CD4⁺ T_H1 cells that drastically improved anti-tumor CTL responses *in vivo*. Subsequently, UCP-based therapeutic vaccine was shown to inhibit tumor growth by mechanisms that involve CD8⁺ T cells.

Materials and Methods

Synthetic peptides

The 4 peptides derived from TERT called UCPs: UCP1 (TERT_{44–58}: PAAFRALVAQCLVCV), UCP2 (TERT_{578–592}: KSVWSKLQSIGIRQH), UCP3 (TERT_{916–930}: GTAFVQM-PAHGLFPW), and UCP4 (TERT_{1041–1055}: SLCYSILKA-KNAGMS) have been described recently (19). The modified (first amino acid substitution with a tyrosine) HLA-A2-restricted pY988 (YLQVNSLQTV) and pY572 (YLFFYRKSV) peptides derived from TERT have been described elsewhere as high-affinity forms of their cryptic counterparts (23, 24). The native forms of these 2 peptides are fully conserved in human and mouse TERT (23, 24). Synthetic peptides (>80% purity) were purchased from Activotec.

Detection of UCP-specific T-cell responses in cancer patients

Blood was collected from patients with cancer at the University Hospital of Besançon (Besançon, France) after informed consent. The study was conducted in accordance with the French laws and after approval by the local ethics committee. Ficoll-isolated lymphocytes were analyzed by ³H-thymidine incorporation as described previously (25). After a short *in vitro* stimulation of lymphocytes with UCPs as previously reported (19), UCP-specific immune responses were analyzed by human ELISPOT assay (GenProbe). Concomitantly, cytokines production was measured after a 15-hour culture with or without UCPs using DIAplex Human Th1/Th2 kit (GenProbe) according to the manufacturer's instructions.

Tumor cell lines and TERT expression analysis

The HLA-A2.1-positive B16F10 murine tumor cell line (referred as B16-A2) was previously described (26). Telomerase detection in cell lines was achieved by Western blot analysis using anti-hTERT monoclonal antibody (clone 2C4; Novus Biologicals), which cross reacts with mouse TERT. FaDu cell line (human head and neck squamous cell carcinoma) and murine fibroblast were used as positive and negative controls, respectively. Telomerase activity was assessed by TRAP-ELISA assay using the TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions.

Mouse and vaccinations

The HLA-DRB1*0101/HLA-A*0201-transgenic mice (A2/DR1 mice) have been previously described (25) and were purchased at the "Cryopreservation, Distribution, Typage et Archivage animal". These mice are H-2 class I and IA class II knockout, and their CD8 T and CD4 T cells are restricted by

the sole HLA-A*0201 and HLA-DR1*0101 molecules, respectively. To study the processing of UCP, 8- to 10-week-old A2/DR1 mice were immunized with a pTrip-TERT DNA (100 µg) at days 0 and 14 as previously reported (26). In some experiments, CD4 T cells were depleted with anti-CD4 monoclonal antibody treatment (clone GK1.5) before DNA immunization. For UCP immunization, mice were injected twice with 100 µg of each UCP emulsified in incomplete Freund adjuvant (IFA, Sigma-Aldrich). In some experiments, 50 µg of pY988 peptide was coinjected with 100 µg of each UCP in IFA. All peptide vaccinations were done subcutaneously in the right abdominal flank. All experiments were carried out according to the good laboratory practices defined by the animal experimentation rules in France.

Pentamer staining and ELISPOT

Ex vivo pentamer staining was conducted as previously described (26, 27). Cells were stained with phycoerythrin (PE)-conjugated pY988 and pY572 HLA-A2.1 pentamer (ProImmune). After cell staining, samples were analyzed by flow cytometry on a FACS Canto II (BD Biosciences) using Diva software. *Ex vivo* ELISPOT was conducted as previously described (26, 27). Briefly, freshly ficoll-purified lymphocytes or spleen-isolated CD8⁺ or CD4⁺ T cells from immunized mice (T cell isolation kit, Miltenyi Biotec) were incubated at 1 or 2 × 10⁵ cells per well (in triplicates) in Elispot IFN-γ or interleukin (IL)-2 plates in presence of the relevant or control peptides. Plates were incubated for 16 to 18 hours at 37°C, and spots were revealed following the manufacturer's instructions (GenProbe). Spot-forming cells were counted using the « C.T.L. Immunospot » system (Cellular Technology Ltd.).

Cytotoxicity assays

The *in vivo* CTL killing assays were conducted using CFSE-labeled target cells (carboxyfluorescein-diacetate succinimide ester, Molecular Probes) as described previously (28). CFSE^{high} splenocytes from naïve mice were pulsed with peptides at 10 µg/mL and nonpulsed CFSE^{low} splenocytes served as control. Equal numbers of each cell fraction (high or low) were injected intravenously into immunized and nonimmunized mice. After 15 hours, cells were recovered from spleen or blood and analyzed by flow cytometry. The specific lysis was calculated as previously described (28). *In vitro* cytotoxicity assay was conducted using a standard ⁵¹chromium-release assay as described previously (26). The cytolytic activity of CTL from immunized mice was tested against TERT-expressing tumor cells.

Dendritic cells generation and activation

Spleen or lymph nodes CD11c⁺ DCs from peptide-immunized mice were directly analyzed for costimulatory receptor expression. In some experiments, bone marrow cells from naïve mice (8.106/mL) were cultured for 6 days in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mmol/L L-glutamine (Sigma-Aldrich), 5 mmol/L sodium

pyruvate (Gibco), and 50 mmol/L 2-mercaptoethanol (Gibco) with 30% conditioned medium from granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing NIH-3T3 (R1 medium). Isolated CD4 T cells from mice immunized with UCP or IFA alone were then cultured for 24 hours in the presence of UCP with immature bone marrow-derived DCs (iDC) from A2/DR1 mice. In some cases, blocking CD40L (MR1) or IFN-γ (XMG1.2) antibodies (20 µg/mL; Bio X Cell) were added to the culture. Cells were then stained for cell surface expression of costimulatory receptors and cytokines production.

Tumor challenge

A2/DR1 mice were subcutaneously injected with 2.10⁵ B16-A2 cells in 100 µL of saline buffer in the abdominal flank. At day 5, groups of mice were immunized with either the mix of pY988 and pY572 peptides (100 µg) with or without UCP2 (100 µg). A boost injection was done at day 17. Control mice were treated with IFA in saline buffer. Tumor growth was monitored every 2 to 3 days using a caliper and mice were euthanized when the tumor mass reached an area of more than 200 mm². The mice survival was assessed using the Kaplan–Meier model. For tumor infiltrative lymphocyte (TIL) analysis, tumor-bearing mice were treated as above and 7 days after the last immunization, tumors were recovered and treated with DNase (Sigma-Aldrich) and collagenase (Roche) before cell suspension analysis by flow cytometry, and antigen specificity of TILs was done *ex vivo* by ELISPOT assay.

Statistics

Data are presented as mean ± SD. Statistical comparison between groups was based on Student *t* test using Prism 4 GraphPad Software. Mouse survival time was estimated using the Kaplan–Meier method and the log-rank test. *P* values less than 0.05 (*) were considered significant.

Results

Presence of naturally occurring UCP-specific CD4⁺ T-cell responses in various human cancers

Recently, we found frequent occurrence of spontaneous UCP-specific CD4⁺ T-cell response in patients with advanced lung cancer (19). On the basis of the broad expression of TERT in cancers, we sought to extend this study in patients of different histologic origins. For this purpose, we measured ³H-thymidine incorporation of blood lymphocytes obtained from patients or healthy donors directly stimulated with UCPs during 6 days. In contrast with healthy donors, blood lymphocytes from patients with cancer specifically proliferate upon UCP stimulation (Fig. 1A). Next, UCP-specific T cells were measured by IFN-γ ELISPOT after short-term *in vitro* stimulation. Accordingly, high number of IFN-γ-producing T cells directed against UCP was found in patients as compared with healthy donors (Fig. 1B). These responses included T cells specific of each UCP, supporting their immunogenicity (Fig. 1C). Furthermore, the UCP-specific T cells mainly produce T_H1 cytokines but not IL-4, IL-10, or IL-17

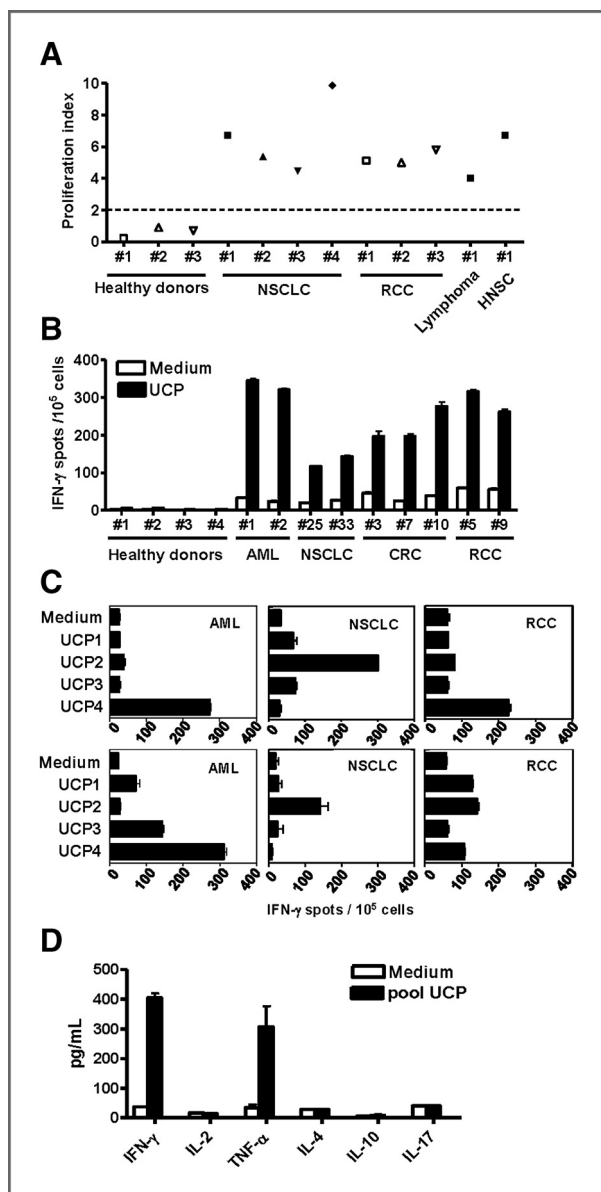


Figure 1. Analysis of spontaneous UCP-specific T-cell responses in humans. **A**, blood lymphocytes from patients with cancer were directly cultured with pool of UCPs during 5 days and specific proliferation was measured by ³H-thymidine incorporation. Representative data from 3 healthy donors and 9 responding patients are shown. Results are considered positive for a proliferation index more than 2. **B–D**, lymphocytes were cultured *in vitro* with pool of UCPs for one week. **B**, detection of UCP-specific T cells by IFN-γ ELISPOT. Representative data from healthy donors and 9 responding patients are shown. Columns, mean of triplicate; bars, SD. **C**, T-cell responses against individual UCP for 6 responding patients. **D**, detection of cytokine production by DIAPlex assay in supernatant after 15 hours of culture in the presence of UCPs. Columns, mean cytokine levels from 3 patients; bars, SD. NSCLC, non-small cell lung cancer; RCC, renal cell carcinoma; HNSC, head and neck squamous cell carcinoma; AML, acute myeloid leukemia; CRC, colorectal carcinoma.

(Fig. 1D). This result was also confirmed by the obvious T_H1 polarization of UCP-specific CD4⁺ T-cell clones isolated from 1 patient with cancer (Supplementary Fig. S1).

Thus, the UCP-specific T-cell repertoire is spontaneously stimulated in various cancers such as colon, kidney, lung, stomach, and leukemia. This also underlined the universal nature of the promiscuous HLA-DR-restricted UCPs.

UCPs are endogenously processed and induce high avidity T_H1-polarized CD4⁺ T-cell responses *in vivo*

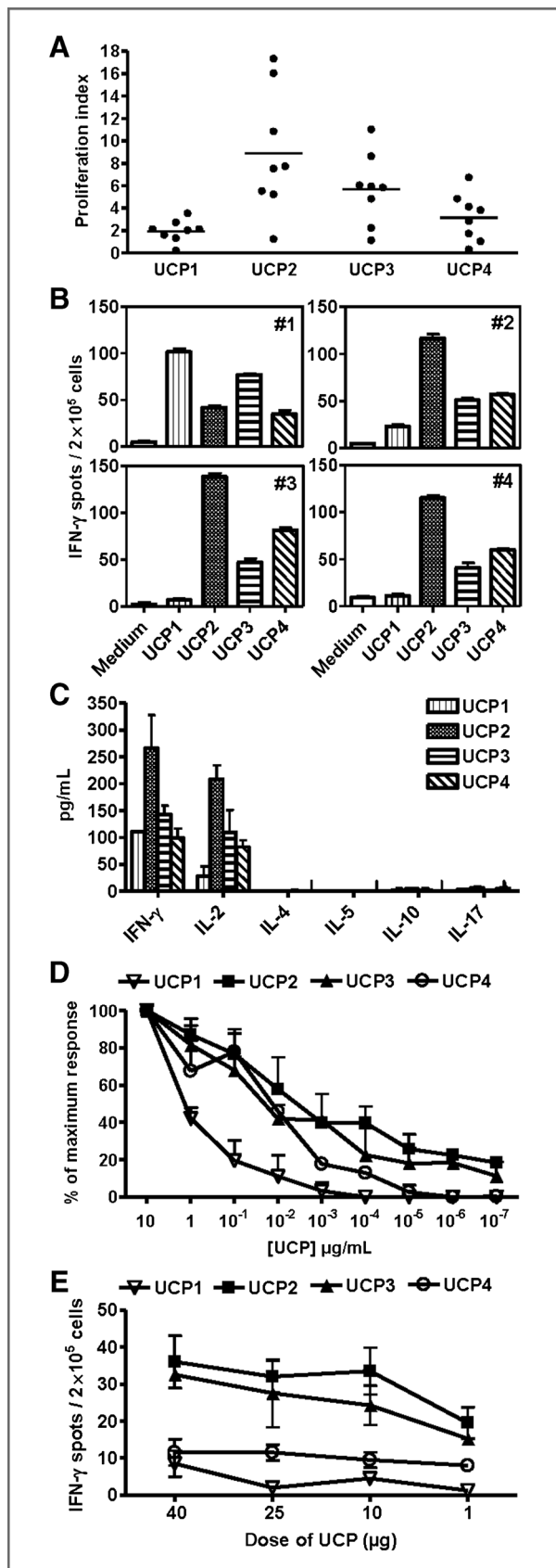
On the basis of the equivalent binding capacity of UCPs to HLA-DRB1*0101 molecules, we then used A2/DR1 mice to study the *in vivo* immunogenicity and natural processing of UCPs. To assess whether UCPs can be endogenously processed from the TERT protein, we conducted immunizations with a plasmid DNA encoding the full length TERT sequence, and the UCP-specific CD4 T-cell proliferation was monitored by a 5-day ³H-thymidine incorporation assay. As shown in Fig. 2A, all the UCPs stimulate proliferation of spleen lymphocytes from DNA-immunized mice. Especially, high T-cell proliferation was measured in response to UCP2 and 3 as compared with UCP1 or UCP4. We confirmed these results by using *ex vivo* IFN-γ ELISPOT assay (Fig. 2B). These data clearly indicate that UCPs are differentially processed and presented to CD4⁺ T cells *in vivo* in the context of DRB1*0101 restriction.

Different populations of CD4⁺ T_H cells control the antitumor immune responses (9), thus, we studied the polarization of the UCP-specific CD4⁺ T-cell responses *in vivo*. To this end, freshly isolated CD4⁺ T cells from UCP-vaccinated mice were cultured in the presence of syngenic iDC pulsed or not with UCP and cytokines production was measured. In all cases, we showed that UCP-specific CD4⁺ T cells produce IFN-γ and IL-2, but not IL-4, IL-5, IL-10, or IL-17, indicating that UCP immunization preferentially induces a T_H1-polarized immune response *in vivo* (Fig. 2C).

Next, to assess the avidity of UCP-specific CD4⁺ T cells, freshly purified CD4⁺ T cells from UCP-immunized mice were cultured in the presence of decreasing concentrations of peptide and the number of specific IFN-γ-producing CD4⁺ T cells was measured. Results in Fig. 2D showed that mice immunized with UCP2 or UCP3 induced high avidity-specific CD4 T cells (< 10⁻⁷ μg/mL). In comparison, CD4⁺ T cells from mice vaccinated with UCP1 or UCP4 responded to 10⁻¹ and 10⁻³ μg/mL of peptide concentration, respectively. In addition, low doses of UCP2 or UCP3 peptides (~1 μg) stimulated potent IFN-γ⁺ CD4⁺ T cells *in vivo* (Fig. 2E). Collectively, these results show that UCPs are efficiently processed *in vivo* and stimulate high avidity T_H1-polarized CD4⁺ T cells in A2/DR1 mice.

UCP-specific CD4⁺ T_H1 cells provide help for optimal anti-self/TERT CD8⁺ T-cell responses *in vivo*

CD4⁺ T-cell helper functions are thought to be important for the generation of potent and sustained CTL responses (29, 30). To address this question concerning UCP-specific CD4⁺ T cells, we coimmunized mice with pY988 an HLA-A2⁺ self/TERT peptide in the presence of UCP. The pY988-specific CTL response was measured *ex vivo* by pentamer staining and ELISPOT assays. As shown in Fig. 3A, a higher



frequency of functional pY988-specific CD8⁺ T cells was detected in mice immunized with pY988 plus UCPS compared with pY988/IFA group. Although UCP1 vaccination had little impact on the frequency of pY988/A2 pentamer⁺ CD8 T cell-specific response, all UCPS were able to significantly increase the number of IFN- γ -secreting CD8⁺ T cells against TERT (Fig. 3B). The magnitude of the pY988-specific CD8⁺ T cells response was strongly correlated with the intensity of UCP-specific CD4 T-cell responses concomitantly induced in mice (Fig. 3C and D). Furthermore, these UCPS exerted similar helper effect on the self/TERT pY572-specific CTL responses *in vivo* (Supplementary Fig. S2). Thus, the addition of UCPS as helper peptides efficiently breaks immune tolerance against TERT *in vivo*.

We next sought out to study the impact of UCPS helper peptides on CTL avidity and memory, 2 critical functions for tumor eradication. To this end we focused on the UCP2 that induces potent T_H1 immune responses *in vivo*. In addition, compared with a HLA-DR1-restricted viral peptides such as Tax-derived peptide (16), UCP2 strongly enhanced CTL responses (Supplementary Fig. S3). As shown in Fig. 4A, freshly isolated CD8⁺ T cells from mice immunized with pY988 + UCP2 were still reactive against very low concentrations of peptide ($<10^{-3}$ μ g/mL). These cells also recognized the cryptic native counterpart p988 (data not shown), underlining their high avidity. Accordingly, mice vaccinated with pY988 + UCP2 displayed stronger *in vivo* cytotoxicity against CFSE-labeled target cells (Fig. 4B) than in pY988/IFA group. In addition, TERT-specific CTLs from mice immunized in the presence of UCP2 exhibit strong *in vitro* cytotoxicity against TERT-expressing B16-A2 cells (Fig. 4C and D).

Furthermore, long-lasting TERT-specific CTL response was detected in mice coinjected with UCP2. This response was correlated to the sustained UCP2-specific CD4⁺ T-cell response *in vivo* (Fig. 4E). Similar helper functions of UCP2 were obtained in other tumor antigen model such as E7 from HPV-16, (Supplementary Fig. S4). By using a second model of DNA immunization, we also showed in mice, depleted or not of CD4⁺ cells, that UCP-specific CD4 T cells are necessary for the induction of TERT-specific CD8 T cells (Supplementary Fig. S4C). Collectively, UCP2 helper immune responses enhance the magnitude and quality of antitumor CTL response.

Figure 2. UCP vaccinations stimulate high avidity T_H1-polarized CD4 T-cell responses. A and B, A2/DR1 mice ($n = 8$) were immunized twice with a DNA encoding TERT. A, proliferation of spleen lymphocytes in the presence of UCPS. B, CD8-depleted spleen lymphocytes from DNA-immunized mice were assayed in *ex vivo* IFN- γ ELISPOT. Columns, mean of triplicate from 4 mice; bars, SD. C and D, mice (3–4/group) were immunized once with each UCP in IFA. C, ten days later, spleen-isolated CD4 T cells were cultured overnight in presence of DC loaded with UCP. The cytokines production was measured in the supernatant by Luminex assay. Columns, mean of cytokine levels; bars, SD. D, isolated CD4 T cells were cultured *ex vivo* with increasing concentrations of peptide as indicated. IFN- γ production was measured by ELISPOT. Curves, mean responses from 3 mice; bars, SD. E, mice were vaccinated once with low dose of UCP as indicated. UCP-specific T-cell responses were evaluated in spleen by *ex vivo* IFN- γ ELISPOT.

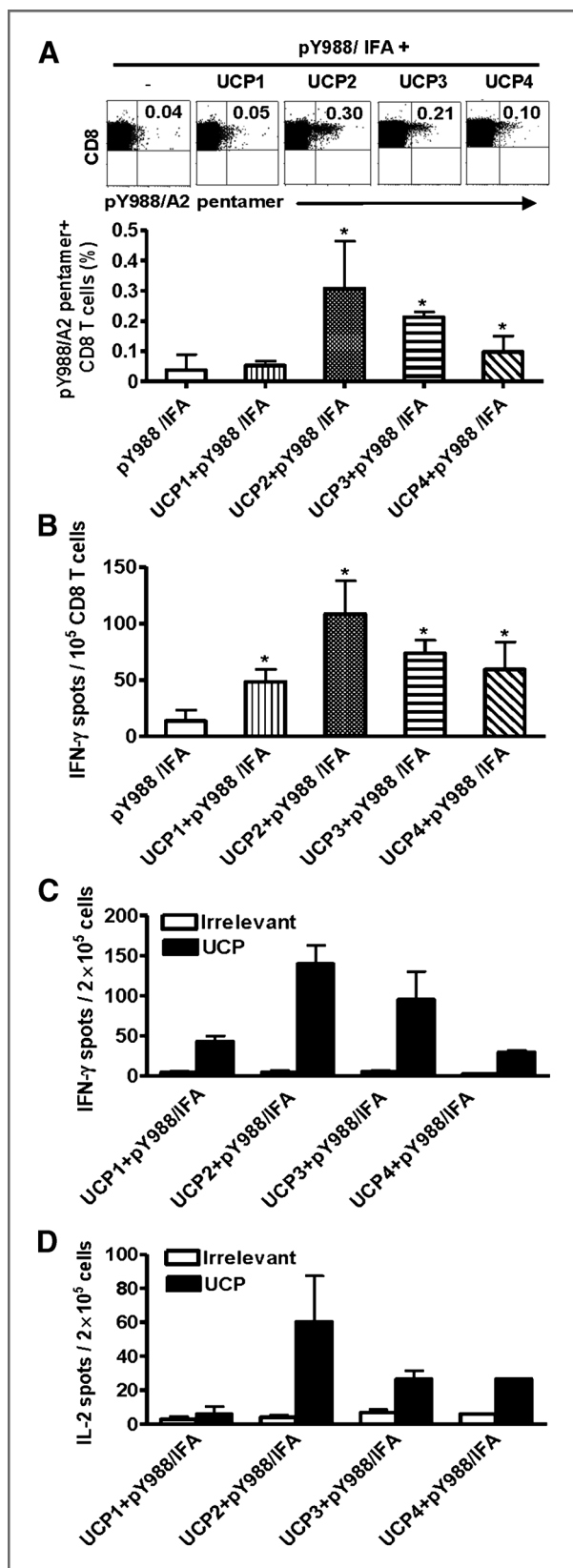


Figure 3. CD4 helper role of UCP vaccinations on the self/TERT-specific CTL responses. Mice (3/group) were immunized either with pY988 plus

UCP-specific CD4⁺ T cells promote DC activation *in vivo*

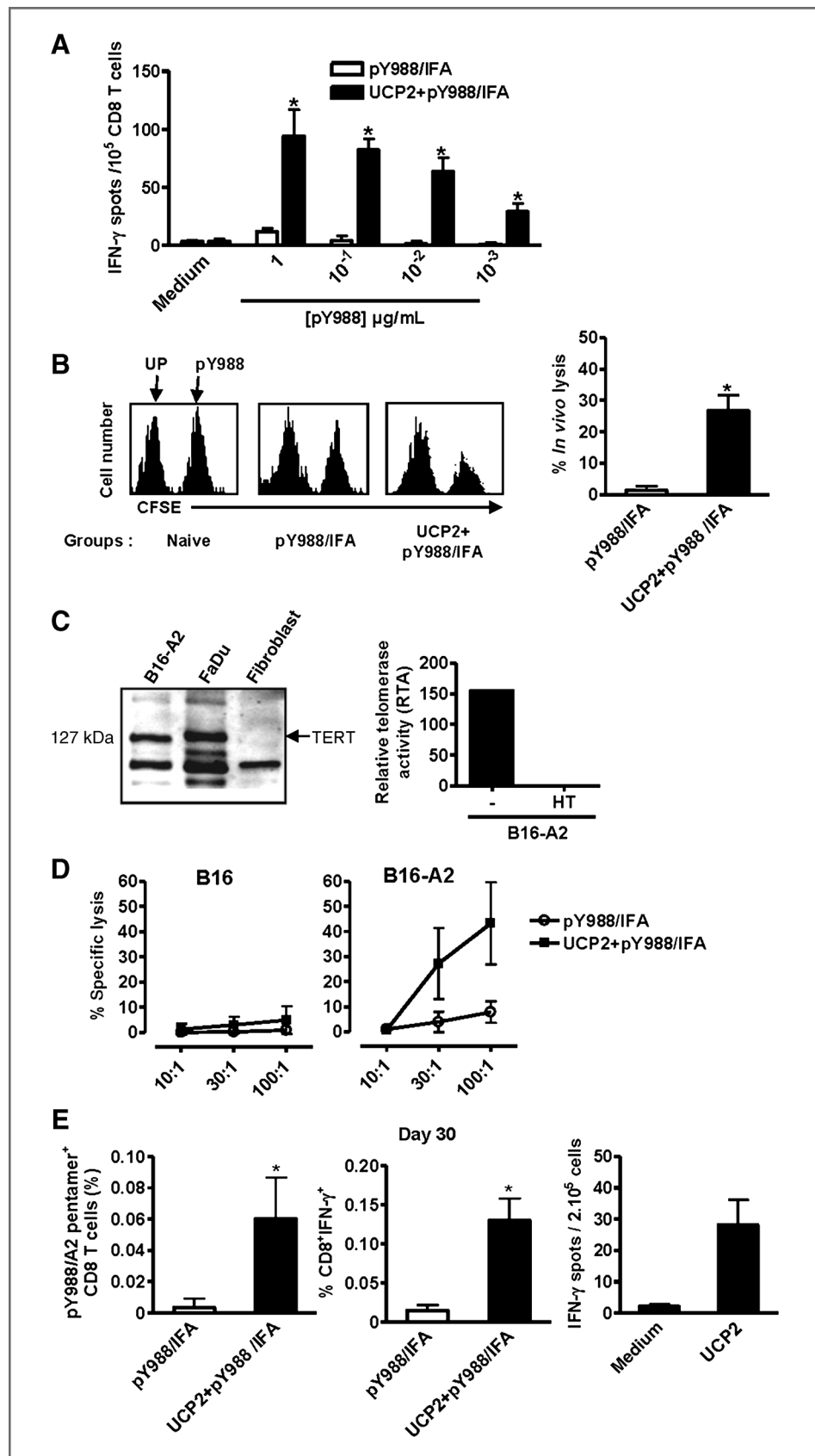
The induction of DC activation represents one major helper mechanism used by CD4⁺ T_H1 cells to sustain antigen presentation and provide costimulatory signals to the CTLs. This is referred as the "ménage à trois" model (31). To test this mechanism, we analyzed the expression of costimulating receptors on DCs from mice immunized with the mix of pY988 $\pm$ UCP2. As shown in Fig. 5A, lymph nodes CD11c⁺ DCs from UCP2-immunized mice expressed higher level of HLA-DR molecules and slight increase of CD86 as compared with control mice. In a second set of experiments, CD4⁺ T cells isolated from UCP2/IFA or IFA-injected mice were cocultured with syngenic iDCs (Fig. 5B). Similar increase of DC activation was found in the presence of UCP2-specific CD4 T cells (Fig. 5C, left). In addition, high rate of CD40L⁺ CD4⁺ T cells were detected in UCP2-immunized mice (Fig. 5C, middle) and significant amounts of T_H1-associated cytokines such as IL-12, IFN- γ , and GM-CSF were found in the supernatant of CD4_{UCP2}/DC coculture (Fig. 5C, right). This DC activation could be partially inhibited by blocking CD40L and/or IFN- γ antibodies (Fig. 5D). Together, these results showed that the stimulation of UCP2-specific CD4⁺ T cells shapes the phenotype and function of DC *in vivo*.

UCP2 helper peptide enhances the efficacy of self/TERT CD8 peptides vaccination against established HLA-A*0201⁺ B16F10 melanoma

To investigate the helper role of UCP2 in a therapeutic vaccination protocol, we used the aggressive and poor immunogenic B16F10-HLA-A*0201 melanoma (B16-A2; ref. 26). Mice were challenged with 2×10^5 B16-A2 cells and tumor bearing mice were then vaccinated twice either with the 2 self/TERT CTL peptides (pY572 + pY988/IFA) alone or in presence of the UCP2. As shown in Fig 6A, the tumor growth reached an area of more than 200 mm² at day 25 in the control group injected with IFA alone. In this representative experiment, tumor regression was observed in 1 of 8 mice vaccinated with pY572 + pY988/IFA, whereas 2 mice achieved a delay in tumor growth. In the group vaccinated with pY988 + pY572/IFA combined with UCP2, complete tumor regression was achieved in 5 of 8 mice. Accordingly, survival analysis out on day 50 after tumor cell injection showed that 63% of mice vaccinated in the presence of UCP2 were still alive as compared with 13% in the group of mice injected with pY988 + pY572/IFA ($P < 0.05$; Fig. 6B).

each UCP in IFA or with pY988/IFA alone and the immune responses were monitored 10 days later in the spleen. A, freshly isolated CD8 T cells were stained with TERT pY988/A2⁺ pentamer. Representative flow cytometry dot plots (top) and mean percentages of pY988/A2⁺ CD8 T cells (bottom) are shown. B, *ex vivo* detection of anti-pY988 CD8 T cells by IFN- γ ELISPOT. C and D, simultaneous UCP-specific CD4 T-cell responses were assessed in CD8-depleted fraction by IFN- γ (C) and IL-2 (D) ELISPOT assays. DR1-restricted Tax₁₉₁₋₂₅₀ was used as irrelevant peptide. Columns, mean of spots from 3 mice; bars, SD. Data are representative of 3 independent experiments.

Figure 4. Immunization in the presence of UCP2 enhances the quality of self pY988-specific CTL responses. Mice (3–4/group) were immunized once either with pY988 plus UCP2 (UCP2 + pY988/IFA) or with pY988/IFA alone. A, ten days later, freshly isolated spleen CD8 T cells were cultured with increasing pY988 peptide concentration and IFN- γ -secreting CD8 T cells were detected by *ex vivo* ELISPOT. B, *in vivo* cytotoxic assay. Representative flow cytometry histograms showing lysis of CFSE-labeled pY988-loaded target cells compared with unpulsed (UP) and the mean of *in vivo* percentage lysis are shown. C, TERT expression by Western blot (left) and activity by TRAP-ELISA assay (right) in B16-A2 melanoma cells. HT, heat-treated cells and –, untreated cells. D, cytotoxicity of T cells against TERT-positive B16 or B16-A2 tumor cells after 5 days of *in vitro* stimulation of splenocytes with pY988. Results represent the specific lysis (percentage) $\pm$ SD in each immunized group of mice. E, long-term T-cell responses were evaluated 30 days after immunization. Frequencies of pY988/A2 pentamer⁺ CD8 T cells gated on CD44^{hi}CD62^{lo} cells (left) and by IFN- γ secretion assay (middle). UCP2-specific CD4 T-cell response measured in CD8-depleted fraction by *ex vivo* IFN- γ ELISPOT (right).



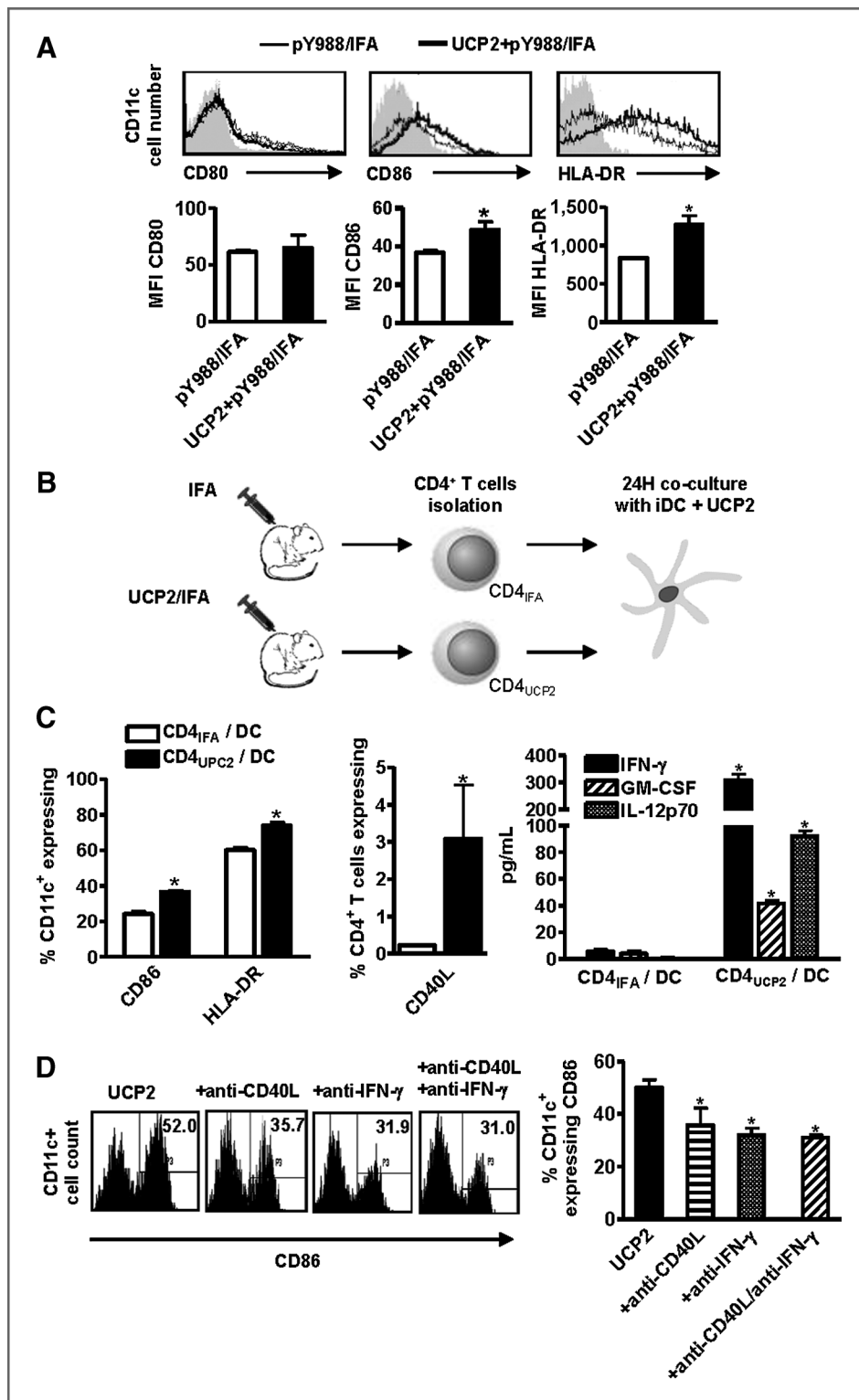


Figure 5. UCP2-specific CD4 T_H1 cells activate dendritic cells. **A**, mice (3/group) were immunized once either with UCP2 + pY988/IFA or pY988/IFA alone. Ten days later, the expression of activation markers CD80, CD86, and HLA-DR were analyzed on lymph nodes CD11c⁺ DC by flow cytometry. Representative flow cytometry histograms (top) and the mean of mean fluorescence intensity (MFI; bottom) are shown. Columns, mean of MFI; bars, SD. **B–E**, analysis of DC and CD4 T cells cross talk. **B**, schema of the *in vitro* DC-CD4 T cell coculture. **C**, expression of CD86 and HLA-DR on CD11c⁺ DC (left). CD40L expression on CD4 T cells (middle). IFN-γ, GM-CSF, and IL-12p70 production measured by ELISA in the supernatant (right). **D**, expression of CD86 on CD11c⁺ DC cocultured with CD4 T cells from UCP2-immunized mice in presence or not of blocking CD40L and/or IFN-γ antibodies. Representative flow cytometry histograms (left) and mean of percentage from 3 mice (right) are shown. Data are representative of 2 independent experiments.

The density of tumor-infiltrating CD8 T cells was shown to be critical for tumor control (32). Therefore, we analyzed immune cell infiltration within tumor in mice treated with the same vaccination protocols. Higher total CD3⁺CD8⁺T-

cell infiltration was observed in mice that received vaccine plus UCP2 helper peptide as compared with pY988 + pY572/IFA group (67% vs 40%, $P < 0.05$; Fig. 6C). In contrast, UCP2 vaccination did not influence CD4⁺ TILs,

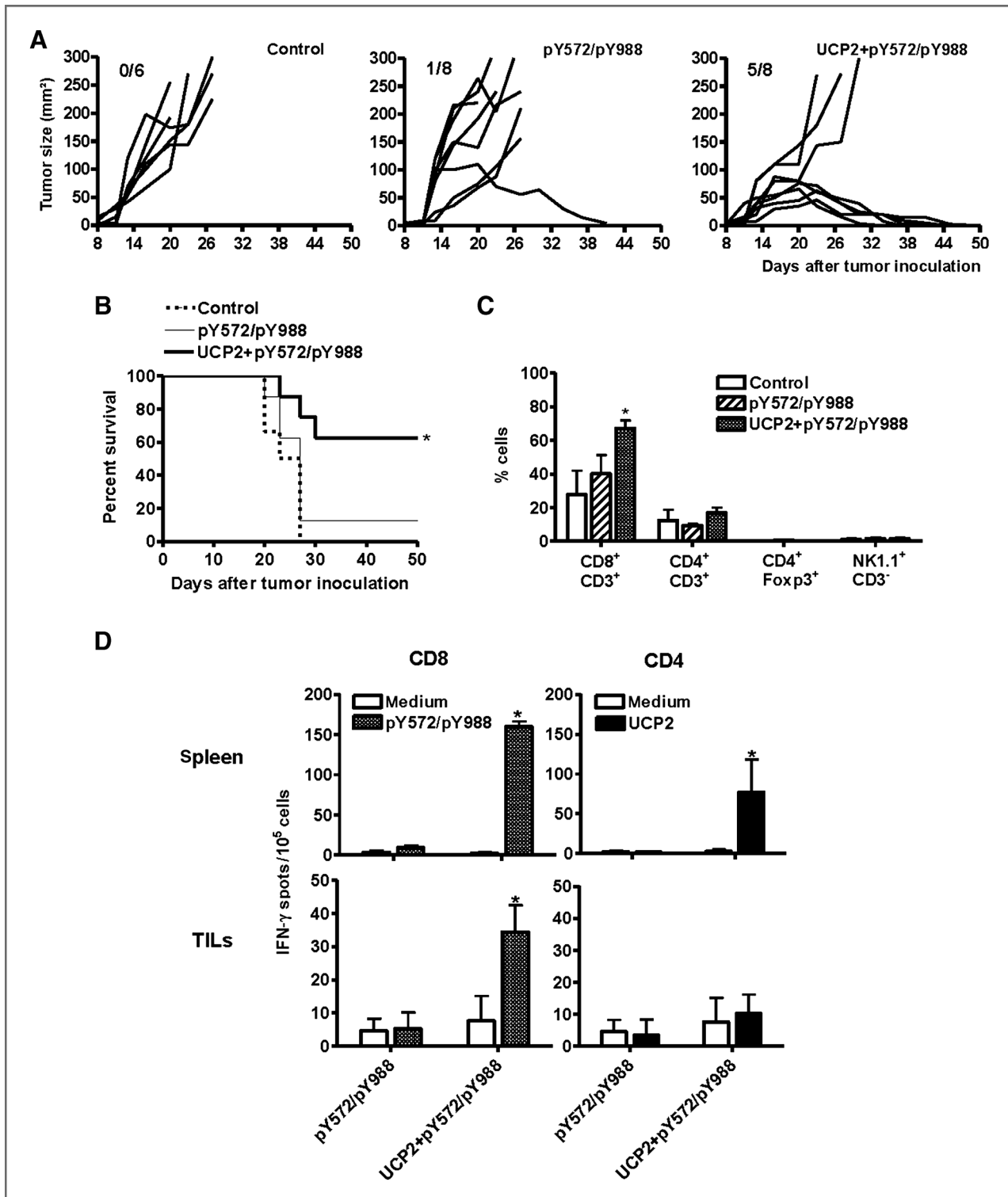


Figure 6. Therapeutic antitumor effect of UCP-based vaccination. Tumor-bearing mice (6–8 mice/group) were therapeutically vaccinated with peptides as described (Materials and Methods). **A**, follow-up of tumor size. The numbers in parentheses indicate mice with tumor regression per group. **B**, survival curves recorded until 50 days. **C**, tumor-bearing mice were vaccinated as above and tumor-infiltrating immune cells were analyzed by flow cytometry. Columns, mean of percentages of cells from 4 mice; bars, SD. **D**, TERT-specific T cells in spleen and in tumor were analyzed by *ex vivo* IFN- γ ELISPOT. Columns, mean of spots from 5 mice; bars, SD. All data are representative of 3 independent experiments.

natural killer, or regulatory T cells (Treg), suggesting that UCP2-specific immunity mainly drive CTLs to the tumor microenvironment.

In line with this observation, we detected a large number of TERT-specific CD8⁺ TILs in mice that received UCP2-based vaccine (Fig. 6D, bottom). TERT-specific CTL response was also detected in spleen of mice, which is correlated to UCP2-specific CD4 T-cell response (Fig. 6D, top). However, UCP-specific CD4⁺ TILs were not detected at the tumor site. This could be due to the low level of CD4⁺ TILs or to the lack of HLA-DR expression on the B16/A2 model used. Together, our results clearly showed that UCP2-specific CD4⁺ T cells exert strong helper activity on tumor-specific CTL responses *in vivo*. Moreover, the addition of UCP2 influences the homing of CD8⁺ T cells at the tumor site. All these data support the use of UCP for antitumor therapeutic vaccination.

Discussion

CD4 T_H1 response against tumor is gaining considerable interest in cancer immunity. In this study, we found spontaneous T_H1 CD4⁺ T-cell responses against recently described TERT-derived UCP in patients with different types of cancers. This observation underlines the great interest of these peptides for immunotherapy. To evaluate the potential applicability of UCP for cancer vaccine, we used the preclinical A2/DR1 mouse model. We have found that UCP vaccination induces high avidity T_H1-polarized CD4⁺ T cells that greatly increase CTL responses against self/TERT epitopes *in vivo* and promote potent antitumor immunity.

Different subpopulations of CD4⁺ T_H cells regulate host antitumor immune responses (10). Indeed, T_H2 CD4⁺ T cells and Tregs are often associated with an inhibitory environment within the tumor (10, 33). The role of T_H17 cells in antitumor immune response is still controversial and seems to depend on the type of cancer (34). In contrast, T_H1 immunity has a clear positive effect in cancer cell eradication. The CD4⁺ T_H1 cells provide help for CTLs through multiple interactions during the induction and effector phases of antitumor immune responses (35, 36). Thus, there is a strong rationale to develop cancer vaccines that stimulate antitumor T_H1 immunity (5, 37). Nevertheless, in recent randomized trials, the use of melanoma-associated helper peptides paradoxically decreased CD8⁺ T-cell responses to a melanoma vaccine (38). This could be related to the plasticity of CD4⁺ T_H cell responses (17). Consequently, the choice of tumor-reactive CD4 helper peptides for cancer vaccine needs to be done carefully.

On the basis of its expression profile and its role in multiple human tumors, TERT is an attractive target for cancer vaccination (22, 39). Schroers and colleagues have previously described TERT-derived promiscuous HLA-DR-restricted peptides (40, 41). However, their role on cell-mediated tumor immunity was not completely addressed neither in preclinical nor in clinical trials setting. Recently, a cancer vaccine using a TERT-derived CD4 helper peptide called GV1001 was able to stimulate specific CD4 T-cell immunity. Clinical trials using GV1001 suggest an

increased survival in patients with cancer when combined with cytotoxic agents (42, 43). Nevertheless, GV1001 vaccine also failed to induce specific immune responses and clinical benefit in other cancers (44). The impact of GV1001-specific CD4⁺ T-cell help on antitumor CTL responses remains to be investigated.

Here, we used a relevant mouse model to conduct a systematic analysis of UCP-specific CD4⁺ T-cell help on antitumor CTL responses in A2/DR1 mice. To this end, we selected 2 HLA-A2⁺ TERT peptides called pY572 and pY988 because they are self-epitopes in mouse and also fully conserved in human TERT (23, 24). In addition, these peptides are already used for cancer vaccines in humans (45, 46). We found that the presence of UCP-specific T_H1 cells drastically enhances self/TERT-specific CD8⁺ T-cell responses as compared with mice immunized with CD8 peptides alone. The anti-self/TERT CTL induced in UCP-vaccinated mice displayed higher avidity and stronger cytotoxicity than the helper less counterpart. Furthermore, the addition of UCP2 to the CD8 TERT peptide vaccine led to B16-A2 tumor regression and improved the survival of mice.

Previous studies have already shown the requirement of CD4 help for the generation of CTL against the self/TERT epitopes used in this study (23, 47). Gross and colleagues reported that vaccination of HHD mice with these peptides promote tumor protection only when they were coupled with a helper peptide derived from the hepatitis B virus. In this study, the vaccine was used prophylactically: approximately 25% of vaccinated mice were tumor free compared with 60% in our therapeutic vaccine study (47). This difference could be related to the nature of the help signal delivered by CD4 T cells. We used the tumor-reactive helper peptide UCP2 that mediates a better homing of CD8⁺ TILs than nontumor antigen-specific CD4 T_H1 cells as previously reported (14, 48, 49). Indeed, we found that CD4 T cells specific for UCP2 cross-recognized its mTERT-derived counterpart peptide p568 (differing by one amino acid; Supplementary Fig. S5). Consequently, the contribution of xenogenic response in UCP2-mediated helper effect in mice studies seems to be weak. In agreement with previous studies, no sign of autoimmunity has been observed in all immunized mice suggesting the safety of TERT-based vaccination (26, 47).

Moreover, immunization with UCP2 stimulates specific CD4⁺ T cells secreting high levels of IL-2 and GM-CSF, which are known to be central components for the generation of CD8⁺ T-cell memory and DC licensing, respectively (36, 50). Therefore, fully activated DCs and sustained self/TERT CTL responses were found in A2/DR1 mice coimmunized with UCP2. Finally, we found that spontaneous UCP-specific T_H1 responses are detected in patients with various cancers indicating the presence of a functional UCP-specific T-cell repertoire. In our recent study, this preexisting UCP-specific CD4⁺ T-cell immunity was shown to be associated with an increased overall survival of patients with lung cancer responding to the first-line chemotherapy (19).

In conclusion, our study shows that the stimulation of UCP-specific CD4 T_H cells is a powerful method to improve cancer vaccine efficacy and also highlights the interest of TERT-derived UCPs for the monitoring of antitumor CD4⁺ T-cell responses.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

P. Langlade-Demoyen is a member of advisory board, INVECTYS Co. (current patent holder for UCPs). No potential conflicts of interest were disclosed by other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: P. Langlade-Demoyen, C. Borg, O. Adotevi

Development of methodology: M. Dosset, Y.C. Lone, E. Levionnois, B. Clerc, P. Langlade-Demoyen

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): M. Dosset, Y. Godet, C. Vauchy, L. Beziaud, Y.C. Lone, B. Clerc, E. Daguindau, O. Adotevi

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): M. Dosset, Y. Godet, L. Beziaud, E. Levionnois, F. Sandoval, P. Langlade-Demoyen, O. Adotevi

Writing, review, and/or revision of the manuscript: M. Dosset, Y. Godet, C. Liard, S. Wain-Hobson, E. Tartour, P. Langlade-Demoyen, C. Borg, O. Adotevi

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): C. Sedlik, C. Liard, E. Levionnois

Study supervision: E. Tartour, P. Langlade-Demoyen, C. Borg, O. Adotevi

Acknowledgments

The authors thank Dr. Nathalie Chaput for providing B16/HLA-A*0201 cell lines. The authors also thank Drs. E. Fabre, T. Nguyen, K. Stefano, and A. Thierry-Vuillemin for the recruitment of patients with cancer.

Grant Support

This work was supported by Ligue Contre le Cancer, Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), and BQR grant from university of Franche Comté.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received March 19, 2012; revised August 20, 2012; accepted September 16, 2012; published OnlineFirst October 2, 2012.

References

- Topalian SL, Weiner GJ, Pardoll DM. Cancer immunotherapy comes of age. *J Clin Oncol* 2011;29:4828–36.
- Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 2011;29:235–71.
- Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004;10:909–15.
- Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J, et al. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med* 2011;364:2119–27.
- Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:721–8.
- Antony PA, Piccirilli CA, Akpınarlı A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, et al. CD8⁺ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 2005;174:2591–601.
- Fayolle C, Deriaud E, Leclerc C. In vivo induction of cytotoxic T cell response by a free synthetic peptide requires CD4⁺ T cell help. *J Immunol* 1991;147:4069–73.
- Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4⁺ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med* 2008;358:2698–703.
- Pardoll DM, Topalian SL. The role of CD4⁺ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* 1998;10:588–94.
- Kennedy R, Celis E. Multiple roles for CD4⁺ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev* 2008;222:129–44.
- Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. Help for cytotoxic T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 1998;393:478–80.
- Smith CM, Wilson NS, Waithman J, Villadangos JA, Carbone FR, Heath WR, et al. Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat Immunol* 2004;5:1143–8.
- Qin Z, Blankenstein T. CD4⁺ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* 2000;12:677–86.
- Bos R, Sherman LA. CD4⁺ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8⁺ T lymphocytes. *Cancer Res* 2010;70:8368–77.
- Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauge S, Bindea G, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 2011;71:1263–71.
- Kobayashi H, Celis E. Peptide epitope identification for tumor-reactive CD4 T cells. *Curr Opin Immunol* 2008;20:221–7.
- Quezada SA, Peggs KS. Tumor-reactive CD4⁺ T cells: plasticity beyond helper and regulatory activities. *Immunotherapy* 2011;3:915–7.
- Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008;112:1557–69.
- Godet Y, Fabre-Guillevin E, Dosset M, Lamuraglia M, Levionnois E, Ravel P, et al. Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes: potential synergistic effect with chemotherapy response. *Clin Cancer Res* 2012;18:2943–53.
- Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 2010;31:9–18.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–74.
- Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2008;8:167–79.
- Hernandez J, Garcia-Pons F, Lone YC, Firat H, Schmidt JD, Langlade-Demoyen P, et al. Identification of a human telomerase reverse transcriptase peptide of low affinity for HLA A2.1 that induces cytotoxic T lymphocytes and mediates lysis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12275–80.
- Scardino A, Gross DA, Alves P, Schultze JL, Graff-Dubois S, Faure O, et al. HER-2/neu and hTERT cryptic epitopes as novel targets for broad spectrum tumor immunotherapy. *J Immunol* 2002;168:5900–6.
- Pajot A, Michel ML, Fazilleau N, Pancre V, Aurault C, Ojcius DM, et al. A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1-/HLA-DR1-transgenic H-2 class I-/class II-knockout mice. *Eur J Immunol* 2004;34:3060–9.
- Adotevi O, Mollier K, Neuveut C, Dosset M, Ravel P, Fridman WH, et al. Targeting human telomerase reverse transcriptase with recombinant lentivector is highly effective to stimulate antitumor CD8 T-cell immunity *in vivo*. *Blood* 2010;115:3025–32.
- Adotevi O, Mollier K, Neuveut C, Cardinaud S, Boulanger E, Mignen B, et al. Immunogenic HLA-B*0702-restricted epitopes derived from human telomerase reverse transcriptase that elicit antitumor cytotoxic T-cell responses. *Clin Cancer Res* 2006;12:3158–67.
- Rusakiewicz S, Dosset M, Mollier K, Souque P, Charneau P, Wain-Hobson S, et al. Immunogenicity of a recombinant lentiviral vector carrying human telomerase tumor antigen in HLA-B*0702 transgenic mice. *Vaccine* 2010;28:6374–81.
- Brandmaier AG, Leitner WW, Ha SP, Sidney J, Restifo NP, Touloukian CE. High-avidity autoreactive CD4⁺ T cells induce host CTL, overcome T(regs) and mediate tumor destruction. *J Immunother* 2009;32:677–88.

30. Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 2003;300:337–9.
31. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998;393:474–8.
32. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960–4.
33. Nishimura T, Iwakabe K, Sekimoto M, Ohmi Y, Yahata T, Nakui M, et al. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med* 1999;190:617–27.
34. Murugaiyan G, Saha B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J Immunol* 2009;183:4169–75.
35. Rocha B, Tanchot C. Towards a cellular definition of CD8⁺ T-cell memory: the role of CD4⁺ T-cell help in CD8⁺ T-cell responses. *Curr Opin Immunol* 2004;16:259–63.
36. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 2010;28:445–89.
37. Fujiki F, Oka Y, Kawakatsu M, Tsuboi A, Tanaka-Harada Y, Hosen N, et al. A clear correlation between WT1-specific Th response and clinical response in WT1 CTL epitope vaccination. *Anticancer Res* 2010;30:2247–54.
38. Slingluff CL Jr, Petroni GR, Chianese-Bullock KA, Smolkin ME, Ross MI, Haas NB, et al. Randomized multicenter trial of the effects of melanoma-associated helper peptides and cyclophosphamide on the immunogenicity of a multipeptide melanoma vaccine. *J Clin Oncol* 2011;29:2924–32.
39. Beatty GL, Vonderheide RH. Telomerase as a universal tumor antigen for cancer vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2008;7:881–7.
40. Schroers R, Huang XF, Hammer J, Zhang J, Chen SY. Identification of HLA DR7-restricted epitopes from human telomerase reverse transcriptase recognized by CD4⁺ T-helper cells. *Cancer Res* 2002;62:2600–5.
41. Schroers R, Shen L, Rollins L, Rooney CM, Slawin K, Sonderstrup G, et al. Human telomerase reverse transcriptase-specific T-helper responses induced by promiscuous major histocompatibility complex class II-restricted epitopes. *Clin Cancer Res* 2003;9:4743–55.
42. Brunsvig PF, Kyte JA, Kersten C, Sundstrom S, Moller M, Nyakas M, et al. Telomerase peptide vaccination in NSCLC: a phase II trial in stage III patients vaccinated after chemoradiotherapy and an 8-year update on a phase I/II trial. *Clin Cancer Res* 2011;17:6847–57.
43. Kyte JA, Gaudernack G, Dueland S, Trachsel S, Julsrud L, Aamdal S. Telomerase peptide vaccination combined with temozolomide: a clinical trial in stage IV melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2011;17:4568–80.
44. Schlapbach C, Yerly D, Daubner B, Yawalkar N, Hunger RE. Telomerase-specific GV1001 peptide vaccination fails to induce objective tumor response in patients with cutaneous T cell lymphoma. *J Dermatol Sci* 2011;62:75–83.
45. Bolonaki I, Kotsakis A, Papadimitraki E, Aggouraki D, Konsolakis G, Vagia A, et al. Vaccination of patients with advanced non-small-cell lung cancer with an optimized cryptic human telomerase reverse transcriptase peptide. *J Clin Oncol* 2007;25:2727–34.
46. Kotsakis A, Vetsika EK, Christou S, Hatzidaki D, Vardakis N, Aggouraki D, et al. Clinical outcome of patients with various advanced cancer types vaccinated with an optimized cryptic human telomerase reverse transcriptase (TERT) peptide: results of an expanded phase II study. *Ann Oncol* 2012;23:442–9.
47. Gross DA, Graff-Dubois S, Opolon P, Cornet S, Alves P, Bennaceur-Griscelli A, et al. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest* 2004;113:425–33.
48. Marzo AL, Kinnear BF, Lake RA, Frelinger JJ, Collins EJ, Robinson BW, et al. Tumor-specific CD4⁺ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol* 2000;165:6047–55.
49. Wong SB, Bos R, Sherman LA. Tumor-specific CD4⁺ T cells render the tumor environment permissive for infiltration by low-avidity CD8⁺ T cells. *J Immunol* 2008;180:3122–31.
50. Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells. *Nature* 2006;441:890–3.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Optimisation de la stratégie prédictive pour l'identification d'épitopes CD4 dérivés d'antigènes tumoraux

L'identification d'épitopes T CD4 à partir d'une stratégie prédictive se déroule en plusieurs étapes clés décrites dans le chapitre "stratégie d'identification d'épitopes T CD4".

Au cours de ces travaux, nous avons identifié 4 peptides CD4 dérivés de TERT (UCP1, UCP2, UCP3 et UCP4) capables de lier différents allèles HLA-DR. Le choix de ces allèles est basé sur des études ayant pu observer que les réponses T CD4 sont majoritairement restreintes par les molécules HLA-DR qui sont par ailleurs très polymorphiques. Ainsi, bien que les allèles HLA-DP4 soient représentés dans 75% des individus, l'immunoprévalence reposerait principalement sur la promiscuité des molécules HLA-DR (Wang, Kerzerho et al. 2008).

Bien que de nombreuses études aient sélectionné leurs épitopes sur la base d'algorithmes et de tests *in vitro* chez l'homme, nous avons choisi de réaliser un criblage approfondi des peptides selon les étapes suivantes :

- i) Sélection et prédiction *in silico* des peptides de classe II.
- ii) Utilisation de tests de liaison HLA-II pour évaluer l'affinité des peptides CD4 prédits.
- iii) Evaluation *in vitro* de l'immunogénicité des peptides chez des donneurs sains.
- iv) Evaluation des réponses T CD4 spécifiques chez les patients.
- v) Evaluation de l'immunogénicité *in vivo* des peptides CD4 par l'utilisation de souris transgéniques HLA.

Sélection et prédiction in silico des peptides de classe II

Plusieurs algorithmes ont été développés pour prédire des motifs de liaison peptidique pour les molécules HLA de classe II. Les algorithmes conventionnels les plus utilisés reposent essentiellement sur les motifs de liaison, et les matrices quantitatives. Dans cette étude nous avons choisi de combiner trois algorithmes de prédiction d'épitopes de HLA-II que sont SYFPEITHI (Rammensee et al. 1999), NetMHCII et NetMHCIIpan (Nielsen et al. 2008). SYFPEITHI est un algorithme basé uniquement sur les positions d'ancrage des peptides aux HLA, alors que les méthodes NetMHCIIpan et NetMHCII combinent également des tests de liaison HLA *in silico*. Les divergences de résultats parfois obtenus incitent donc à

combiner plusieurs algorithmes pour une pré-sélection plus appropriée de peptides CD4 dérivés d'un antigène tumoral.

Ainsi la combinaison des prédictions présentait l'ensemble des 4 peptides UCP comme étant de forte affinité pour les allèles HLA-DR1, -DR4, -DR7 et -DRB5. En revanche une affinité intermédiaire était globalement trouvée pour les molécules HLA-DR3, DR11 et DR15. Une comparaison des prédictions obtenues avec les logiciels SYFPEITHI et NetMHCIIpan est illustrée dans le Tableau 8. Les résultats montrent une bonne corrélation pour les allèles DR1, DR11 et DR15. Par contre, les peptides UCP1, -3 et -4 ayant une faible affinité (donc non immunogènes) pour HLA-DR7 par la prédiction par SYFPEITHI sont à l'inverse de forte affinité sur NetMHCIIpan. Il en va de même pour UCP3 pour l'allèle HLA-DR4. Donc si nous avons utilisé uniquement SYFPEITHI nous aurions pu ne pas retenir ces peptides ce qui souligne ainsi la nécessité de valider les prédictions peptidiques en croisant les résultats d'au moins deux ou trois algorithmes.

L'utilisation d'une combinaison d'algorithmes de prédiction s'avère donc une méthode de pré-sélection relativement efficace.

	DR1		DR4		DR7		DR11		DR15	
	SYFPEITHI	NetMHCIIpan	SYFPEITHI	NetMHCIIpan	SYFPEITHI	NetMHCIIpan	SYFPEITHI	NetMHCIIpan	SYFPEITHI	NetMHCIIpan
UCP1	SB	SB	SB	SB	WB	SB	WB	WB	WB	WB
UCP2	SB	SB	SB	SB	SB	SB	WB	WB	WB	WB
UCP3	SB	SB	WB	SB	WB	SB	WB	WB	WB	WB
UCP4	SB	SB	SB	SB	WB	SB	SB	SB	WB	WB

Tableau 8 : Comparaison des affinités prédits des UCPs obtenues avec SYFPEITHI et NetMHCIIpan. Les peptides sont considérés respectivement de forte affinité pour un score >20 (SYFPEITHI) ou un IC50 <50 nM (NetMHCIIpan). Les résultats corrélés entre les deux algorithmes sont surlignés en vert. SB = Forte affinité (en gras) ; WB = Faible affinité.

Utilisation de test de liaison HLA-II pour évaluer l'affinité des peptides CD4 prédits

Afin de confirmer les résultats obtenus à l'aide des algorithmes de prédiction, nous avons évalué la capacité réelle des peptides prédits à lier les molécules HLA-II. Dans ce but nous avons eu recours à des tests de liaison HLA *in vitro* mis au point par l'équipe de B. Maillère à l'Institut de Biologie et de Technologies de Saclay. Ce test est basé sur le principe d'un ELISA de compétition. Brièvement, les molécules HLA-II purifiées sont incubées en présence d'une concentration donnée d'un peptide traceur biotinylé et de différentes concentrations d'un peptide compétiteur à tester. Le peptide traceur biotinylé est détecté par l'ajout d'un conjugué streptavidine-enzyme. La capacité de liaison du peptide testé à une molécule HLA de classe II est mesurée par l'IC50, concentration à laquelle le peptide inhibe 50% de la liaison du peptide traceur. Plus l'IC50 est faible (<50), plus le peptide testé est affin pour la molécule HLA donnée. Ainsi les peptides sont dits de forte affinité pour un IC₅₀ <50,

d'affinité intermédiaire pour un IC₅₀ (50-100), de faible affinité pour un IC₅₀ >100 et non liants pour un IC₅₀ >1000.

Nos résultats ont montré que les 4 peptides UCP sélectionnés après prédiction présentent une forte affinité pour au moins 7 molécules HLA-DR différentes que sont HLA-DR1, DR4, DR7, DR11, DR15, DRB3 et DRB5. En particulier, UCP1 et UCP2 lient tous ces allèles avec un IC₅₀ intermédiaire (50-100) à faible (<50). Ainsi, sur la base de la prévalence des 10 allèles HLA-DR, la capacité de liaison des UCP permet de couvrir plus de 85 % de la population (Wang, Kerzerho et al. 2008).

La comparaison du test de liaison HLA-DR *in vitro* avec les résultats obtenus par l'algorithme de prédiction NetMHCII révèle une corrélation globale de ~80% pour l'ensemble des UCP (Tableau 9). Une bonne corrélation est obtenue pour les allèles HLA-DR1, -DR7, -DRB3 et DRB5 testés. En revanche, UCP1 pourtant prédit par NetMHCII comme faible ligand (IC₅₀ >500) de HLA-DR3, s'avère s'y lier avec une bonne affinité *in vitro* (IC₅₀ = 50-100). A l'inverse les peptides UCP2, UCP3 et UCP4 présumés d'affinité intermédiaire pour HLA-DRB4 par l'algorithme (IC₅₀=100-500), ne s'y lient pas *in vitro* (IC₅₀ >1000).

Cette méthode d'évaluation *in vitro* de la liaison aux molécules HLA-II a été utilisée par d'autres groupes pour l'identification de peptides dérivés d'autres antigènes tumoraux comme la survivine (Wang, Kerzerho et al. 2008) ou MAGE (Wang et al. 2007). Ainsi la réalisation de tests de liaison HLA *in vitro* s'avère une étape supplémentaire intéressante dans la sélection des peptides.

	DR1		DR3		DR7		DRB3		DRB4		DRB5	
	Pred.	B.A.	Pred.	B.A.	Pred.	B.A.	Pred.	B.A.	Pred.	B.A.	Pred.	B.A.
UCP1	++++	++++	+	+++	++++	++++	++	+	++	+++	++++	++++
UCP2	++++	++++	+	+	++++	++++	-	-	++	-	+++	++++
UCP3	++++	++++	+	+	++++	++++	-	-	++	-	++++	++++
UCP4	++++	++++	+	+	++++	++++	-	-	++	-	++++	++++

Tableau 9 : Comparaison entre les prédictions NetMHCII et les tests *in vitro* de liaison HLA. La capacité des peptides à lier différents HLA a été évaluée à l'aide du logiciel NetMHCII (Pred.) et *in vitro* par ELISA de compétition (B.A.). Les résultats positivement corrélés sont surlignés en vert. La valeur des IC₅₀ (nM) obtenues par chaque méthode est interprétée comme suit (++++) <50 ; (+++) 50-100 ; (++) 100-500 ; (+) >500 ; (-)>1000.

Etude *in vitro* de l'immunogénicité des peptides CD4 chez l'homme

Pour tester la capacité des peptides identifiés à stimuler des précurseurs T CD4⁺ parmi les lymphocytes humains, nous avons utilisé un protocole de stimulation *in vitro* à plusieurs cycles. Des lymphocytes issus du sang de donneurs ont été stimulés *in vitro* avec chaque peptide UCP en présence d'IL-7 et d'IL-2. Les cultures sont maintenues pendant 3 cycles (1 cycle = 7 jours) avant de tester la réactivité des LT CD4 par ELISPOT IFN γ . Cette

approche de stimulation *in vitro* a été déjà utilisée avec succès par notre équipe pour la génération des réponses T spécifiques de peptides tumoraux (Adotevi et al. 2006; Wang, Kerzerho et al. 2008; Kerzerho et al. 2010). Nous avons pu générer ainsi des LT CD4 spécifiques des peptides UCP sélectionnés, indiquant la présence d'un répertoire T CD4 naïf spécifique chez l'homme. La restriction HLA-DR des LT CD4 spécifiques d'UCP a été confirmée par l'utilisation d'anticorps anti-HLA-DR qui inhibent complètement les réponses T CD4 spécifiques. De plus, les réponses T CD4 générées *in vitro* ont été obtenues à partir de donneurs exprimant des allèles HLA-DR différents ce qui indique le caractère 'promiscuous' des UCP. De plus ces résultats supportent la capacité des algorithmes à prédire des peptides tumoraux CD4 potentiellement immunogènes.

Classiquement, la réactivité des LT CD4 est évaluée par un test de prolifération par incorporation de la thymidine dans les études portant sur l'identification de peptides dérivés d'antigènes tumoraux. Concernant TERT, Schroers et al avaient utilisé un test d'incorporation à la thymidine pour tester la fonctionnalité des T CD4 contre les différents peptides (Schroers et al. 2002; Schroers et al. 2003). Si ce test permet de mesurer la capacité des CD4 à proliférer en réponse à une stimulation, elle ne rend pas compte de leur polarisation fonctionnelle.

L'existence de plusieurs sous-populations de LT CD4 et leur plasticité incitent donc à évaluer la réactivité des LT CD4 par d'autres tests fonctionnels comme l'ELISPOT, la détection de cytokines intracellulaires, et l'ELISA multiplex. Dans notre étude le test ELISPOT IFN γ a été choisi pour tester la spécificité des LT CD4 en réponse à une stimulation UCP. Ce test est plus sensible et renseigne sur la capacité des LT CD4 à produire de l'IFN γ et donc de leur polarisation Th1 nécessaire pour l'immunité antitumorale. Ainsi, évaluer d'emblée la polarisation des LT CD4 spécifiques de peptides tumoraux par ELISPOT nous paraît plus pertinente car elle permet de focaliser la suite du processus d'identification sur les épitopes d'intérêt pour la réponse antitumorale. Nous n'avons pas testé les LT CD4 anti-UCP générés chez les donneurs sains par des tests de prolifération pour pouvoir comparer. Néanmoins l'utilisation de tests de prolifération utilisant des traceurs non-radioactifs type CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) permet de s'affranchir d'un test radioactif potentiellement toxique aussi bien pour le manipulateur que pour l'environnement.

Pour compléter l'étude de la polarisation lymphocytaire T CD4 spécifique des UCP, nous avons évalué, à partir de lignées ou clones de T CD4 spécifiques des UCP, la production d'autres cytokines Th1 et celle de cytokines caractéristiques d'autres sous-populations de LT CD4 décrites. Ces expériences ont clairement montré que les LT CD4 spécifiques des UCP sécrètent en plus de l'IFN γ , du TNF- α et l'IL-2. En revanche aucune production spécifique d'IL-4, d'IL-5, ou d'IL-17 n'a été observée.

Etude de l'apprêtement naturel des épitopes CD4 par les cellules tumorales

Une autre étape de la stratégie prédictive est l'étude de l'apprêtement naturel des peptides CD4 par les cellules tumorales. Cet apprêtement est généralement évalué par l'utilisation de lignées ou de clones T CD4 spécifiques dirigés contre des cellules tumorales exprimant le CMH II.

Si la reconnaissance du complexe CMH I/peptide sur la tumeur par les CTL est essentielle à leur fonction cytotoxique, l'activité antitumorale des LT CD4 ne requiert pas nécessairement une interaction directe avec la tumeur (Mumberg, Monach et al. 1999; Qin and Blankenstein 2000). De plus très peu de cellules tumorales expriment naturellement les molécules de CMH II. Par ailleurs, le mode d'action des LT CD4 antitumoraux est indirect et s'effectue via leur capacité à stimuler les autres effecteurs cellulaires de l'immunité antitumorale, notamment les CTL (Bourgeois, Veiga-Fernandes et al. 2002; Curtsinger, Lins et al. 2003; Shafer-Weaver, Watkins et al. 2009). L'activation des T CD4 dépend essentiellement de la cross-présentation d'antigènes tumoraux par les CPA infiltrant la tumeur (Heath and Carbone 2001). Ces CPA sont capables de présenter par différents mécanismes, tels que la phagocytose, endocytose et autophagie, des peptides tumoraux par les molécules CMH II. Ces observations ont conduit différents groupes à analyser l'apprêtement naturel des peptides CD4 en utilisant des CPA chargées avec l'antigène ou un lysat tumoral (Schroers, Huang et al. 2002). L'apprêtement naturel d'épitopes restreints CMH II dérivés de TERT sur des cellules tumorales a été démontré dans les travaux de Schroers et al. en utilisant des clones T CD4 anti-TERT (Schroers, Huang et al. 2002; Schroers, Shen et al. 2003). Concernant les UCP, leur apprêtement naturel par les cellules tumorales n'a pas été formellement étudié durant ma thèse. Cependant des résultats préliminaires obtenus en utilisant des DC murines exprimant HLA-DR chargées par un lysat cellulaire provenant d'une lignée tumorale exprimant TERT ont montré que certains UCP peuvent être naturellement apprêtés et présentés aux T CD4 spécifiques (Figure 25). De plus nous avons pu générer des clones T CD4 anti-UCP qui serviront à analyser cette propriété pour les UCP.

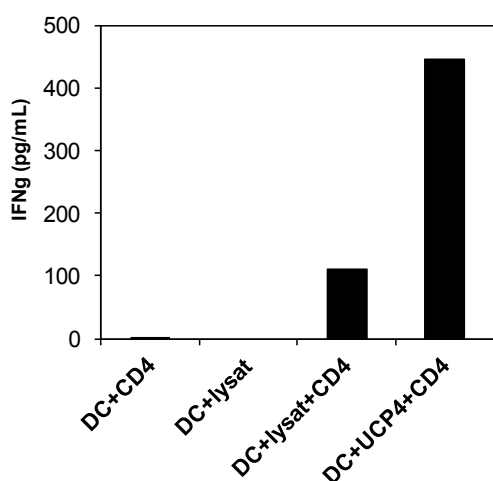


Figure 25 : Evaluation de l'apprêtement naturel de UCP4 par les DC. Des LT CD4 issus de souris vaccinées avec UCP4 sont cultivés *in vitro* en présence de DC irradiées et chargées avec un lysat de cellules tumorales TERT+ ou avec UCP4 en contrôle positif. La réactivité des LT CD4 spécifiques est analysée par ELISA IFN γ après 24H de co-culture.

Evaluation des réponses T CD4 spécifiques chez les patients

L'analyse des réponses spontanées T CD4 anti-UCP chez des patients atteints de cancers est une étape majeure que nous avons rajoutée dans notre stratégie d'identification d'épitopes T CD4. Pour cela nous avons évalué les réponses T CD4 anti-UCP après une courte période de sensibilisation *in vitro* (8-10 jours) de lymphocytes issus de patients métastatiques ou d'individus sains contrôles. Des réponses T CD4 anti-UCP mesurées par ELISPOT IFN γ ont été obtenues chez certains patients atteints de cancer alors qu'elles sont négatives chez les individus sains testés dans les mêmes conditions. Nous avons également montré que les LT CD4 anti-UCP détectés chez les patients sécrètent également l'IL-2 et le TNF α confirmant leur polarisation Th1.

L'absence de réponses spontanées T CD4 anti-TERT chez les sujets sains pourrait s'expliquer par l'absence ou la faible expression de la protéine TERT dans certaines cellules normales. En revanche, nous supposons qu'il existe une forte expression antigénique chez le patient atteint de cancer en particulier métastatique (Wang, Kerzerho et al. 2008). Nous avons ainsi confirmé ces résultats dans différents cancers tels que le poumon, colon, prostate, rein, et leucémies.

Nos résultats suggèrent que la présence de la tumeur serait le facteur à l'origine de l'induction de réponses T CD4 anti-TERT détectables. Des résultats similaires ont été rapportés par différents groupes confirmant la mise en évidence de réponses spontanées T CD4 spécifiques d'antigènes tumoraux uniquement chez les patients que MAGE-A3 (Tsuji et al. 2009), Survivine (Wang, Kerzerho et al. 2008) ou HCA587 (Wen et al. 2011).

Le rôle crucial joué par la télomérase durant l'oncogenèse en préservant l'intégrité des télomères est clairement établi et est considéré comme une des caractéristiques principales

d'une cellule tumorale (Morin 1989). Par conséquent, la quasi majorité des cancers exprime à un moment ou un autre de leur développement cette enzyme qui leur assure l'immortalité. Dans des modèles de tumeurs spontanées chez la souris, une réactivation de TERT confère un pouvoir de malignité plus important à la tumeur (Ding et al. 2012), ce qui corrobore le mauvais pronostic des cancers humains avec une surexpression forte de TERT (Marchetti, Pellegrini et al. 2002; Wu, Lin et al. 2003; Zhu, Cutz et al. 2006).

Cependant, la fonction de la télomérase dans les cellules germinales et certaines cellules somatiques normales, telles que les cellules souches ou les lymphocytes activés, laisse supposer l'existence de mécanismes centraux et périphériques de tolérance immunitaire dirigée contre TERT. Ainsi un même donneur sain sans réponse spontanée T CD4 anti-UCP peut, après trois cycles de stimulation *in vitro*, révéler des LT CD4 spécifiques. Nous n'avons pas regardé si des réponses T CD4 anti-UCP peuvent être générées après plusieurs cycles de stimulation chez un patient qui n'en avait pas après un cycle.

Nos résultats suggèrent également l'existence chez les patients atteints de cancer d'un nombre plus élevé de précurseurs ou de LT CD4 mémoires ayant déjà eu une expérience antigénique. Pour des raisons techniques (absence de tétramères HLA-DR-UCP), nous n'avons pas pu réaliser d'étude phénotypique de LT CD4 anti-UCP.

Ces résultats soulignent aussi l'intérêt pour l'approche prédictive d'évaluer en plus des donneurs sains les réponses T CD4 antitumorales chez les patients atteints de cancer. L'analyse de la réponse spontanée T CD4 anti-TERT n'a pas été réalisée dans les études antérieures sur la télomérase (Schroers, Huang et al. 2002; Schroers, Shen et al. 2003) ce qui ne permet pas une comparaison des résultats.

Etude de l'immunogénicité in vivo des épitopes T CD4 dérivés de TERT : Contribution des modèles de souris transgéniques HLA.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, différentes sous-populations lymphocytaires T CD4 contrôlent la réponse immunitaire antitumorale parmi lesquelles les lymphocytes T CD4 Th1 jouent un rôle activateur prépondérant (Ostrand-Rosenberg 2005; Kennedy and Celis 2008). Ils deviennent actifs grâce à la reconnaissance des peptides de 15 à 20 acides aminés présentés par les molécules HLA de classe II et sont nécessaires à l'induction de l'immunité à médiation cellulaire et au contrôle notamment des réponses CTL antitumorales (Bourgeois, Veiga-Fernandes et al. 2002; Bourgeois and Tanchot 2003). L'importance des lymphocytes Th1 est également illustrée par une meilleure efficacité des immunothérapies antitumorales capables de stimuler ces cellules (Marzo, Kinnear et al.

2000). Une façon directe de stimuler les LT CD4 est l'utilisation de peptides dits « helper » restreints par HLA de classe II. Ainsi des peptides helper potentiels dérivés d'antigènes tumoraux ont été identifiés durant cette dernière décennie mais peu sont actuellement développés en clinique (Kobayashi and Celis 2008). Une des principales raisons repose sur le risque de stimuler une réponse T CD4 inadaptée liée à la plasticité et à l'hétérogénéité des sous-populations de LT CD4. En effet, en plus des Th1 d'autres sous populations de LT CD4 telles que les Th2, Treg et Th17 jouent un rôle ambivalent mais le plus souvent inhibiteur de la réponse antitumorale (O'Shea and Paul 2010). Contrairement à l'identification des épitopes CTL, peu de modèles *in vivo* existent pour évaluer l'immunogénicité des T CD4 spécifiques d'épitopes dérivés d'antigènes tumoraux humains. De plus la reconnaissance tumorale par les CTL spécifiques est une étape clé et souvent suffisante pour valider un rôle immunogène des épitopes CD8 identifiés (Arai et al. 2001; Vonderheide et al. 2001; Asemissen et al. 2006). Toutefois la caractérisation *in vitro* des réponses T CD4 spécifiques des épitopes dérivés d'antigènes tumoraux ne suffit pas pour rendre compte de la polarisation et en particulier du rôle antitumoral des LT CD4 spécifiques des peptides identifiés. Par exemple dans un récent essai, l'utilisation d'un vaccin à base de peptides helper associés au mélanome a conduit à une inhibition partielle des réponses T CD8 spécifiques, suggérant une potentielle plasticité des réponses T CD4 helper induites (Slingluff et al. 2011).

Au cours de ce travail de thèse nous avons évalué la contribution des modèles de souris génétiquement modifiées exprimant un double transgène HLA de classe I et II pour étudier les propriétés fonctionnelles des réponses T CD4 spécifiques des UCP. Les souris transgéniques HLA ont été développées pour évaluer en préclinique les réponses T dans un contexte restreint par les molécules de CMH humaines. Ces souris, notamment les souris transgéniques HLA de classe I, sont régulièrement utilisées pour tester l'immunogénicité *in vivo* de nouveaux peptides dérivés d'antigènes tumoraux humains (Pascolo 2005). Ainsi plusieurs modèles de souris transgéniques sont actuellement disponibles pour les molécules du CMH classe I (HLA-A2, HLA-A3, HLA-B7, HLA-A24, HLA-B27...), de classe II (HLA-DR1, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DP4, HLA-DQ8...) ou la combinaison des HLA-I / HLA-II. Notre groupe avait utilisé différents modèles de souris Tg HLA pour l'identification d'antigènes tumoraux et l'évaluation de différentes stratégies d'immunothérapies (Adotevi, Mollier et al. 2006; Adotevi et al. 2010; Kerzerho, Adotevi et al. 2010; Rusakiewicz et al. 2010)

Au cours de ma thèse, nous avons utilisé le modèle de souris transgéniques HLA-A2/HLA-DRB*0101 (Tg A2/DR1). Les souris Tg A2/DR1 ont été créées dans le laboratoire du Pr F. Lemonnier à l'Institut Pasteur équipe ayant développé et innové la caractérisation des souris transgéniques HLA. Ces souris, sont invalidées pour les gènes endogènes de classe I (H2D^b) et II (IA/IE), si bien que les molécules d'histocompatibilité humaines sont seules disponibles pour l'éducation thymique et la mobilisation lymphocytaire en réponse aux antigènes (Pajot et al. 2004; Pajot et al. 2007). L'utilisation de ces souris doubles transgéniques nous a permis d'étudier l'immunogénicité *in vivo* des UCP, la coopération entre les LT CD4 anti-UCP et les CTL (effet helper) ainsi que le rôle des LT CD4 anti-UCP dans le contrôle de la croissance tumorale et tout ceci en l'absence de compétition avec les réponses T restreintes par les molécules CMH de souris. Nous avons retenu ce modèle parce que les 4 peptides CD4 dérivés de TERT identifiés (UCP) peuvent lier la molécule HLA-DRB*0101.

Pour évaluer l'apprêtement *in vivo* des UCP nous avons immunisé des souris Tg A2/DR1 avec de l'ADN plasmidique codant la protéine hTERT. Ces expériences ont montré la présence de LT CD4 spécifiques de chaque UCP chez les souris.

Bien que les tests de liaison HLA révèlent une affinité identique des peptides pour l'allèle HLA-DRB*0101, les réponses obtenues divergent. Des réponses T CD4 spécifiques de UCP2 -3 et -4 ont été générées chez la majorité des souris testées (> 90 %) contre seulement 50 % des souris pour UCP1. Une différence dans l'intensité des réponses a été également observée après vaccination ADN avec des réponses prolifératives T CD4 spécifiques de UCP1 plus faibles comparées à celles spécifiques des autres peptides. La faible réponse T CD4 générée contre UCP1 peut être due à un mauvais apprêtement et présentation de ce peptide aux LT CD4. Une des explications possibles serait la position d'UCP1 (p44-58) située en N-terminale dans la séquence primaire d'hTERT. En effet cette région N-terminale (les 100 premiers acides aminés - GQ domain -) renferme une séquence MTS (Mitochondrial-targeting signal) d'adressage d'hTERT dans la mitochondrie (Sharma et al. 2012). Cette séquence est clivée lors du catabolisme d'hTERT puis dégradée dans le cytosol peu accessible au compartiment endolysosomal et donc moins disponible pour rencontrer les molécules CMH de classe II.

L'utilisation d'une immunisation ADN chez la souris Tg A2/DR1 a permis de montrer que, bien qu'ayant une affinité relative identique *in vitro* pour la molécule HLA-DRB*0101, ces peptides sont différemment apprêtés et présentés aux LT CD4 *in vivo*. Des approches similaires ont été utilisées récemment pour évaluer l'apprêtement et l'immunogénicité de nouveaux peptides (Klyushnenkova et al. 2005; Osen et al. 2010). La limite de cette approche est qu'il existe des différences dans la machinerie d'apprêtement entre les CPA humaines et

celles des souris (Shortman and Liu 2002). Néanmoins c'est une approche de criblage permettant de tester assez rapidement plusieurs peptides candidats potentiels avant leur validation chez l'homme (Osen, Soltek et al. 2010).

Nous avons également montré chez les souris Tg A2/DR1 que l'immunisation peptidique avec UCP stimule des réponses T CD4 spécifiques capables de produire l'IFN γ détectable *ex vivo*. Les vaccinations avec UCP2 ou -3 induisent des LT CD4 spécifiques plus fortes en accord avec les résultats obtenus après immunisation ADN.

Plus particulièrement, nous avons montré que l'immunisation avec UCP2 induit des LT CD4 spécifiques capables de répondre *ex vivo* à de très faibles concentrations de peptide (< 10⁻⁷ µg/ml) traduisant une forte avidité de ces lymphocytes. Ce pouvoir immunogène singulier d'UCP2 nous a permis de réduire les doses vaccinales nécessaires pour induire une réponse T CD4 spécifique efficace (jusqu'à 1 µg). Des résultats similaires ont été obtenus avec UCP3 confirmant ainsi une meilleure immunogénicité de ces deux peptides. Il faut souligner qu'UCP2 est l'un des peptides les plus immunogènes chez l'homme avec UCP4 et UCP3. Les réponses T CD4 spécifiques d'UCP1 sont bien générées *in vivo* mais leur amplitude et qualité sont plus faibles, comme celles observées après stimulation *in vitro* chez l'homme. Ainsi nos résultats démontrent une bonne cohérence entre les réponses T CD4 anti-UCP humaines et celles retrouvées *in vivo* chez la souris. Nous avons privilégié une méthode d'ELISPOT IFN γ *ex vivo* pour évaluer les réponses T CD4 spécifiques chez la souris. Cependant, nous avons également obtenu des résultats concordants en utilisant d'autres méthodes immunologiques telles que des tests de prolifération au CFSE ou de marqueurs intracellulaire de cytokines pour évaluer les réponses T CD4 spécifiques des UCP chez les souris Tg A2/DR1.

Bien que les LT CD4 anti-UCP produisent efficacement l'IFN γ , cytokine prototype de la polarisation Th1, nous avons aussi évalué un large panel de cytokines compte tenu de la plasticité des LT CD4 (Bluestone, Mackay et al. 2009). Ainsi en utilisant un test ELISA ou cytokines multiplex, nos résultats ont montré que les 4 UCP stimulent préférentiellement des LT CD4 sécrétant de l'IL-2, du TNF α et du GM-CSF. L'absence de production de cytokines apparentées aux Th2, Treg ou Th17 par les LT CD4 anti-UPC générés *in vivo* montre clairement leur polarisation Th1 et confirme les résultats obtenus chez l'homme.

Les Treg sont connus pour leur capacité inhibitrice des réponses T CD4 antitumorales (Nishikawa et al. 2005). De plus il a été montré que les iTreg spécifiques induits après immunisation peuvent inhiber les réponses T spécifiques (Yan et al. 2011). Par conséquent nous avons suivi cette population de manière non spécifique chez des souris Tg A2/DR1 après immunisation par UCP. Ainsi aucune augmentation significative de LT CD4 CD25⁺ Foxp3⁺

n'a été détectée *ex vivo* (Figure 26A). Lorsqu'on stimule les LT CD4 Foxp3 isolés chez les souris immunisées avec UCP en présence de DC chargées avec le peptide UCP relevant, aucune prolifération spécifique n'est observée après 4 jours de culture *in vitro* (Figure 26B).

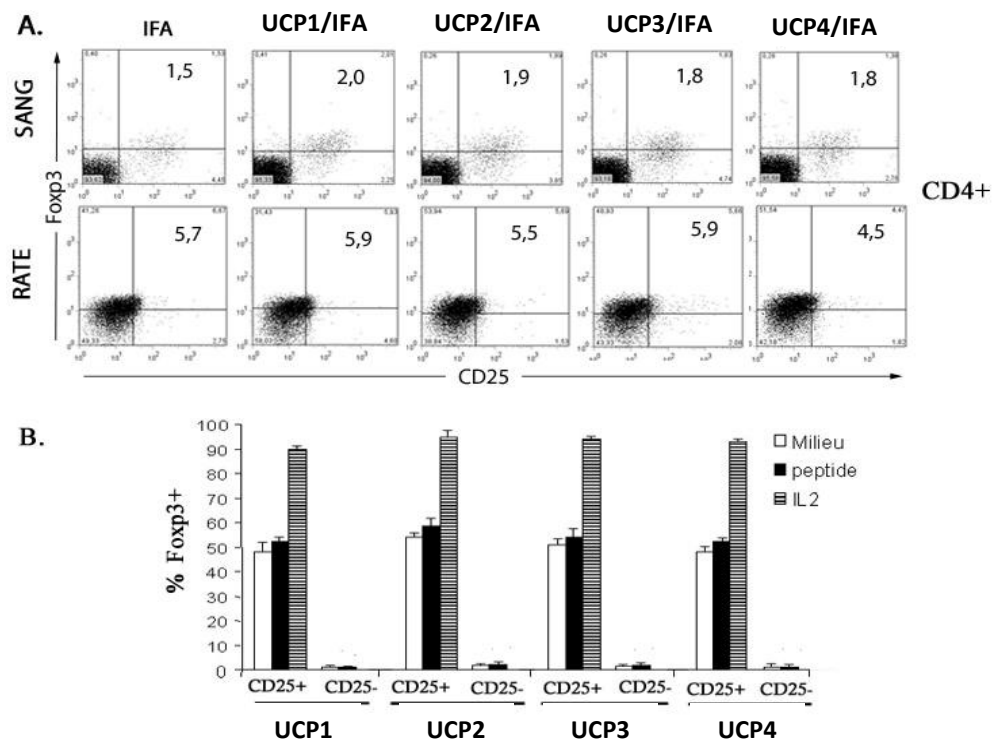


Figure 26 : Les peptides UCP n'induisent pas de cellules CD4+CD25+Foxp3 spécifiques. Des souris Tg A2/DR1 ont été immunisées une fois avec les peptides. Après 10 jours, la population Treg CD4+CD25+Foxp3 a été analysée dans le sang et la rate. **(A)** Mesure *ex vivo* du pourcentage de cellules CD25+Foxp3⁺ dans la population des LT CD4⁺ du sang et de la rate. **(B)** Restimulation *in vitro* des Treg. Les fractions CD4+CD25⁺ et CD4+CD25⁻ isolés des rates de souris immunisées sont restimulées *in vitro* en présence de CPA chargées ou non avec le peptide correspondant (40μg/mL) pendant 4 jours. Le pourcentage de cellules Foxp3⁺ dans chaque fraction est évalué par cytométrie de flux. Les cellules stimulées par l'IL-2 sont utilisées comme contrôle positif. Les barres représentent la moyenne de chaque groupe (n=3).

L'ensemble de ces résultats suggère que les UCP ne seraient pas reconnus par les Treg. Cependant cette approche n'est pas optimale puisque les LT activés expriment CD25 et le kit de purification des Treg utilisé repose sur une sélection basée sur un anticorps anti-CD25. De plus Foxp3 peut être exprimé par les LT activés (Kryczek, Liu et al. 2009), ce qui rend difficile l'interprétation des résultats.

Pour mieux étudier la question concernant la reconnaissance des UCP par les Treg, nous disposons très récemment dans le laboratoire d'un modèle de souris transgéniques HLA-A2/DR1/Foxp3-GFP⁺. Ces souris issues du croisement entre les souris A2/DR1 et les souris

transgéniques Foxp3 (Fontenot et al. 2005) qui expriment le facteur de transcription Foxp3 couplé à une protéine fluorescente (GFP). Leur utilisation combinée à des tétramères HLA-DR-UCP permettra de détecter aisément la présence éventuelle de Treg spécifiques des UCP.

II. Etude du rôle helper des UCP sur les réponses CTL antitumorales

Les lymphocytes CD4 Th1 sont nécessaires à la génération et la persistance des réponses CTL anti-tumorales. Ces lymphocytes contrôlent également la fonction des NK et des macrophages, deux autres acteurs importants de l'immunité antitumorale (Hung, Hayashi et al. 1998; Perez-Diez, Joncker et al. 2007). Ainsi il est clairement démontré que la stimulation des LT CD4 de type-1 augmente l'efficacité de différentes stratégies d'immunothérapies antitumorales (Ossendorp, Mengede et al. 1998; Wong, Bos et al. 2008; Gritzapis et al. 2010). L'approche peptidique est la plus utilisée pour stimuler les LT CD4 et pour cela des peptides restreints HLA classe II ont donc été identifiés. Ces peptides communément appelés « peptide helper » sont dérivés d'antigènes tumoraux microbiens (Pajot, Schnuriger et al. 2007; Nakanishi, Lu et al. 2009), ou synthétiques tels PADRE (Alexander et al. 1994). Cependant, les fonctions et le rôle thérapeutique de ces peptides helper ne sont pas pleinement étudiés et la connaissance de la plasticité potentielle des réponses T CD4 constitue une limite à leur développement clinique (Ahmadzadeh and Farber 2002; Muranski and Restifo 2009).

Ainsi le modèle de souris Tg A2/DR1 nous a permis d'étudier le rôle helper des UCP sur les CTL antitumoraux ainsi que la fonction thérapeutique des LT CD4 anti-UCP *in vivo*.

Pour évaluer les fonctions helper, nous avons effectué des expériences dans lesquelles les souris étaient coimmunisées avec des peptides dérivés de hTERT restreints HLA-A2.1 (p572 ou p988) avec ou sans UCP. L'adjuvant incomplet de Freund (IFA) a été utilisé comme adjuvant dans toutes nos expériences. L'originalité du modèle tient également du fait que les séquences d'acides aminés des deux peptides restreints HLA-A2.1 sont conservées entre hTERT et la télomérase murine mTERT, et sont de ce fait des peptides du soi chez les souris. p572 et p988 sont des peptides cryptiques et la substitution du premier acide aminé par une tyrosine (pY572, pY988) augmente leur affinité pour HLA-A2.1 ainsi que leur immunogénicité (Hernandez et al. 2002; Scardino et al. 2002). De plus ces peptides sont testés dans des essais cliniques de vaccinations dans certains cancers (Bolonaki et al. 2007; Kotsakis et al. 2012).

Chez les souris immunisées, l'analyse par tétramère de la fréquence des LT CD8 spécifiques induits a montré une augmentation significative des LT CD8 anti-pY988 dans le groupe ayant

reçu un vaccin contenant UCP à l'exception d'UCP1. En revanche la fonctionnalité de ces LT CD8 analysée par ELISPOT IFN γ *ex vivo* (Adotevi, Mollier et al. 2010) montre que tous les UCP, y compris UCP1, sont capables d'induire des réponses CTL anti-pY988 par comparaison avec les souris vaccinées avec pY988 uniquement.

Nous avons démontré que l'intensité des réponses CTL spécifiques était corrélée avec l'amplitude et la fonctionnalité des LT CD4 anti-UCP induites simultanément *in vivo*. Ainsi la meilleure réponse CTL a été détectée en présence de LT CD4 spécifiques d'UCP2, liée à la capacité de ces cellules à produire efficacement l'IFN γ et l'IL-2 qui sont deux cytokines nécessaires à l'induction et l'expansion des réponses CTL (Greenberg 1991; Bourgeois and Tanchot 2003; Shedlock and Shen 2003; Janssen, Droin et al. 2005).

La cytotoxicité et l'avidité étant deux fonctions critiques pour les CTL antitumorales, nous avons focalisé la suite de notre étude sur UCP2 qui stimule la réponse CD4 Th1 la plus efficace. Ainsi nous avons montré que des CTL fraîchement isolés de souris immunisées par la combinaison pY988 + UCP2, produisent efficacement l'IFN-g en réponse à de faible dose de peptide pY988 $<10^{-3}$ μ g/mL. Ces CTL sont également capables de réagir efficacement en présence de la forme native p988 témoignant de leur bonne avidité. En utilisant un test de cytotoxicité *in vivo* (Rusakiewicz, Dosset et al. 2010), nous avons également montré une forte activité lytique chez les souris coimmunisées avec pY988 + UCP2 alors qu'elle est quasiment nulle chez les souris immunisées avec pY988 seul. Ces résultats confirment la forte avidité des CTL spécifiques de pY988 induits *in vivo* en présence d'UCP2. De même en utilisant un test de cytotoxicité au chrome, nous avons montré que les CTL anti-pY988 induits chez les souris vaccinées avec pY988 + UCP2 étaient également capables de lyser plus efficacement des cellules B16 TERT⁺ et exprimant HLA-A2⁺. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant le deuxième peptide du soi dérivé d'hTERT pY572, démontrant clairement qu'UCP2 favorise une rupture de tolérance contre les peptides TERT du soi. Nos résultats confirment les travaux antérieurs ayant montré que pour induire des réponses CTL efficaces lors d'une vaccination avec un peptide CD8 il faut nécessairement une aide délivrée par les LT CD4 (Fayolle et al. 1991). Des observations similaires ont été rapportées concernant la vaccination avec les peptides dérivés de TERT pY572 et pY988 utilisés dans notre étude (Hernandez, Garcia-Pons et al. 2002; Scardino, Gross et al. 2002; Gross et al. 2004). Paradoxalement ces peptides sont actuellement testés en essai clinique chez l'homme sans adjonction d'une stimulation T CD4 (Bolonaki, Kotsakis et al. 2007).

Par ailleurs, il a été démontré que les réponses CTL mémoires induites en absence d'aide fournie par les LT CD4 sont inefficaces (Shedlock and Shen 2003; Rocha and Tanchot 2004). Pour vérifier ce fait, nous avons étudié l'impact des LT CD4 spécifiques de UCP2 sur les

réponses CTL mémoires. Les souris TgA2/DR1 ont été immunisées avec pY988 +/- UCP2 et les réponses CTL ont été analysées un mois après la vaccination. Une réponse CTL mémoire spécifique de pY988 efficace n'a été détectée que chez les souris co-immunisées avec UCP2 et cette réponse était clairement corrélée avec la persistance *in vivo* des LT CD4 anti-UCP2 capables de produire l'IFN γ .

Différents mécanismes helper peuvent être utilisés par les LT CD4 pour le contrôle des réponses CTL antitumorales durant les phases d'inductions et effectrices de la réponse antitumorale (Rocha and Tanchot 2004; Kennedy and Celis 2008). Ainsi l'induction d'une activation des DC par les LT CD4 Th1, permettant une présentation antigénique et une costimulation efficaces pour les CTL, représente un des mécanismes majeurs (Ridge, Di Rosa et al. 1998). Nous avons montré que les LT CD4 anti-UCP2 agissent via ce modèle dit de « ménage à 3 » en induisant *in vivo* la maturation des cellules dendritiques qui à leur tour produisent l'IL-12 cytokine essentielle pour la différenciation Th1 (Snijders, Kalinski et al. 1998). Cette activation des DC est partiellement inhibée par l'utilisation d'anticorps bloquant l'interaction CD40-CD40L et/ou l'IFN γ avec son récepteur.

Afin d'évaluer l'effet de UCP2 au cours d'une vaccination thérapeutique antitumorale, nous avons utilisé le modèle de mélanome B16-HLA-A2.1+ (Adotevi, Mollier et al. 2010). Cette tumeur exprime la télomérase murine qui partage plus de 70% d'homologie avec hTERT (Greenberg et al. 1998). De plus nous avons montré que cette lignée était reconnue par des CTL spécifiques des peptides pY572 et pY988 dérivés de la télomérase et conservés entre l'homme et la souris (Scardino, Gross et al. 2002). Des souris Tg A2/DR1 porteuses d'un mélanome B16 exprimant HLA-A2 ont ainsi été vaccinées avec les peptides pY572/pY988 +/- UCP2. Nos résultats ont montré une régression tumorale complète chez 63% des souris ayant reçu un vaccin contenant UCP2 comparé à 13% chez les souris immunisées uniquement avec les peptides pY572/pY988. L'analyse des réponses T post-vaccinales chez les souris protégées a montré la présence de LT CD4 et CTL anti-TERT fonctionnels dans la rate et les ganglions.

Récemment, des travaux ont montré que les LT CD4 spécifiques d'antigènes tumoraux sont nécessaires pour le recrutement des CTL dans la tumeur (Wong, Bos et al. 2008; Bos and Sherman 2010). Nakanishi et al. ont également rapporté des propriétés similaires des LT CD4 dans l'adressage des CTL antiviraux vers le site de l'infection (Nakanishi, Lu et al. 2009).

Nous avons montré dans le modèle B16/A2 que les souris vaccinées thérapeutiquement en présence du peptide helper UCP2 présentaient une infiltration tumorale massive par des CTL spécifiques anti-TERT. Ces résultats confirment les données précédentes et expliquent la

meilleure protection antitumorale observée chez les souris ayant reçu le vaccin contenant UCP2.

En utilisant le modèle de souris HHD (transgéniques HLA-A2) Gross et al. avaient montré qu'une vaccination prophylactique avec les mêmes peptides TERT pY572 et pY988 en présence d'un peptide helper dérivé du virus de l'hépatite B, induisait une protection tumorale chez seulement 25% des souris (Gross, Graff-Dubois et al. 2004). Bien que le modèle tumoral soit différent du notre (EL4-HHD), ces résultats suggèrent que la stimulation d'une réponse T CD4 helper inappropriée (antivirale) ne favorise pas une migration des CTL effecteurs vers le site tumoral. Cette hypothèse peut expliquer les résultats récents d'un essai clinique de vaccination peptidique dans le mélanome. Dans cette étude comportant deux bras, l'un utilise des peptides CD8 associés à un peptide helper dérivé du tétanos, et l'autre utilise les mêmes peptides CD8 mais avec un pool de peptides helper dérivés d'antigènes du mélanome (Slingluff, Petroni et al. 2011). Une forte induction de CTL spécifiques a été observée chez plus de 90% des patients ayant reçu le peptide helper dérivé du tétanos contre seulement 19% dans le bras peptides helper de mélanome. De façon surprenante le bénéfice clinique était strictement identique dans les deux bras.

L'ensemble de ces observations ainsi que nos résultats soulignent l'intérêt pour l'immunothérapie de stimuler des réponses T CD4 antitumorales appropriées et efficaces. L'utilisation des UCP représente ainsi une méthode innovante et attractive pour atteindre ce but.

Par ailleurs, des résultats préliminaires ont montré qu'une vaccination thérapeutique avec les UCP utilisés seuls était capable d'induire une régression tumorale chez les souris Tg A2/DR1. Nous avons pu détecter chez ces souris ainsi traitées des réponses CTL spécifiques de peptides restreints HLA-A2.1 et dérivés des UCP. Cette capacité à stimuler à la fois des réponses T CD4 et CD8 concomitantes pourrait également expliquer l'efficacité antitumorale des UCP. Ces nouvelles données se rapprochent de celles obtenues par le groupe de Lang avec un peptide CD4 dérivé de MELOE-1 (Rogel et al. 2010), ou par le groupe de Gaudernack concernant le GV1001, un peptide CD4 dérivé de la télomérase (Inderberg-Suso et al. 2012).

Les résultats cliniques encourageants obtenus avec le vaccin peptidique CD4 dérivé de la télomérase GV1001, confortent nos espoirs concernant le développement futur des UCP en clinique. Toutefois le vaccin GV1001 n'a montré un bénéfice chez les patients que lorsqu'il est associé à la chimiothérapie ou radiothérapie (Brunsvig et al. 2006; Kyte et al. 2011; Inderberg-Suso, Trachsel et al. 2012).

Les UCP pourront également servir pour le développement de vaccins à base de longs-peptides (SLP, Synthetic Long Peptide) associant des épitopes CD4 helper et CD8 antitumoraux, et qui présentent l'avantage d'être efficacement apprêtés et présentés par les cellules dendritiques (Melief and van der Burg 2008). Enfin les peptides UCP peuvent être utilisés pour les stratégies de transfert adoptif de lymphocytes T en cancérologie (Jotereau et al. 2012). Ainsi des TCR transgéniques dérivés de clones T CD4 anti-UCP sont en cours de développement dans le laboratoire et pourront à terme servir pour optimiser le transfert adoptif.

III. Utilisation des UCP pour une analyse dynamique des réponses spontanées T CD4 anti-tumorales

Nos travaux ont permis la caractérisation de peptides CD4 dérivés de TERT capables de lier un grand nombre d'allèles HLA-DR appelés UCP. Nous avons utilisé les UCP pour évaluer les réponses T CD4 antitumorales au sein d'une cohorte prospective de patients atteints de cancer bronchique métastatique avant la première ligne de chimiothérapie. La réactivité des LT en présence des peptides UCP a été réalisée par ELISPOT IFN γ après un cycle de sensibilisation in vitro en présence des peptides.

Une première analyse portant sur 84 patients avait montré la présence de LT CD4 spécifiques des UCP chez 38% (32/84) des patients avant traitement. Une exploration élargie du profil de cytokines par un test ELISA multiplex a clairement montré que les réponses T anti-UCP détectées chez les patients avaient une polarisation de type Th1. Une recherche de LT CD4 spécifiques des UCP réalisée dans les mêmes conditions chez 22 donneurs sains a été négative.

Différentes observations nous ont permis d'éliminer une anergie lymphocytaire T pouvant expliquer l'absence de réponses T anti-UCP chez les 52 autres patients :

- i) Le taux de positivité des réponses antivirales mesuré simultanément était strictement identique chez les patients avec et sans réponse T CD4 anti-UCP.
- ii) Certains paramètres associés à l'immunosuppression dans les cancers tels que : un taux de Treg circulant élevé était détecté chez des patients mais sans différence entre les deux groupes (UCP répondeurs vs non répondeurs)
- iii) L'évaluation des réponses T spécifiques de la survivine, un deuxième antigène tumoral de type universel, a été réalisée chez ces patients. Globalement, la fréquence de réponses T anti-survivine retrouvée dans la cohorte (< 10%) est très faible comparée à celle dirigée contre TERT (résultats non publiés).

Bien que l'expression tumorale de TERT n'ait pas encore été analysée au sein de la cohorte, ces résultats démontrent l'existence d'une réponse Th1 spécifique de la télomérase chez certains patients même à un stade avancé de la maladie. Néanmoins, il paraît intéressant de rechercher un lien entre le niveau d'expression de TERT et la fréquence/intensité des réponses spontanées observées chez les patients. Pour cela nous avons débuté la mise au point d'une immunohistochimie et une méthode basée sur le test TRAP pour analyser l'expression de TERT sur les coupes de paraffine et les biopsies respectivement.

Cependant TERT est exprimée dans la majorité des cancers bronchiques (cf chapitre 'télomérase'), et une surexpression de TERT est associée à un facteur de mauvais pronostic dans les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) (Marchetti et al. 2002; Wu et al. 2003; Zhu et al. 2006). De plus, des polymorphismes du gène TERT ont été récemment rapportés comme facteur de prédisposition dans les cancers bronchiques non à petites cellules (Mocellin et al.).

Ainsi les réponses T CD4 anti-TERT retrouvées chez certains patients peuvent donc témoigner d'une immunité antitumorale préexistante. Ces résultats suggèrent également un rôle potentiel de TERT comme antigène tumoral impliqué dans l'immunosurveillance des cancers. Dans ce contexte, la présence de réponses T CD4 anti-TERT soulève la question de son rôle chez les patients.

Une première analyse a montré l'absence de corrélation entre la réponse T CD4 anti-UCP et les principales caractéristiques cliniques des patients (âge, sexe, état général ou encore sous-type histologique). De même la présence de cette réponse UCP n'avait pas d'impact sur la survie des patients sans prendre en compte la réponse après traitement.

Une seconde analyse de l'impact clinique de la réponse T spécifique a été réalisée dans le sous groupe de patients suivis sur une médiane de 10 mois après la première ligne de chimiothérapie à base de sels de platine. Parmi ces patients (n= 55), un groupe de 19 patients était considéré comme « progressEUR » et un deuxième de 36 patients comme « contrôleur » selon les critères RECIST 1.1. Nos résultats ont montré que la présence d'une réponse spontanée T CD4 anti-UCP n'a aucun effet chez les patients progressEURs. En revanche la présence de cette réponse chez les patients répondeurs est associée à un allongement significatif de la survie globale (13 vs 10 mois, $P < 003$). La préexistence de la réponse T CD4 anti-UCP n'a aucune influence sur la survie sans progression dans cette population. De même, aucune différence significative n'a été observée dans les deux groupes de patients selon le type de chimiothérapie de seconde intention utilisé notamment erlotinib, gemcitabine et taxane. Par ailleurs, les réponses T anti-virales mesurées dans le même temps chez les patients n'avaient aucune influence quelque soit le groupe de patients (contrôleurs ou progressEURs).

L'ensemble de ces résultats suggère fortement une synergie entre la présence d'une réponse T CD4 anti-TERT et l'efficacité de la chimiothérapie dans les cancers bronchiques et confirme le rôle prépondérant de l'immunité Th1 dans l'immunosurveillance des cancers.

Depuis les travaux pionniers de Guido Kroemer et Zitvogel il est admis que certains paramètres immunitaires pré-thérapeutiques peuvent influencer l'efficacité des

chimiothérapies (Zitvogel et al. 2011). En effet certains agents cytotoxiques ou les radiations ionisantes sont capables d'induire une mort tumorale dite immunogène modifiant les interactions entre la tumeur et l'environnement immunitaire. Par exemple les anthracyclines ou l'oxaliplatine ont montré leur capacité à faciliter la phagocytose des cellules tumorales par les cellules dendritiques via des mécanismes impliquant la calréticuline (CRT), HMGB1 (Apetoh et al. 2007) ou encore la voie ATP (Aymeric et al. 2010). Cette mort immunogène peut donc augmenter l'expression et la présentation des antigènes tumoraux rendant ainsi les cellules tumorales plus sensibles au système immunitaire. Certains agents cytotoxiques peuvent également moduler directement les acteurs de l'immunité soit en activant les cellules effectrices, soit en inhibant les cellules immunosuppressives (Zitvogel, Kepp et al. 2011).

En tenant compte de ces observations, une des hypothèses pouvant expliquer nos résultats est que chez les patients « contrôleurs », l'efficacité de la chimiothérapie à base de sels de platine entraînerait une lyse tumorale « immunogène » favorisant la libération et l'apprêtement de TERT par des CPA qui vont à leur tour stimuler des LT CD4 mémoires préexistants. A l'inverse lorsque la chimiothérapie est inefficace ce phénomène est absent ou sans effet pour permettre une activation des LT CD4 anti-TERT. Ceci peut expliquer pourquoi la présence de l'immunité T CD4 anti-UCP n'a aucune influence sur la survie globale des patients progressseurs après chimiothérapie (Godet et al. 2012).

Quelques semaines après notre publication Weide et al. ont montré que la présence de lymphocytes Th1 circulants spécifiques de Melan-A ou NY-ESO1 est un facteur indépendant de bon pronostic chez des patients atteints de mélanome métastatique traités par chimiothérapie (Weide et al. 2012). L'importance de cette relation entre lymphocytes T antitumeurs et l'efficacité des chimiothérapies conventionnelles peut également s'illustrer par des travaux récents montrant l'amplification des réponses immunitaires spécifiques chez des patients ayant été traités avec succès par des thérapies ciblées telles que Imatinib ou Vemurafenib inhibiteurs de c-Kit et BRAF respectivement (Chen et al. 2008; Hong et al. 2012).

Une analyse dynamique en pré et post-traitement de la réponse T CD4 spécifique de tumeur en utilisant par exemple les UCP, permettra une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la modulation de l'immunité T CD4 anti-UCP par les chimiothérapies conventionnelles ou thérapies ciblées. Cette question sera abordée dans une étude future menée au sein de l'UMR 1098 de Besançon.

Par ailleurs, l'implication du rôle important d'une immunité T spécifique chez les patients dans le contrôle des cancers bronchiques vient des résultats impressionnants du traitement par un anticorps bloquant l'interaction PD1/PD-L1 (Topalian et al. 2012). Ainsi

nous pensons que l'efficacité d'anticorps monoclonaux capables de lever l'inhibition des réponses lymphocytaires T antitumorales nécessite la présence préalable de ces lymphocytes chez les patients. Cette hypothèse est corroborée par les observations faites chez les patients atteints de mélanomes traités par l'anticorps anti-CTLA-4 (Ipilimumab). Une activation des réponses T spécifiques d'antigènes du mélanome est retrouvée chez certains patients et est souvent associée à l'efficacité du traitement (Robert and Mateus 2011).

Ainsi un monitoring des réponses T antitumorales spontanées en utilisant par exemple les UCP permettrait une meilleure sélection des patients pouvant bénéficier de ces traitements immuno-modulateurs. Nos résultats ouvrent également de nouvelles perspectives d'associations de chimiothérapies à une immunothérapie ciblant les lymphocytes CD4 Th1 anti-TERT.

CONCLUSION

Parmi les différentes sous-populations de LT CD4 identifiées, les lymphocytes Th1, caractérisés par la production de cytokines telles que IFN γ , TNF α , et IL-2, jouent un rôle majeur dans l'activation des réponses immunitaires antitumorales. Ils sont nécessaires à l'initiation et la fonction des cellules cytotoxiques, et préviennent également l'induction d'un état tolérogène. Durant ces dernières années, plusieurs groupes se sont intéressés à l'identification de peptides CD4 dérivés d'antigènes associés aux tumeurs dans le but d'améliorer les stratégies d'immunothérapies anticancéreuses et le suivi des réponses immunologiques associées. En effet, suivre la réponse immunitaire des patients s'avère essentiel pour définir des critères objectifs de choix de l'approche la plus appropriée à utiliser pour traiter le patient et pour corrélérer les réponses cliniques aux réponses T anti-tumorales observées.

Dans cette étude nous avons identifié de nouveaux peptides pan-HLA-DR dérivés de TERT, appelés UCP, capables de détecter efficacement des réponses CD4 Th1 spontanées chez des patients atteints de différents cancers. Leur utilisation au cours d'une vaccination anti-tumorale contribue à améliorer significativement l'efficacité des réponses CTL et la survie de souris porteuses de tumeurs. De manière intéressante, notre étude menée chez des patients atteints de cancer bronchique métastatique nous a également permis de mettre en évidence pour la première fois le lien entre l'immunité T CD4 anti-TERT spontanée et la réponse à la chimiothérapie.

Désormais il apparaît évident que certaines thérapies conventionnelles sont plus aptes que d'autres à induire une mort immunologique des cellules tumorales et à favoriser les réponses T anti-tumorales. Par conséquent leur sélection parallèlement à une immunothérapie anti-tumorale adaptée visant à stimuler à la fois les LT CD4 et les LT CD8 antitumoraux serait un bénéfice notable. Ainsi l'efficacité des vaccins anti-cancers pourrait émerger non pas en tant que monothérapie mais au sein d'une combinaison de traitements capables de stimuler l'immunité tout en inhibant les principales voies à l'origine de la tolérance immunitaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Adotevi, O., K. Mollier, et al. (2006). "Immunogenic HLA-B*0702-restricted epitopes derived from human telomerase reverse transcriptase that elicit antitumor cytotoxic T-cell responses." Clin Cancer Res **12**(10): 3158-67.
- Adotevi, O., K. Mollier, et al. (2010). "Targeting human telomerase reverse transcriptase with recombinant lentivector is highly effective to stimulate antitumor CD8 T-cell immunity in vivo." Blood **115**(15): 3025-32.
- Adotevi, O., H. Pere, et al. (2010). "A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients." J Immunother **33**(9): 991-8.
- Afkarian, M., J. R. Sedy, et al. (2002). "T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells." Nat Immunol **3**(6): 549-57.
- Ahmadzadeh, M. and D. L. Farber (2002). "Functional plasticity of an antigen-specific memory CD4 T cell population." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11802-7.
- Alexander, J., J. Sidney, et al. (1994). "Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides." Immunity **1**(9): 751-61.
- Almeida, J. R., D. A. Price, et al. (2007). "Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover." J Exp Med **204**(10): 2473-85.
- Amaravadi, R. K. "Cancer. Autophagy in tumor immunity." Science **334**(6062): 1501-2.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, et al. (2007). "The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy." Immunol Rev **220**: 47-59.
- Arai, J., M. Yasukawa, et al. (2001). "Identification of human telomerase reverse transcriptase-derived peptides that induce HLA-A24-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes." Blood **97**(9): 2903-7.
- Armstrong, T. D., V. K. Clements, et al. (1998). "MHC class II-transfected tumor cells directly present antigen to tumor-specific CD4+ T lymphocytes." J Immunol **160**(2): 661-6.
- Artandi, S. E., S. Alson, et al. (2002). "Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8191-6.
- Artandi, S. E. and R. A. DePinho (2000). "Mice without telomerase: what can they teach us about human cancer?" Nat Med **6**(8): 852-5.
- Asemissen, A. M., U. Keilholz, et al. (2006). "Identification of a highly immunogenic HLA-A*01-binding T cell epitope of WT1." Clin Cancer Res **12**(24): 7476-82.
- Audia, S., A. Nicolas, et al. (2007). "Increase of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic carcinoma: a Phase I clinical trial using cyclophosphamide and immunotherapy to eliminate CD4+ CD25+ T lymphocytes." Clin Exp Immunol **150**(3): 523-30.
- Aymeric, L., L. Apetoh, et al. (2010). "Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity." Cancer Res **70**(3): 855-8.
- Badoual, C., S. Hans, et al. (2006). "Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers." Clin Cancer Res **12**(2): 465-72.
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, et al. (2001). "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood." J Immunol **167**(3): 1245-53.
- Balachandran, V. P., M. J. Cavnar, et al. (2011). "Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido." Nat Med **17**(9): 1094-100.
- Banissi, C., F. Ghiringhelli, et al. (2009). "Treg depletion with a low-dose metronomic temozolomide regimen in a rat glioma model." Cancer Immunol Immunother **58**(10): 1627-34.

- Barbera-Guillem, E., K. F. May, Jr., et al. (1999). "Promotion of tumor invasion by cooperation of granulocytes and macrophages activated by anti-tumor antibodies." Neoplasia **1**(5): 453-60.
- Beatty, G. L. and R. H. Vonderheide (2008). "Telomerase as a universal tumor antigen for cancer vaccines." Expert Rev Vaccines **7**(7): 881-7.
- Beck, S., X. Jin, et al. (2011). "Telomerase activity-independent function of TERT allows glioma cells to attain cancer stem cell characteristics by inducing EGFR expression." Mol Cells **31**(1): 9-15.
- Ben-Shoshan, J., S. Maysel-Auslender, et al. (2008). "Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1alpha." Eur J Immunol **38**(9): 2412-8.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, et al. (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." Nature **393**(6684): 478-80.
- Blommaart, E. F., J. J. Luiken, et al. (1995). "Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes." J Biol Chem **270**(5): 2320-6.
- Bluestone, J. A. and A. K. Abbas (2003). "Natural versus adaptive regulatory T cells." Nat Rev Immunol **3**(3): 253-7.
- Bluestone, J. A., C. R. Mackay, et al. (2009). "The functional plasticity of T cell subsets." Nat Rev Immunol **9**(11): 811-6.
- Bolonaki, I., A. Kotsakis, et al. (2007). "Vaccination of patients with advanced non-small-cell lung cancer with an optimized cryptic human telomerase reverse transcriptase peptide." J Clin Oncol **25**(19): 2727-34.
- Bonertz, A., J. Weitz, et al. (2009). "Antigen-specific Tregs control T cell responses against a limited repertoire of tumor antigens in patients with colorectal carcinoma." J Clin Invest **119**(11): 3311-21.
- Boon, T., E. De Plaen, et al. (1992). "Identification of tumour rejection antigens recognized by T lymphocytes." Cancer Surv **13**: 23-37.
- Bos, R. and L. A. Sherman (2010). "CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes." Cancer Res **70**(21): 8368-77.
- Bourgeois, C. and C. Tanchot (2003). "Mini-review CD4 T cells are required for CD8 T cell memory generation." Eur J Immunol **33**(12): 3225-31.
- Bourgeois, C., H. Veiga-Fernandes, et al. (2002). "CD8 lethargy in the absence of CD4 help." Eur J Immunol **32**(8): 2199-207.
- Breault, D. T., I. M. Min, et al. (2008). "Generation of mTert-GFP mice as a model to identify and study tissue progenitor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(30): 10420-5.
- Brown, E. J., P. A. Beal, et al. (1995). "Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo." Nature **377**(6548): 441-6.
- Brunda, M. J., L. Luistro, et al. (1993). "Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors." J Exp Med **178**(4): 1223-30.
- Brunsvig, P. F., S. Aamdal, et al. (2006). "Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer." Cancer Immunol Immunother **55**(12): 1553-64.
- Brustle, A., S. Heink, et al. (2007). "The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4." Nat Immunol **8**(9): 958-66.
- Bullock, T. N. and H. Yagita (2005). "Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8+ T cell responses in the absence of CD4+ T cells." J Immunol **174**(2): 710-7.
- Burnet, M. (1957). "Cancer; a biological approach. I. The processes of control." Br Med J **1**(5022): 779-86.
- Cao, X., S. F. Cai, et al. (2007). "Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance." Immunity **27**(4): 635-46.

- Carew, J. S., K. R. Kelly, et al. (2012). "Autophagy as a target for cancer therapy: new developments." Cancer Manag Res **4**: 357-65.
- Carreras, J., A. Lopez-Guillermo, et al. (2006). "High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma." Blood **108**(9): 2957-64.
- Chalmin, F., G. Mignot, et al. (2012). "Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression." Immunity **36**(3): 362-73.
- Chattopadhyay, S., S. Mehrotra, et al. (2006). "Effect of CD4+CD25+ and CD4+CD25- T regulatory cells on the generation of cytolytic T cell response to a self but human tumor-associated epitope in vitro." J Immunol **176**(2): 984-90.
- Cheever, M. A., J. P. Allison, et al. (2009). "The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research." Clin Cancer Res **15**(17): 5323-37.
- Chen, C. I., H. T. Maecker, et al. (2008). "Development and dynamics of robust T-cell responses to CML under imatinib treatment." Blood **111**(11): 5342-9.
- Chen, J. L., M. A. Blasco, et al. (2000). "Secondary structure of vertebrate telomerase RNA." Cell **100**(5): 503-14.
- Chen, M. L., M. J. Pittet, et al. (2005). "Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(2): 419-24.
- Chen, X., O. Laur, et al. (2002). "Regulated expression of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO during antigen-dependent and antigen-independent phases of B cell development." J Exp Med **195**(8): 1053-62.
- Chen, Z., A. Laurence, et al. (2006). "Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(21): 8137-42.
- Ciofani, M., A. Madar, et al. (2012). "A validated regulatory network for th17 cell specification." Cell **151**(2): 289-303.
- Cochlovius, B., M. Linnebacher, et al. (1999). "Recombinant gp100 protein presented by dendritic cells elicits a T-helper-cell response in vitro and in vivo." Int J Cancer **83**(4): 547-54.
- Cogulu, O., B. Kosova, et al. (2004). "Evaluation of telomerase mRNA (hTERT) in childhood acute leukemia." Leuk Lymphoma **45**(12): 2477-80.
- Cohen, P. A., L. Peng, et al. (2000). "CD4+ T cells in adoptive immunotherapy and the indirect mechanism of tumor rejection." Crit Rev Immunol **20**(1): 17-56.
- Colgin, L. M., C. Wilkinson, et al. (2000). "The hTERTalpha splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity." Neoplasia **2**(5): 426-32.
- Consogno, G., S. Manici, et al. (2003). "Identification of immunodominant regions among promiscuous HLA-DR-restricted CD4+ T-cell epitopes on the tumor antigen MAGE-3." Blood **101**(3): 1038-44.
- Conticello, C., F. Pedini, et al. (2004). "IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via up-regulation of antiapoptotic proteins." J Immunol **172**(9): 5467-77.
- Corthay, A., K. B. Lorvik, et al. (2011). "Is secretion of tumour-specific antigen important for cancer eradication by CD4(+) T cells?--Implications for cancer immunotherapy by adoptive T cell transfer." Scand J Immunol **73**(6): 527-30.
- Corthay, A., D. K. Skovseth, et al. (2005). "Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells." Immunity **22**(3): 371-83.
- Cote-Sierra, J., G. Foucras, et al. (2004). "Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(11): 3880-5.
- Cote, A. L., K. T. Byrne, et al. (2011). "Protective CD8 memory T cell responses to mouse melanoma are generated in the absence of CD4 T cell help." PLoS One **6**(10): e26491.

- Counter, C. M., A. A. Avilion, et al. (1992). "Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity." EMBO J **11**(5): 1921-9.
- Cox, A. L., J. Skipper, et al. (1994). "Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines." Science **264**(5159): 716-9.
- Crotty, S., R. J. Johnston, et al. (2010). "Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation." Nat Immunol **11**(2): 114-20.
- Crotzer, V. L. and J. S. Blum (2009). "Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation." J Immunol **182**(6): 3335-41.
- Crotzer, V. L. and J. S. Blum (2010). "Autophagy and adaptive immunity." Immunology **131**(1): 9-17.
- Curiel, T. J., G. Coukos, et al. (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." Nat Med **10**(9): 942-9.
- Curotto de Lafaille, M. A. and J. J. Lafaille (2009). "Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?" Immunity **30**(5): 626-35.
- Curtsinger, J. M., D. C. Lins, et al. (2003). "Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function." J Exp Med **197**(9): 1141-51.
- Dalgleish, A. and H. Pandha (2007). "Tumor antigens as surrogate markers and targets for therapy and vaccines." Adv Cancer Res **96**: 175-90.
- Dardalhon, V., A. Awasthi, et al. (2008). "IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3(-) effector T cells." Nat Immunol **9**(12): 1347-55.
- De Gassart, A., V. Camosseto, et al. (2008). "MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(9): 3491-6.
- De Monte, L., M. Reni, et al. (2011). "Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer." J Exp Med **208**(3): 469-78.
- de Vries, I. J., C. Castelli, et al. (2011). "Frequency of circulating Tregs with demethylated FOXP3 intron 1 in melanoma patients receiving tumor vaccines and potentially Treg-depleting agents." Clin Cancer Res **17**(4): 841-8.
- Delgoffe, G. M., K. N. Pollizzi, et al. (2011). "The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2." Nat Immunol **12**(4): 295-303.
- Dengjel, J., O. Schoor, et al. (2005). "Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(22): 7922-7.
- Dighe, A. S., E. Richards, et al. (1994). "Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors." Immunity **1**(6): 447-56.
- Ding, Z., C. J. Wu, et al. (2012). "Telomerase reactivation following telomere dysfunction yields murine prostate tumors with bone metastases." Cell **148**(5): 896-907.
- Ding, Z. C., L. Huang, et al. (2012). "Polyfunctional CD4⁺ T cells are essential for eradicating advanced B-cell lymphoma after chemotherapy." Blood **120**(11): 2229-39.
- Dudognon, C., F. Pendino, et al. (2004). "Death receptor signaling regulatory function for telomerase: hTERT abolishes TRAIL-induced apoptosis, independently of telomere maintenance." Oncogene **23**(45): 7469-74.
- Duhra, P. and A. Ilchyshyn (1991). "Prolonged survival in metastatic malignant melanoma associated with vitiligo." Clin Exp Dermatol **16**(4): 303-5.

- Dunn, W. A., Jr. (1990). "Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole." J Cell Biol **110**(6): 1923-33.
- Dwyer, J., H. Li, et al. (2007). "Transcriptional regulation of telomerase activity: roles of the Ets transcription factor family." Ann N Y Acad Sci **1114**: 36-47.
- Elkak, A., R. Mokbel, et al. (2006). "hTERT mRNA expression is associated with a poor clinical outcome in human breast cancer." Anticancer Res **26**(6C): 4901-4.
- Ellyard, J. I., L. Simson, et al. (2007). "Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe?" Tissue Antigens **70**(1): 1-11.
- Elyaman, W., E. M. Bradshaw, et al. (2009). "IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3⁺ natural regulatory T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(31): 12885-90.
- Emens, L. A., S. C. Silverstein, et al. (2012). "Toward integrative cancer immunotherapy: targeting the tumor microenvironment." J Transl Med **10**: 70.
- Erpenbeck, V. J., J. M. Hohlfeld, et al. (2003). "Increased expression of interleukin-9 messenger RNA after segmental allergen challenge in allergic asthmatics." Chest **123**(3 Suppl): 370S.
- Facciabene, A., X. Peng, et al. (2011). "Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells." Nature **475**(7355): 226-30.
- Falkensammer, C., K. Johrer, et al. (2006). "IL-4 inhibits the TNF-alpha induced proliferation of renal cell carcinoma (RCC) and cooperates with TNF-alpha to induce apoptotic and cytokine responses by RCC: implications for antitumor immune responses." Cancer Immunol Immunother **55**(10): 1228-37.
- Fayolle, C., E. Deriaud, et al. (1991). "In vivo induction of cytotoxic T cell response by a free synthetic peptide requires CD4⁺ T cell help." J Immunol **147**(12): 4069-73.
- Fazilleau, N., L. Mark, et al. (2009). "Follicular helper T cells: lineage and location." Immunity **30**(3): 324-35.
- Feng, J., W. D. Funk, et al. (1995). "The RNA component of human telomerase." Science **269**(5228): 1236-41.
- Ferguson, T. A., J. Choi, et al. (2011). "Armed response: how dying cells influence T-cell functions." Immunol Rev **241**(1): 77-88.
- Feurino, L. W., Y. Zhang, et al. (2007). "IL-6 stimulates Th2 type cytokine secretion and upregulates VEGF and NRP-1 expression in pancreatic cancer cells." Cancer Biol Ther **6**(7): 1096-100.
- Foley, E. J. (1953). "Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin." Cancer Res **13**(12): 835-7.
- Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, et al. (2005). "Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3." Immunity **22**(3): 329-41.
- Fridman, W. H., J. Galon, et al. (2011). "Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates." Cancer Res **71**(17): 5601-5.
- Galon, J., A. Costes, et al. (2006). "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome." Science **313**(5795): 1960-4.
- Gao, F. G., V. Khammanivong, et al. (2002). "Antigen-specific CD4⁺ T-cell help is required to activate a memory CD8⁺ T cell to a fully functional tumor killer cell." Cancer Res **62**(22): 6438-41.
- Gedde-Dahl, T., 3rd, J. A. Eriksen, et al. (1992). "T-cell responses against products of oncogenes: generation and characterization of human T-cell clones specific for p21 ras-derived synthetic peptides." Hum Immunol **33**(4): 266-74.
- Ghiringhelli, F., N. Larmonier, et al. (2004). "CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative." Eur J Immunol **34**(2): 336-44.
- Ghiringhelli, F., C. Menard, et al. (2006). "The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression." Immunol Rev **214**: 229-38.

- Ghiringhelli, F., C. Menard, et al. (2007). "Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients." *Cancer Immunol Immunother* **56**(5): 641-8.
- Ghiringhelli, F., P. E. Puig, et al. (2005). "Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation." *J Exp Med* **202**(7): 919-29.
- Girardi, M., D. E. Oppenheim, et al. (2001). "Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells." *Science* **294**(5542): 605-9.
- Gjertsen, M. K., T. Buanes, et al. (2001). "Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma." *Int J Cancer* **92**(3): 441-50.
- Gobert, M., I. Treilleux, et al. (2009). "Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome." *Cancer Res* **69**(5): 2000-9.
- Godet, Y., E. Fabre, et al. (2012). "Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T-cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes: potential synergistic effect with chemotherapy response." *Clin Cancer Res* **18**(10): 2943-53.
- Gondek, D. C., L. F. Lu, et al. (2005). "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." *J Immunol* **174**(4): 1783-6.
- Gonzalez-Suarez, E., E. Samper, et al. (2000). "Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis." *Nat Genet* **26**(1): 114-7.
- Greenberg, P. D. (1991). "Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells." *Adv Immunol* **49**: 281-355.
- Greenberg, R. A., R. C. Allsopp, et al. (1998). "Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation." *Oncogene* **16**(13): 1723-30.
- Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1985). "Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts." *Cell* **43**(2 Pt 1): 405-13.
- Gritzapis, A. D., I. F. Voutsas, et al. (2010). "Peptide vaccination breaks tolerance to HER-2/neu by generating vaccine-specific FasL(+) CD4(+) T cells: first evidence for intratumor apoptotic regulatory T cells." *Cancer Res* **70**(7): 2686-96.
- Gross, D. A., S. Graff-Dubois, et al. (2004). "High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy." *J Clin Invest* **113**(3): 425-33.
- Grossman, W. J., J. W. Verbsky, et al. (2004). "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death." *Immunity* **21**(4): 589-601.
- Guo, C., B. N. Armbruster, et al. (2003). "In vivo regulation of hTERT expression and telomerase activity by androgen." *J Urol* **170**(2 Pt 1): 615-8.
- Hahn, S., R. Gehri, et al. (1995). "Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity." *Immunol Rev* **146**: 57-79.
- Hahn, W. C., S. A. Stewart, et al. (1999). "Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells." *Nat Med* **5**(10): 1164-70.
- Hansen, T., A. Spurkland, et al. (1993). "Studies of the T-cell receptors of T cells recognizing the same HLA molecule." *Transplant Proc* **25**(1 Pt 1): 72.
- Harari, A., F. Vallelain, et al. (2004). "Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load." *Eur J Immunol* **34**(12): 3525-33.
- Hardtke, S., L. Ohl, et al. (2005). "Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help." *Blood* **106**(6): 1924-31.

- Heath, W. R. and F. R. Carbone (2001). "Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity." Annu Rev Immunol **19**: 47-64.
- Hegazy, A. N., M. Peine, et al. (2010). "Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions." Immunity **32**(1): 116-28.
- Helmich, B. K. and R. W. Dutton (2001). "The role of adoptively transferred CD8 T cells and host cells in the control of the growth of the EG7 thymoma: factors that determine the relative effectiveness and homing properties of Tc1 and Tc2 effectors." J Immunol **166**(11): 6500-8.
- Hernandez, J., F. Garcia-Pons, et al. (2002). "Identification of a human telomerase reverse transcriptase peptide of low affinity for HLA A2.1 that induces cytotoxic T lymphocytes and mediates lysis of tumor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12275-80.
- Hirahara, K., L. Liu, et al. (2006). "The majority of human peripheral blood CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells bear functional skin-homing receptors." J Immunol **177**(7): 4488-94.
- Hirahara, K., G. Vahedi, et al. (2011). "Helper T-cell differentiation and plasticity: insights from epigenetics." Immunology **134**(3): 235-45.
- Hisatomi, H., K. Ohyashiki, et al. (2003). "Expression profile of a gamma-deletion variant of the human telomerase reverse transcriptase gene." Neoplasia **5**(3): 193-7.
- Hiyama, E. and K. Hiyama (2002). "Clinical utility of telomerase in cancer." Oncogene **21**(4): 643-9.
- Hodi, F. S., S. J. O'Day, et al. (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." N Engl J Med **363**(8): 711-23.
- Hoffmeyer, K., A. Raggioli, et al. (2012). "Wnt/beta-catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells." Science **336**(6088): 1549-54.
- Hohn, H., H. Pilch, et al. (1999). "CD4⁺ tumor-infiltrating lymphocytes in cervical cancer recognize HLA-DR-restricted peptides provided by human papillomavirus-E7." J Immunol **163**(10): 5715-22.
- Honey, K. and A. Y. Rudensky (2003). "Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation." Nat Rev Immunol **3**(6): 472-82.
- Hong, D. S., L. Vence, et al. (2012). "BRAF(V600) inhibitor GSK2118436 targeted inhibition of mutant BRAF in cancer patients does not impair overall immune competency." Clin Cancer Res **18**(8): 2326-35.
- Horikawa, I., P. L. Cable, et al. (1999). "Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene." Cancer Res **59**(4): 826-30.
- Hu, B., D. C. Tack, et al. (2006). "Role of Smad3 in the regulation of rat telomerase reverse transcriptase by TGFbeta." Oncogene **25**(7): 1030-41.
- Hubbard, V. M., R. Valdor, et al. (2010). "Macroautophagy regulates energy metabolism during effector T cell activation." J Immunol **185**(12): 7349-57.
- Huber, M., A. Brustle, et al. (2008). "IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(52): 20846-51.
- Hung, K., R. Hayashi, et al. (1998). "The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response." J Exp Med **188**(12): 2357-68.
- Huysamen, C., J. A. Willment, et al. (2008). "CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3⁺ dendritic cells and a subset of monocytes." J Biol Chem **283**(24): 16693-701.
- Hwang, E. S., J. H. Hong, et al. (2005). "IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508." J Exp Med **202**(9): 1289-300.

- Iellem, A., M. Mariani, et al. (2001). "Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." *J Exp Med* **194**(6): 847-53.
- Inderberg-Suso, E. M., S. Trachsel, et al. (2012). "Widespread CD4+ T-cell reactivity to novel hTERT epitopes following vaccination of cancer patients with a single hTERT peptide GV1001." *Oncoimmunology* **1**(5): 670-686.
- Ito, T., S. Hanabuchi, et al. (2008). "Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery." *Immunity* **28**(6): 870-80.
- Jaeger, E., H. Bernhard, et al. (1996). "Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens." *Int J Cancer* **66**(2): 162-9.
- Jager, E., D. Jager, et al. (2000). "Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and recognized by CD4(+) T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma." *J Exp Med* **191**(4): 625-30.
- Janssen, E. M., N. M. Droin, et al. (2005). "CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death." *Nature* **434**(7029): 88-93.
- Jenner, R. G., M. J. Townsend, et al. (2009). "The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(42): 17876-81.
- Jensen, P. E. (2007). "Recent advances in antigen processing and presentation." *Nat Immunol* **8**(10): 1041-8.
- Jin, X., S. Beck, et al. (2010). "Human telomerase catalytic subunit (hTERT) suppresses p53-mediated anti-apoptotic response via induction of basic fibroblast growth factor." *Exp Mol Med* **42**(8): 574-82.
- Jordan, M. S., A. Boesteanu, et al. (2001). "Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide." *Nat Immunol* **2**(4): 301-6.
- Jotereau, F., N. Gervois, et al. (2012). "Adoptive transfer with high-affinity TCR to treat human solid tumors: how to improve the feasibility?" *Target Oncol* **7**(1): 3-14.
- Kanno, Y., G. Vahedi, et al. (2012). "Transcriptional and epigenetic control of T helper cell specification: molecular mechanisms underlying commitment and plasticity." *Annu Rev Immunol* **30**: 707-31.
- Kaplan, D. H., V. Shankaran, et al. (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7556-61.
- Katz, S. C., Z. M. Bamboat, et al. (2012). "Regulatory T Cell Infiltration Predicts Outcome Following Resection of Colorectal Cancer Liver Metastases." *Ann Surg Oncol*.
- Kawakami, Y., S. Eliyahu, et al. (1995). "Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression." *J Immunol* **154**(8): 3961-8.
- Kemp, R. A. and F. Ronchese (2001). "Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity." *J Immunol* **167**(11): 6497-502.
- Kennedy, R. and E. Celis (2008). "Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses." *Immunol Rev* **222**: 129-44.
- Kerzerho, J., O. Adotevi, et al. (2010). "The angiogenic growth factor and biomarker midkine is a tumor-shared antigen." *J Immunol* **185**(1): 418-23.
- Kitajima, M., T. Ito, et al. (2011). "Memory type 2 helper T cells induce long-lasting antitumor immunity by activating natural killer cells." *Cancer Res* **71**(14): 4790-8.
- Klingelhutz, A. J., S. A. Foster, et al. (1996). "Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16." *Nature* **380**(6569): 79-82.
- Klyushnenkova, E. N., J. Link, et al. (2005). "Identification of HLA-DRB1*1501-restricted T-cell epitopes from prostate-specific antigen." *Clin Cancer Res* **11**(8): 2853-61.

- Knutson, K. L. and M. L. Disis (2005). "Augmenting T helper cell immunity in cancer." Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord **5**(4): 365-71.
- Kobayashi, H. and E. Celis (2008). "Peptide epitope identification for tumor-reactive CD4 T cells." Curr Opin Immunol **20**(2): 221-7.
- Korn, T., E. Bettelli, et al. (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.
- Kotsakis, A., E. K. Vetsika, et al. (2012). "Clinical outcome of patients with various advanced cancer types vaccinated with an optimized cryptic human telomerase reverse transcriptase (TERT) peptide: results of an expanded phase II study." Ann Oncol **23**(2): 442-9.
- Kottke, T., L. Sanchez-Perez, et al. (2007). "Induction of hsp70-mediated Th17 autoimmunity can be exploited as immunotherapy for metastatic prostate cancer." Cancer Res **67**(24): 11970-9.
- Krams, M., B. Hero, et al. (2003). "Full-length telomerase reverse transcriptase messenger RNA is an independent prognostic factor in neuroblastoma." Am J Pathol **162**(3): 1019-26.
- Kroenke, M. A., D. Eto, et al. (2012). "Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation." J Immunol **188**(8): 3734-44.
- Kryczek, I., M. Banerjee, et al. (2009). "Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments." Blood **114**(6): 1141-9.
- Kryczek, I., R. Liu, et al. (2009). "FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease." Cancer Res **69**(9): 3995-4000.
- Kryczek, I., S. Wei, et al. (2007). "Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma." Cancer Res **67**(18): 8900-5.
- Kubo, M. and Y. Motomura (2012). "Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells." Front Immunol **3**: 275.
- Kyte, J. A., G. Gaudernack, et al. (2011). "Telomerase Peptide Vaccination Combined with Temozolomide: A Clinical Trial in Stage IV Melanoma Patients." Clin Cancer Res **17**(13): 4568-80.
- Labarriere, N., E. Diez, et al. (1997). "Optimal T cell activation by melanoma cells depends on a minimal level of antigen transcription." J Immunol **158**(3): 1238-45.
- Ladoire, S., F. Martin, et al. (2011). "Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer." Cancer Immunol Immunother **60**(7): 909-18.
- Langowski, J. L., X. Zhang, et al. (2006). "IL-23 promotes tumour incidence and growth." Nature **442**(7101): 461-5.
- Lechler, R., G. Aichinger, et al. (1996). "The endogenous pathway of MHC class II antigen presentation." Immunol Rev **151**: 51-79.
- Lee, B. J., S. G. Wang, et al. (2006). "The prognostic value of telomerase expression in peripheral blood mononuclear cells of head and neck cancer patients." Am J Clin Oncol **29**(2): 163-7.
- Lee, H. K., L. M. Mattei, et al. (2010). "In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells." Immunity **32**(2): 227-39.
- Lee, Y. K., H. Turner, et al. (2009). "Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage." Immunity **30**(1): 92-107.
- LeibundGut-Landmann, S., J. M. Waldburger, et al. (2004). "Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes." Eur J Immunol **34**(6): 1513-25.
- Lethe, B., S. Lucas, et al. (1998). "LAGE-1, a new gene with tumor specificity." Int J Cancer **76**(6): 903-8.
- Lewis, C. E. and J. W. Pollard (2006). "Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments." Cancer Res **66**(2): 605-12.

- Li, B. and T. de Lange (2003). "Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres." Mol Biol Cell **14**(12): 5060-8.
- Li, Y., L. X. Wang, et al. (2011). "Tumor-derived autophagosome vaccine: mechanism of cross-presentation and therapeutic efficacy." Clin Cancer Res **17**(22): 7047-57.
- Li, Y., L. X. Wang, et al. (2008). "Efficient cross-presentation depends on autophagy in tumor cells." Cancer Res **68**(17): 6889-95.
- Liao, C. T., J. Tung-Chieh Chang, et al. (2004). "Telomerase as an independent prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma." Head Neck **26**(6): 504-12.
- Lingner, J., T. R. Hughes, et al. (1997). "Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase." Science **276**(5312): 561-7.
- Lipponen, P. K., M. J. Eskelinen, et al. (1992). "Tumour infiltrating lymphocytes as an independent prognostic factor in transitional cell bladder cancer." Eur J Cancer **29A**(1): 69-75.
- Liu, T., L. Peng, et al. (2012). "Increased Circulating Th22 and Th17 Cells are Associated with Tumor Progression and Patient Survival in Human Gastric Cancer." J Clin Immunol.
- Liu, Y., P. Zhang, et al. (2008). "A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells." Nat Immunol **9**(6): 632-40.
- Liyanage, U. K., T. T. Moore, et al. (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." J Immunol **169**(5): 2756-61.
- Lord, G. M., R. M. Rao, et al. (2005). "T-bet is required for optimal proinflammatory CD4+ T-cell trafficking." Blood **106**(10): 3432-9.
- Lu, M. H., J. Q. Deng, et al. (2012). "Prognostic role of telomerase activity in gastric adenocarcinoma: A meta-analysis." Exp Ther Med **3**(4): 728-734.
- Lu, Y., S. Hong, et al. (2012). "Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo." J Clin Invest.
- Ma, H. L., M. J. Whitters, et al. (2004). "Tumor cells secreting IL-13 but not IL-13Ralpha2 fusion protein have reduced tumorigenicity in vivo." Int Immunol **16**(7): 1009-17.
- Maeji, N. J., A. M. Bray, et al. (1990). "Multi-pin peptide synthesis strategy for T cell determinant analysis." J Immunol Methods **134**(1): 23-33.
- Mandapathil, M., M. J. Szczepanski, et al. (2009). "Increased ectonucleotidase expression and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer." Clin Cancer Res **15**(20): 6348-57.
- Mandelboim, O., G. Berke, et al. (1994). "CTL induction by a tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma." Nature **369**(6475): 67-71.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, et al. (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." Nature **441**(7090): 231-4.
- Marchetti, A., C. Pellegrini, et al. (2002). "Prediction of survival in stage I lung carcinoma patients by telomerase function evaluation." Lab Invest **82**(6): 729-36.
- Martin-Orozco, N., P. Muranski, et al. (2009). "T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity." Immunity **31**(5): 787-98.
- Martin, F., L. Apetoh, et al. (2012). "Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF-beta-dependent immunosuppressive activity?" Trends Mol Med.
- Martin, J. A., B. R. DeYoung, et al. (2004). "Telomerase reverse transcriptase subunit expression is associated with chondrosarcoma malignancy." Clin Orthop Relat Res(426): 117-24.
- Marzo, A. L., B. F. Kinnear, et al. (2000). "Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity." J Immunol **165**(11): 6047-55.
- Matsushita, H., M. D. Vesely, et al. (2012). "Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting." Nature **482**(7385): 400-4.

- Mattes, J., M. Hulett, et al. (2003). "Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process." *J Exp Med* **197**(3): 387-93.
- McDevitt, H. O. and W. F. Bodmer (1974). "HL-A, immune-response genes, and disease." *Lancet* **1**(7869): 1269-75.
- Melief, C. J. and S. H. van der Burg (2008). "Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines." *Nat Rev Cancer* **8**(5): 351-60.
- Michaud, M., I. Martins, et al. (2011). "Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice." *Science* **334**(6062): 1573-7.
- Mizukami, Y., K. Kono, et al. (2008). "Localisation pattern of Foxp3+ regulatory T cells is associated with clinical behaviour in gastric cancer." *Br J Cancer* **98**(1): 148-53.
- Mocellin, S., D. Verdi, et al. "Telomerase reverse transcriptase locus polymorphisms and cancer risk: a field synopsis and meta-analysis." *J Natl Cancer Inst* **104**(11): 840-54.
- Modesti, A., L. Masuelli, et al. (1993). "Ultrastructural evidence of the mechanisms responsible for interleukin-4-activated rejection of a spontaneous murine adenocarcinoma." *Int J Cancer* **53**(6): 988-93.
- Morin, G. B. (1989). "The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats." *Cell* **59**(3): 521-9.
- Morse, M. A., A. C. Hobeika, et al. (2008). "Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines." *Blood* **112**(3): 610-8.
- Muhlethaler-Mottet, A., L. A. Otten, et al. (1997). "Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA." *EMBO J* **16**(10): 2851-60.
- Mukherjee, S., E. J. Firpo, et al. (2011). "Separation of telomerase functions by reverse genetics." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(50): E1363-71.
- Mumberg, D., P. A. Monach, et al. (1999). "CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15): 8633-8.
- Munz, C. (2012). "Antigen Processing for MHC Class II Presentation via Autophagy." *Front Immunol* **3**: 9.
- Muranski, P. and N. P. Restifo (2009). "Adoptive immunotherapy of cancer using CD4(+) T cells." *Curr Opin Immunol* **21**(2): 200-8.
- Muranski, P. and N. P. Restifo (2009). "Does IL-17 promote tumor growth?" *Blood* **114**(2): 231-2.
- Naito, Y., K. Saito, et al. (1998). "CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer." *Cancer Res* **58**(16): 3491-4.
- Nakanishi, Y., B. Lu, et al. (2009). "CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help." *Nature* **462**(7272): 510-3.
- Nakayamada, S., H. Takahashi, et al. (2012). "Helper T cell diversity and plasticity." *Curr Opin Immunol* **24**(3): 297-302.
- Nandakumar, J., C. F. Bell, et al. (2012). "The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity." *Nature*.
- Neefjes, J., M. L. Jongsma, et al. (2011). "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation." *Nat Rev Immunol* **11**(12): 823-36.
- Nielsen, M., C. Lundegaard, et al. (2008). "Quantitative predictions of peptide binding to any HLA-DR molecule of known sequence: NetMHCIIpan." *PLoS Comput Biol* **4**(7): e1000107.
- Nishikawa, H., E. Jager, et al. (2005). "CD4+ CD25+ regulatory T cells control the induction of antigen-specific CD4+ helper T cell responses in cancer patients." *Blood* **106**(3): 1008-11.

- Noman, M. Z., B. Janji, et al. (2011). "Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression." Cancer Res **71**(18): 5976-86.
- Numasaki, M., J. Fukushima, et al. (2003). "Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth." Blood **101**(7): 2620-7.
- O'Shea, J. J. and W. E. Paul (2010). "Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells." Science **327**(5969): 1098-102.
- Oh, B. K., H. Kim, et al. (2008). "High telomerase activity and long telomeres in advanced hepatocellular carcinomas with poor prognosis." Lab Invest **88**(2): 144-52.
- Oh, S., Y. Song, et al. (1999). "The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene." J Biol Chem **274**(52): 37473-8.
- Oh, S., Y. H. Song, et al. (2000). "Identification of Mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene." Oncogene **19**(11): 1485-90.
- Olver, S., P. Groves, et al. (2006). "Tumor-derived interleukin-4 reduces tumor clearance and deviates the cytokine and granzyme profile of tumor-induced CD8⁺ T cells." Cancer Res **66**(1): 571-80.
- Onizuka, S., I. Tawara, et al. (1999). "Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody." Cancer Res **59**(13): 3128-33.
- Osen, W., S. Soltek, et al. (2010). "Screening of human tumor antigens for CD4 T cell epitopes by combination of HLA-transgenic mice, recombinant adenovirus and antigen peptide libraries." PLoS One **5**(11): e14137.
- Ossendorp, F., E. Mengede, et al. (1998). "Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors." J Exp Med **187**(5): 693-702.
- Ostrand-Rosenberg, S. (2005). "CD4⁺ T lymphocytes: a critical component of antitumor immunity." Cancer Invest **23**(5): 413-9.
- Pages, F., J. Galon, et al. (2009). "Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored." Oncogene **29**(8): 1093-102.
- Pages, F., J. Galon, et al. (2010). "Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored." Oncogene **29**(8): 1093-102.
- Pajot, A., M. L. Michel, et al. (2004). "A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1-/HLA-DR1-transgenic H-2 class I-/class II-knockout mice." Eur J Immunol **34**(11): 3060-9.
- Pajot, A., A. Schnuriger, et al. (2007). "The Th1 immune response against HIV-1 Gag p24-derived peptides in mice expressing HLA-A02.01 and HLA-DR1." Eur J Immunol **37**(9): 2635-44.
- Paludan, C., D. Schmid, et al. (2005). "Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy." Science **307**(5709): 593-6.
- Pardoll, D. (2003). "Does the immune system see tumors as foreign or self?" Annu Rev Immunol **21**: 807-39.
- Pardoll, D. M. and S. L. Topalian (1998). "The role of CD4⁺ T cell responses in antitumor immunity." Curr Opin Immunol **10**(5): 588-94.
- Park, J. I., A. S. Venteicher, et al. (2009). "Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin." Nature **460**(7251): 66-72.
- Park, N. H., W. Guo, et al. (2001). "c-Myc and Sp1/3 are required for transactivation of hamster telomerase catalytic subunit gene promoter." Int J Oncol **19**(4): 755-61.
- Pascolo, S. (2005). "HLA class I transgenic mice: development, utilisation and improvement." Expert Opin Biol Ther **5**(7): 919-38.
- Pauletti, G., W. Godolphin, et al. (1996). "Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization." Oncogene **13**(1): 63-72.

- Peggs, K. S., S. A. Quezada, et al. (2009). "Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies." *J Exp Med* **206**(8): 1717-25.
- Pellegrini, M., T. Calzascia, et al. (2009). "Adjuvant IL-7 antagonizes multiple cellular and molecular inhibitory networks to enhance immunotherapies." *Nat Med* **15**(5): 528-36.
- Pere, H., Y. Montier, et al. (2011). "A CCR4 antagonist combined with vaccines induces antigen-specific CD8⁺ T cells and tumor immunity against self antigens." *Blood* **118**(18): 4853-62.
- Pere, H., C. Tanchot, et al. (2012). "Comprehensive analysis of current approaches to inhibit regulatory T cells in cancer." *Oncoimmunology* **1**(3): 326-333.
- Perez-Diez, A., N. T. Joncker, et al. (2007). "CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells." *Blood* **109**(12): 5346-54.
- Pericle, F., M. Giovarelli, et al. (1994). "An efficient Th2-type memory follows CD8⁺ lymphocyte-driven and eosinophil-mediated rejection of a spontaneous mouse mammary adenocarcinoma engineered to release IL-4." *J Immunol* **153**(12): 5659-73.
- Perricone, M. A., K. A. Smith, et al. (2004). "Enhanced efficacy of melanoma vaccines in the absence of B lymphocytes." *J Immunother* **27**(4): 273-81.
- Poremba, C., B. Heine, et al. (2002). "Telomerase as a prognostic marker in breast cancer: high-throughput tissue microarray analysis of hTERT and hTR." *J Pathol* **198**(2): 181-9.
- Poremba, C., H. Willenbring, et al. (1999). "Telomerase activity distinguishes between neuroblastomas with good and poor prognosis." *Ann Oncol* **10**(6): 715-21.
- Press, M. F., L. Bernstein, et al. (1997). "HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas." *J Clin Oncol* **15**(8): 2894-904.
- Pu, Z., S. B. Lovitch, et al. (2004). "T cells distinguish MHC-peptide complexes formed in separate vesicles and edited by H2-DM." *Immunity* **20**(4): 467-76.
- Purwar, R., C. Schlapbach, et al. (2012). "Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells." *Nat Med*.
- Puxeddu, I., D. Ribatti, et al. (2005). "Mast cells and eosinophils: a novel link between inflammation and angiogenesis in allergic diseases." *J Allergy Clin Immunol* **116**(3): 531-6.
- Qin, H., L. Wang, et al. (2009). "TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3." *J Immunol* **183**(1): 97-105.
- Qin, Z. and T. Blankenstein (2000). "CD4⁺ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells." *Immunity* **12**(6): 677-86.
- Rabinowitz, J. D. and E. White (2010). "Autophagy and metabolism." *Science* **330**(6009): 1344-8.
- Racek, T., N. Mise, et al. (2005). "C-terminal p73 isoforms repress transcriptional activity of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter." *J Biol Chem* **280**(49): 40402-5.
- Rammensee, H., J. Bachmann, et al. (1999). "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." *Immunogenetics* **50**(3-4): 213-9.
- Rapoport, A. P., E. A. Stadtmauer, et al. (2005). "Restoration of immunity in lymphopenic individuals with cancer by vaccination and adoptive T-cell transfer." *Nat Med* **11**(11): 1230-7.
- Rech, A. J. and R. H. Vonderheide (2009). "Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells." *Ann N Y Acad Sci* **1174**: 99-106.
- Ressing, M. E., A. Sette, et al. (1995). "Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro

- immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides." *J Immunol* **154**(11): 5934-43.
- Richardson, M. W., J. Jadowsky, et al. (2012). "Kruppel-like Factor 2 Modulates CCR5 Expression and Susceptibility to HIV-1 Infection." *J Immunol* **189**(8): 3815-21.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa, et al. (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell." *Nature* **393**(6684): 474-8.
- Rilke, F., M. I. Colnaghi, et al. (1991). "Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors." *Int J Cancer* **49**(1): 44-9.
- Robbins, P. F. and Y. Kawakami (1996). "Human tumor antigens recognized by T cells." *Curr Opin Immunol* **8**(5): 628-36.
- Robert, C. and C. Mateus (2011). "[Anti-CTLA-4 monoclonal antibody: a major step in the treatment of metastatic melanoma]." *Med Sci (Paris)* **27**(10): 850-8.
- Rocha, B. and C. Tanchot (2004). "CD8 T cell memory." *Semin Immunol* **16**(5): 305-14.
- Rodda, S. J. (2002). "Peptide libraries for T cell epitope screening and characterization." *J Immunol Methods* **267**(1): 71-7.
- Rogel, A., V. Vignard, et al. (2010). "A long peptide from MELOE-1 contains multiple HLA class II T cell epitopes in addition to the HLA-A*0201 epitope: an attractive candidate for melanoma vaccination." *Cancer Immunol Immunother* **60**(3): 327-37.
- Romero, P., J. C. Cerottini, et al. (2006). "The human T cell response to melanoma antigens." *Adv Immunol* **92**: 187-224.
- Roncarolo, M. G., S. Gregori, et al. (2006). "Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans." *Immunol Rev* **212**: 28-50.
- Ru, Z., W. Xiao, et al. (2012). "Development of a humanized HLA-A2.1/DP4 transgenic mouse model and the use of this model to map HLA-DP4-restricted epitopes of HBV envelope protein." *PLoS One* **7**(3): e32247.
- Rusakiewicz, S., M. Dosset, et al. (2010). "Immunogenicity of a recombinant lentiviral vector carrying human telomerase tumor antigen in HLA-B*0702 transgenic mice." *Vaccine* **28**(38): 6374-81.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* **155**(3): 1151-64.
- Samoszuk, M., T. Deng, et al. (2004). "Increased blood clotting, microvascular density, and inflammation in eotaxin-secreting tumors implanted into mice." *Am J Pathol* **165**(2): 449-56.
- Scardino, A., D. A. Gross, et al. (2002). "HER-2/neu and hTERT cryptic epitopes as novel targets for broad spectrum tumor immunotherapy." *J Immunol* **168**(11): 5900-6.
- Scheibenbogen, C., A. Schmittel, et al. (2000). "Phase 2 trial of vaccination with tyrosinase peptides and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic melanoma." *J Immunother* **23**(2): 275-81.
- Schenk, U., M. Frascoli, et al. (2011). "ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors." *Sci Signal* **4**(162): ra12.
- Schlie, K., J. E. Spowart, et al. (2011). "When Cells Suffocate: Autophagy in Cancer and Immune Cells under Low Oxygen." *Int J Cell Biol* **2011**: 470597.
- Schmitt, E. and T. Bopp (2012). "Amazing IL-9: revealing a new function for an "old" cytokine." *J Clin Invest*.
- Schoenberger, S. P., R. E. Toes, et al. (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." *Nature* **393**(6684): 480-3.
- Schreck, S., D. Friebel, et al. (2009). "Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma." *Hematol Oncol* **27**(1): 31-9.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, et al. (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." *Science* **331**(6024): 1565-70.

- Schreiber, T. H., D. Wolf, et al. (2012). "Tumor antigen specific iTreg accumulate in the tumor microenvironment and suppress therapeutic vaccination." Oncoimmunology **1**(5): 642-648.
- Schroers, R., X. F. Huang, et al. (2002). "Identification of HLA DR7-restricted epitopes from human telomerase reverse transcriptase recognized by CD4+ T-helper cells." Cancer Res **62**(9): 2600-5.
- Schroers, R., L. Shen, et al. (2003). "Human telomerase reverse transcriptase-specific T-helper responses induced by promiscuous major histocompatibility complex class II-restricted epitopes." Clin Cancer Res **9**(13): 4743-55.
- Schroers, R., L. Shen, et al. (2003). "Identification of MHC class II-restricted T-cell epitopes in prostate-specific membrane antigen." Clin Cancer Res **9**(9): 3260-71.
- Schultz, E. S., B. Lethe, et al. (2000). "A MAGE-A3 peptide presented by HLA-DP4 is recognized on tumor cells by CD4+ cytolytic T lymphocytes." Cancer Res **60**(22): 6272-5.
- Seder, R. A., P. A. Darrah, et al. (2008). "T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design." Nat Rev Immunol **8**(4): 247-58.
- Semmo, N., C. L. Day, et al. (2005). "Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection." Hepatology **41**(5): 1019-28.
- Shafer-Weaver, K. A., S. K. Watkins, et al. (2009). "Immunity to murine prostatic tumors: continuous provision of T-cell help prevents CD8 T-cell tolerance and activates tumor-infiltrating dendritic cells." Cancer Res **69**(15): 6256-64.
- Shah, S., A. A. Divekar, et al. (2005). "Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells." Int J Cancer **117**(4): 574-86.
- Shankaran, V., H. Ikeda, et al. (2001). "IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-11.
- Sharma, N. K., A. Reyes, et al. (2012). "Human telomerase acts as a hTR-independent reverse transcriptase in mitochondria." Nucleic Acids Res **40**(2): 712-25.
- Shedlock, D. J. and H. Shen (2003). "Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory." Science **300**(5617): 337-9.
- Shi, L. Z., R. Wang, et al. (2011). "HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells." J Exp Med **208**(7): 1367-76.
- Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-61.
- Slingluff, C. L., Jr., G. R. Petroni, et al. (2011). "Randomized multicenter trial of the effects of melanoma-associated helper peptides and cyclophosphamide on the immunogenicity of a multi-peptide melanoma vaccine." J Clin Oncol **29**(21): 2924-32.
- Smith, C. M., N. S. Wilson, et al. (2004). "Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity." Nat Immunol **5**(11): 1143-8.
- Smith, L. L., H. A. Collier, et al. (2003). "Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation." Nat Cell Biol **5**(5): 474-9.
- Snijders, A., P. Kalinski, et al. (1998). "High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals." Int Immunol **10**(11): 1593-8.
- Southwood, S., J. Sidney, et al. (1998). "Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires." J Immunol **160**(7): 3363-73.
- Stassar, M. J., L. Radrizzani, et al. (2001). "T-helper cell-response to MHC class II-binding peptides of the renal cell carcinoma-associated antigen RAGE-1." Immunobiology **203**(5): 743-55.
- Staudt, V., E. Bothur, et al. (2010). "Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells." Immunity **33**(2): 192-202.

- Stockinger, B. and M. Veldhoen (2007). "Differentiation and function of Th17 T cells." Curr Opin Immunol **19**(3): 281-6.
- Strauss, L., C. Bergmann, et al. (2007). "A unique subset of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment." Clin Cancer Res **13**(15 Pt 1): 4345-54.
- Stromhaug, P. E., T. O. Berg, et al. (1998). "Purification and characterization of autophagosomes from rat hepatocytes." Biochem J **335** (Pt 2): 217-24.
- Sun, J. C., M. A. Williams, et al. (2004). "CD4⁺ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8⁺ T cells after acute infection." Nat Immunol **5**(9): 927-33.
- Taieb, J., N. Chaput, et al. (2006). "Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines." J Immunol **176**(5): 2722-9.
- Takakura, M., S. Kyo, et al. (2005). "Function of AP-1 in transcription of the telomerase reverse transcriptase gene (TERT) in human and mouse cells." Mol Cell Biol **25**(18): 8037-43.
- Tan, T. T. and L. M. Coussens (2007). "Humoral immunity, inflammation and cancer." Curr Opin Immunol **19**(2): 209-16.
- Tanaka, H., J. Tanaka, et al. (2002). "Depletion of CD4⁺ CD25⁺ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor-draining lymph nodes." J Immunother **25**(3): 207-17.
- Taneja, V. and C. S. David (1998). "HLA transgenic mice as humanized mouse models of disease and immunity." J Clin Invest **101**(5): 921-6.
- Tartour, E., F. Fossiez, et al. (1999). "Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice." Cancer Res **59**(15): 3698-704.
- Tchirkov, A., C. Chaletix, et al. (2004). "hTERT expression and prognosis in B-chronic lymphocytic leukemia." Ann Oncol **15**(10): 1476-80.
- Tepper, R. I., R. L. Coffman, et al. (1992). "An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4." Science **257**(5069): 548-51.
- Terabe, M., S. Matsui, et al. (2000). "NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway." Nat Immunol **1**(6): 515-20.
- Terabe, M., J. M. Park, et al. (2004). "Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth." Cancer Immunol Immunother **53**(2): 79-85.
- Theobald, M., J. Biggs, et al. (1995). "Targeting p53 as a general tumor antigen." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 11993-7.
- Thomas, M., T. Suwa, et al. (2002). "Cooperation of hTERT, SV40 T antigen and oncogenic Ras in tumorigenesis: a cell transplantation model using bovine adrenocortical cells." Neoplasia **4**(6): 493-500.
- Toka, F. N., M. Gieryska, et al. (2005). "Rescue of memory CD8⁺ T cell reactivity in peptide/TLR9 ligand immunization by codelivery of cytokines or CD40 ligation." Virology **331**(1): 151-8.
- Topalian, S. L., C. G. Drake, et al. (2012). "Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity." Curr Opin Immunol **24**(2): 207-12.
- Tosolini, M., A. Kirilovsky, et al. (2011). "Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer." Cancer Res **71**(4): 1263-71.
- Touloukian, C. E., W. W. Leitner, et al. (2000). "Identification of a MHC class II-restricted human gp100 epitope using DR4-IE transgenic mice." J Immunol **164**(7): 3535-42.
- Trifari, S., C. D. Kaplan, et al. (2009). "Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells." Nat Immunol **10**(8): 864-71.

- Tsuda, H., T. Michimata, et al. (2001). "A novel surface molecule of Th2- and Tc2-type cells, CRTH2 expression on human peripheral and decidual CD4+ and CD8+ T cells during the early stage of pregnancy." *Clin Exp Immunol* **123**(1): 105-11.
- Tsuji, T., N. K. Altorki, et al. (2009). "Characterization of preexisting MAGE-A3-specific CD4+ T cells in cancer patients and healthy individuals and their activation by protein vaccination." *J Immunol* **183**(7): 4800-8.
- Ueda, A., L. Zhou, et al. (2012). "Fyn promotes Th17 differentiation by regulating the kinetics of RORgammat and Foxp3 expression." *J Immunol* **188**(11): 5247-56.
- Ulaner, G. A., J. F. Hu, et al. (1998). "Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts." *Cancer Res* **58**(18): 4168-72.
- van den Broeke, L. T., E. Daschbach, et al. (2003). "Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity." *J Immunol* **171**(11): 5842-52.
- van Elsas, A., S. H. van der Burg, et al. (1996). "Peptide-pulsed dendritic cells induce tumoricidal cytotoxic T lymphocytes from healthy donors against stably HLA-A*0201-binding peptides from the Melan-A/MART-1 self antigen." *Eur J Immunol* **26**(8): 1683-9.
- van Lith, M., R. M. McEwen-Smith, et al. (2010). "HLA-DP, HLA-DQ, and HLA-DR have different requirements for invariant chain and HLA-DM." *J Biol Chem* **285**(52): 40800-8.
- Venteicher, A. S., E. B. Abreu, et al. (2009). "A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis." *Science* **323**(5914): 644-8.
- Vignali, D. A., L. W. Collison, et al. (2008). "How regulatory T cells work." *Nat Rev Immunol* **8**(7): 523-32.
- Villadangos, J. A., P. Schnorrer, et al. (2005). "Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces." *Immunol Rev* **207**: 191-205.
- Visseren, M. J., S. H. van der Burg, et al. (1997). "Affinity, specificity and T-cell-receptor diversity of melanoma-specific CTL generated in vitro against a single tyrosinase epitope." *Int J Cancer* **72**(6): 1122-8.
- Volpert, O. V., T. Fong, et al. (1998). "Inhibition of angiogenesis by interleukin 4." *J Exp Med* **188**(6): 1039-46.
- von Euw, E., T. Chodon, et al. (2009). "CTLA4 blockade increases Th17 cells in patients with metastatic melanoma." *J Transl Med* **7**: 35.
- Vonderheide, R. H., K. S. Anderson, et al. (2001). "Characterization of HLA-A3-restricted cytotoxic T lymphocytes reactive against the widely expressed tumor antigen telomerase." *Clin Cancer Res* **7**(11): 3343-8.
- Wang, L., T. Yi, et al. (2009). "IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway." *J Exp Med* **206**(7): 1457-64.
- Wang, P., J. Sidney, et al. (2010). "Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules." *BMC Bioinformatics* **11**: 568.
- Wang, R. F. (2001). "The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity." *Trends Immunol* **22**(5): 269-76.
- Wang, R. F., X. Wang, et al. (1999). "Identification of a novel major histocompatibility complex class II-restricted tumor antigen resulting from a chromosomal rearrangement recognized by CD4(+) T cells." *J Exp Med* **189**(10): 1659-68.
- Wang, S. Y., Q. J. Yu, et al. (2011). "Core signaling pathways of survival/death in autophagy-related cancer networks." *Int J Biochem Cell Biol* **43**(9): 1263-6.
- Wang, X. F., W. M. Cohen, et al. (2007). "Selective identification of HLA-DP4 binding T cell epitopes encoded by the MAGE-A gene family." *Cancer Immunol Immunother* **56**(6): 807-18.

- Wang, X. F., J. Kerzerho, et al. (2008). "Comprehensive analysis of HLA-DR- and HLA-DP4-restricted CD4⁺ T cell response specific for the tumor-shared antigen survivin in healthy donors and cancer patients." *J Immunol* **181**(1): 431-9.
- Wang, Y. H., K. S. Voo, et al. (2010). "A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma." *J Exp Med* **207**(11): 2479-91.
- Weaver, C. T., L. E. Harrington, et al. (2006). "Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties." *Immunity* **24**(6): 677-88.
- Wei, G., L. Wei, et al. (2009). "Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4⁺ T cells." *Immunity* **30**(1): 155-67.
- Wei, S., E. Zhao, et al. (2012). "Th17 cells have stem cell-like features and promote long-term immunity." *Oncoimmunology* **1**(4): 516-519.
- Weide, B., H. Zelba, et al. (2012). "Functional T cells targeting NY-ESO-1 or Melan-A are predictive for survival of patients with distant melanoma metastasis." *J Clin Oncol* **30**(15): 1835-41.
- Weiner, H. L. (2001). "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells." *Immunol Rev* **182**: 207-14.
- Weinrich, S. L., R. Pruzan, et al. (1997). "Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT." *Nat Genet* **17**(4): 498-502.
- Wen, W., L. Zhang, et al. (2011). "Identification of promiscuous HLA-DR-restricted CD4(+) T-cell epitopes on the cancer-testis antigen HCA587." *Cancer Sci* **102**(8): 1455-61.
- Whitehead, R. P., D. Lew, et al. (2002). "Phase II trial of recombinant human interleukin-4 in patients with advanced renal cell carcinoma: a southwest oncology group study." *J Immunother* **25**(4): 352-8.
- Whitehead, R. P., J. M. Unger, et al. (1998). "Phase II trial of recombinant human interleukin-4 in patients with disseminated malignant melanoma: a Southwest Oncology Group study." *J Immunother* **21**(6): 440-6.
- Wiesel, M. and A. Oxenius (2012). "From crucial to negligible: functional CD8(+) T-cell responses and their dependence on CD4(+) T-cell help." *Eur J Immunol* **42**(5): 1080-8.
- Wilke, C. M., I. Kryczek, et al. (2011). "Th17 cells in cancer: help or hindrance?" *Carcinogenesis* **32**(5): 643-9.
- Wilson, N. J., K. Boniface, et al. (2007). "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells." *Nat Immunol* **8**(9): 950-7.
- Wolf, D., A. M. Wolf, et al. (2005). "The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer." *Clin Cancer Res* **11**(23): 8326-31.
- Wolf, P. R., S. Tourne, et al. (1998). "The phenotype of H-2M-deficient mice is dependent on the MHC class II molecules expressed." *Eur J Immunol* **28**(9): 2605-18.
- Wolfel, T., M. Hauer, et al. (1995). "A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma." *Science* **269**(5228): 1281-4.
- Wong, S. B., R. Bos, et al. (2008). "Tumor-specific CD4⁺ T cells render the tumor environment permissive for infiltration by low-avidity CD8⁺ T cells." *J Immunol* **180**(5): 3122-31.
- Wong, W. F., K. Kohu, et al. (2011). "Interplay of transcription factors in T-cell differentiation and function: the role of Runx." *Immunology* **132**(2): 157-64.
- Wu, T. C., P. Lin, et al. (2003). "Loss of telomerase activity may be a potential favorable prognostic marker in lung carcinomas." *Lung Cancer* **41**(2): 163-9.
- Yagi, R., I. S. Junttila, et al. (2010). "The transcription factor GATA3 actively represses RUNX3 protein-regulated production of interferon-gamma." *Immunity* **32**(4): 507-17.

- Yamane, H. and W. E. Paul (2012). "Cytokines of the gamma(c) family control CD4(+) T cell differentiation and function." Nat Immunol **13**(11): 1037-44.
- Yan, X., X. Zhang, et al. (2011). "Regulatory T-cell depletion synergizes with gp96-mediated cellular responses and antitumor activity." Cancer Immunol Immunother **60**(12): 1763-74.
- Yang, Y., J. Xu, et al. (2008). "T-bet and eomesodermin play critical roles in directing T cell differentiation to Th1 versus Th17." J Immunol **181**(12): 8700-10.
- Yao, Y., M. Bellon, et al. (2012). "Tumor suppressors p53, p63TAalpha, p63TAy, p73alpha, and p73beta use distinct pathways to repress telomerase expression." J Biol Chem **287**(24): 20737-47.
- Yoon, N. K., E. L. Maresh, et al. (2010). "Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer." Hum Pathol **41**(12): 1794-801.
- Zajac, A. J., K. Murali-Krishna, et al. (1998). "Therapeutic vaccination against chronic viral infection: the importance of cooperation between CD4+ and CD8+ T cells." Curr Opin Immunol **10**(4): 444-9.
- Zeng, G., C. E. Touloukian, et al. (2000). "Identification of CD4+ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by HLA-DR molecules." J Immunol **165**(2): 1153-9.
- Zhang, L., J. R. Conejo-Garcia, et al. (2003). "Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer." N Engl J Med **348**(3): 203-13.
- Zhou, L., J. E. Lopes, et al. (2008). "TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function." Nature **453**(7192): 236-40.
- Zhu, C. Q., J. C. Cutz, et al. (2006). "Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer." Br J Cancer **94**(10): 1452-9.
- Zhu, J. (2010). "Transcriptional regulation of Th2 cell differentiation." Immunol Cell Biol **88**(3): 244-9.
- Zhu, J. and W. E. Paul (2010). "Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors." Immunol Rev **238**(1): 247-62.
- Zhu, J., H. Yamane, et al. (2006). "GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors." Cell Res **16**(1): 3-10.
- Zhuang, Y., L. S. Peng, et al. (2012). "Increased intratumoral IL-22-producing CD4(+) T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival." Cancer Immunol Immunother.
- Zimmerli, S. C., A. Harari, et al. (2005). "HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(20): 7239-44.
- Zitvogel, L., O. Kepp, et al. (2011). "Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens." Nat Rev Clin Oncol **8**(3): 151-60.
- Zitvogel, L., A. Tesniere, et al. (2006). "Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion." Nat Rev Immunol **6**(10): 715-27.
- Zou, W. (2006). "Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy." Nat Rev Immunol **6**(4): 295-307.
- Zou, W., V. Machelon, et al. (2001). "Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells." Nat Med **7**(12): 1339-46.
- Zou, W. and N. P. Restifo (2010). "T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy." Nat Rev Immunol **10**(4): 248-56.

ANNEXES

AUTRES PUBLICATIONS



Immunogenicity of a recombinant lentiviral vector carrying human telomerase tumor antigen in HLA-B*0702 transgenic mice

Sylvie Rusakiewicz^{d,e,1}, Magalie Dosset^{c,d,1}, Karine Mollier^b, Philippe Souque^b, Pierre Charneau^b, Simon Wain-Hobson^a, Pierre Langlade-Demoyen^a, Olivier Adotévi^{a,c,d,*}

^a Unité de Rétrovirologie Moléculaire, Institut Pasteur, 25-28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

^b Unité de Virologie Moléculaire et Vectorologie, Institut Pasteur, 25-28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

^c Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U970, 56 rue Leblanc, 75015 Paris, France

^d UMRS 970, université Paris Descartes, France

^e INSERM U1015, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 February 2010

Received in revised form 8 June 2010

Accepted 22 June 2010

Available online 21 July 2010

Keywords:

Lentiviral vector

hTERT

CD8 T cells

ABSTRACT

Over expression of telomerase represents a hallmark of cancer cells and the induction of T cell immunity against this universal tumor antigen have gained promising interest for anticancer immunotherapy. In this study we evaluated a recombinant lentiviral vector expressing the human telomerase reverse transcriptase (lv-hTERT) vaccination in the humanized HLA-B*0702 transgenic (HLA-B7 Tg) mice. A single lv-hTERT vector immunization induces potent and broad HLA-B7-restricted CTL responses against hTERT. Unlike conventional hTERT peptide or DNA immunization, the lv-hTERT vector triggers high and sustained IFN- γ producing CD8⁺ T cell responses in HLA-B7 Tg mice. The avidity and *in vivo* cytotoxicity of CD8⁺ T cells were stronger in lv-hTERT vector-immunized mice than in hTERT peptide or DNA vaccinated groups. The study also showed that the use of prime-boost vaccination drastically improved the magnitude and strength of lentivector-primed CD8⁺ T cells. Our data indicated that lentiviral delivery of hTERT is suitable for enhancing cellular immunity against hTERT and offers a promising alternative for telomerase-based cancer vaccine.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Active cancer immunotherapy relies on the concept that tumor antigens are presented in the context of MHC molecules for recognition by specific effector T cells. In the past decade great efforts have been made to identify tumor-specific and tumor-associated antigens, which could be used to vaccinate cancer patients [1,2]. However, heterogeneous expression of most of the characterized tumor antigens limits the broad application of cancer vaccines that target such antigens. In addition, it is well established that therapeutic vaccine strategies targeting antigens that are not involved in tumor growth can result in the selection of antigen-loss tumor variants, leading to disease progression [3,4]. From this perspective, telomerase emerges as the first *bona fide* universal tumor antigen due to its over expression by the vast majority of tumors (>85%) from virtually all types of cancer and its inherent functional involvement in oncogenic transformation [5,6].

* Corresponding author at: INSERM U970 56 rue Leblanc, 75015 Paris, France.

Tel.: +33 1 56093980; fax: +33 1 56092080.

E-mail address: olivier.adotevi@egp.aphp.fr (O. Adotévi).

¹ Contributed equally.

Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is the catalytic subunit of telomerase enzyme that synthesizes telomeric DNA at chromosome ends. Telomerase activation is one of the most important tumor escape mechanisms to circumvent the telomere-dependent pathways of cell death [7,8]. All these findings justify the clinical applications of hTERT for anticancer immunotherapy. Broadly used in several anticancer vaccine trials, hTERT peptide vaccinations have been the mostly used approach during the past few years [9–13]. The relative ease of construction and production, chemical stability, and the lack of oncogenic potential have made the peptide-based vaccine approach very attractive. Nonetheless, several obstacles limit the widespread use of peptide vaccines such as HLA-restriction, low immunogenicity, the need for adjuvants and carriers, failure or absence of epitope expression on tumor cells, and low level of memory responses [14]. Consequently, it appears essential with regard to hTERT antigen to evaluate novel immunotherapeutic approaches, such as potent viral vectors capable of delivering hTERT *in vivo* [12,15].

Lentiviral particles are widely used as gene-transfer vectors that can achieve high transduction efficiency regardless of the proliferative status of the targeted cells. Their capacity to efficiently transduce dendritic cells (DCs) and to elicit potent humoral and cellular responses has prompted their evaluation as anticancer vac-

cine vectors with promising results [16,17]. We previously showed that the immunization of humanized MHC class I transgenic mice with recombinant lentivectors elicited strong antigen-specific CTL responses *in vivo* [18–20].

In this report we developed a lentivector expressing the full-length hTERT gene and evaluate its immunogenicity in human HLA-B*0702, double knockout H-2 K^bD^b transgenic mice HLA-B7 Tg. We compare the efficacy of the recombinant lv-hTERT vaccination with the hTERT-based peptide or DNA vaccination. We show that vaccination with lv-hTERT induced broad, strong and high avidity long-lasting hTERT-specific TCD8⁺ response compared to peptide plus adjuvant or DNA vaccinations. Our results strongly support the use of the lentivector hTERT vaccine as a new potential tool for telomerase-based active immunotherapy against cancers.

2. Materials and methods

2.1. Mice

H-2 K^bD^b class I knockout, HLA-B*0702 transgenic mice (HLA-B7 Tg) have been previously described [21]. Eight to ten-week-old female mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions in our animal facility (Institut Pasteur). All animal experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Laboratory of Animal Care Office at the Institut Pasteur.

2.2. Synthetic peptides and chemical reagents

The HLA-B*0702-restricted hTERT-derived peptides used in this study were previously described [22,23] and are shown in Table 1. All peptides were synthesized by PRIMM (Olgettina Milano, Italy). Incomplete Freund's adjuvant (IFA) and CpG ODN 1826 was purchased from Sigma (France).

2.3. Cell lines

HLA-B*0702-transfected TAP deficient RMA-S cells (RMA-S/B7) were used as target cells for *in vitro* cytotoxicity assay. Cells were cultured in RPMI supplemented with 10% foetal calf serum, 1% penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate (GIBCO).

2.4. Vector construction and production

The pTRIP-deltaU3-CMV-hTERT (referred as lv-hTERT, Fig. 1A) construct was created by first subcloning an EcoRI-Sall hTERT insert derived from the pBABE-hygro-hTERT plasmid (kindly provided by Dr. Robert Weinberg) into the pSP73 vector (Promega). The recombinant vector particles were produced as previously described. LTR:

long terminal repeat, cPPT: central polypurine tract, CTS: central termination sequence.

2.5. Immunizations

For lv-hTERT vector vaccination, HLA-B7 Tg mice were immunized by foot pad injection with 1×10^7 transduction units (TU) of recombinant lv-hTERT vector particles in 50 μ l (the same dose was used throughout the study). hTERT peptide immunization was performed with hTERT peptide plus adjuvant (p351 + adjuvant) consisting of s.c. injection of 100 μ g of p351 combined with 50 μ g of CpG emulsified in Incomplete Freund's adjuvant (IFA) at day 0 and day 14. DNA immunization consisted of intramuscular injection of 100 μ g of plasmid DNA encoding the full-length hTERT protein (pDNA/hTERT) at day 0 and day 14 as previously reported [22]. For prime-boost vaccination, mice were first injected with recombinant lv-hTERT (1×10^7 TU) and three weeks later a boost injection was performed with either 50 μ g of p351 peptide in IFA, or 100 μ g pDNA/hTERT. A group of mice received homologous boost with lv-hTERT as control.

2.6. *In vitro* CTL assay

Splenocytes from immunized mice were harvested 10 days following the last immunization and were stimulated *in vitro* with derived hTERT peptide for an additional 5–6 days [22]. The CTLs cytolytic activity was tested against RMA-S/B7 cells pulsed with hTERT peptide or irrelevant peptide in a standard ⁵¹chromium release assay.

2.7. Pentamer staining

Ficoll-purified splenocytes (1×10^6 cells) from immunized mice were incubated with PE-conjugated HLA-B*0702 pentamer recognizing the hTERT peptide p351 (p351/pentamer, ProImmune, UK) for 20 min at +4 °C. After two washes, cells were stained with anti-mouse CD8-APC (eBioscience, San Diego, CA) for 20 min at +4 °C. Irrelevant HLA-B*0702 pentamer recognizing a HIV gag-peptide (HIVgag/pentamer) was used as a control. Samples were analyzed by flow cytometry on a FACS Calibur.

2.8. IFN- γ ELISPOT assay

Ficoll-purified lymphocytes or CD8⁺ T splenocytes (CD8⁺ T cell isolation kit, Miltenyi, Biotec France) from immunized mice were incubated in triplicates, in ELISPOT plates in the presence of medium or hTERT peptide (10 μ g/mL unless otherwise specified). Plates were incubated for 18 h at 37 °C and the IFN- γ spots were

Table 1
In vitro CTL responses after immunization of HLA-B7 Tg mice with lv-hTERT particles.

hTERT peptides	Sequence	CTL responses		
		R/T	Responders (%)	Specific lysis
p1	MPRAPRCRA	3/6	50	28, 33, 21
p4	APRCRAVRSL	6/6	100	68, 57, 69, 74, 81, 55
p68	APSFQVSVSL	2/6	33	28, 43
p277	RPAAEEATSL	5/6	80	64, 22, 59, 41, 66
p342	RPSFLLSSL	2/6	33	21, 34
p351	RPSLTGARRL	6/6	100	100, 94, 100, 73, 69, 97
p464	FVRACLRRRL	2/6	33	41, 25
p1107	LPGTTLTAL	0/6		
p1123	LPSEDFKTL	4/6	66	61, 28, 52, 66

The following HLA-B*0702-restricted hTERT-derived peptides and their respective sequence have been already described [22,23]. HLA-B7 Tg mice were immunized s.c. with 1×10^7 TU of recombinant lv-hTERT vector. Ten days later, their splenocytes were restimulated *in vitro* with the indicated peptides (5 μ g/mL). Peptide-specific CTLs were tested 5–6 days after against RMA-S/HHd cells pulsed or not with corresponding peptide. Data represent the percent of (%) specific lysis of peptide-pulsed target cells at a 50:1 splenocyte/target ratio, after subtraction of non-specific lysis of non-pulsed target cells (between 0% and 8%). RT: number of responder/total number of immunized.

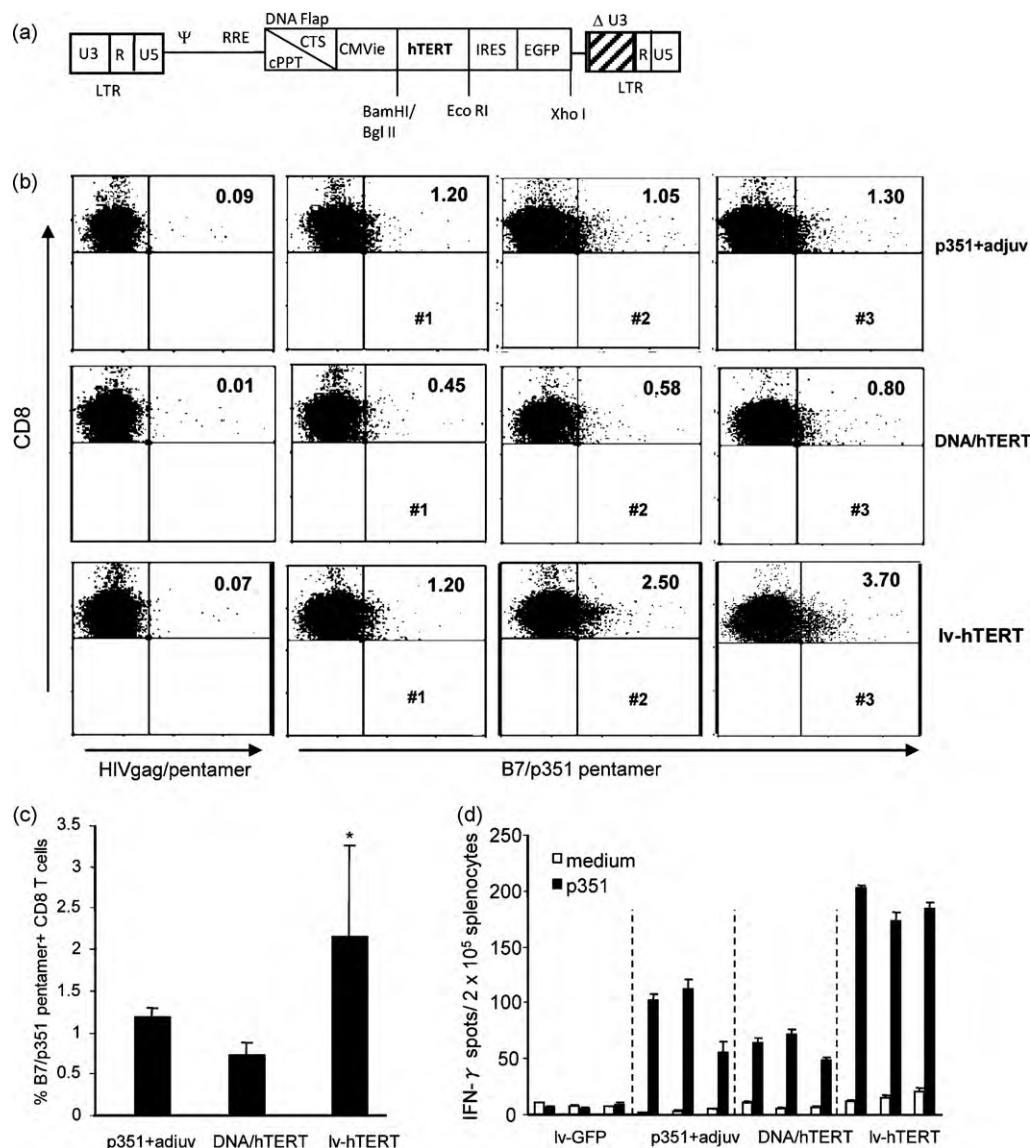


Fig. 1. Specific CD8⁺ T cell responses following hTERT-based lentivector, peptide and DNA vaccinations. (A) Schematic representation of the lentiviral vector encoding hTERT. The hTERT full-length sequence was inserted into the TRIP.Δ U3.BR.IRES green fluorescent protein (GFP) lentiviral vector as described in Section 2. The hTERT is under the control of the human cytomegalovirus early promoter (CMVie). (B) HLA-B7 Tg mice were immunized either with lv-hTERT vector particles (1×10^7 TU) or p351 + adjuvant or with pDNA/hTERT. The antigen-specific CD8⁺ T cells were monitored in the spleen 10 days later by using HLA-B7/p351 pentamer or control HLA-B7 HIV/gag pentamer staining. Three representative plots mice per group of immunization were shown. (C) The mean $\pm$ SD values obtained after subtraction of non-specific HIV/gag pentamer + cells is shown. (D) p351-specific IFN- γ -producing splenocytes were assessed *ex vivo* by ELISPOT assay 10 days after vaccination. The mean of specific IFN- γ spots $\pm$ SD in each group is depicted ($n = 4$ mice/group). One representative out of 3 experiments is shown. *Indicates values that were considered significant ($P < 0.05$, Mann–Whitney test).

revealed following manufacturer instructions (Diacalone, Besançon, France).

2.9. *In vivo* cytotoxicity

The *in vivo* CTL killing assays were performed using as targets, labeled peptide-pulsed syngenic splenocytes. Briefly, splenocytes from naive syngenic mice were labeled with high (5 μ M) or low (1 μ M) concentrations of CFSE (carboxyfluorescein-diacetate succinimidyl ester, Molecular Probes) for 10 min at 37 °C. Splenocytes labeled with high-CFSE were pulsed with the relevant p351 hTERT peptide and splenocytes labeled with low-CFSE served as non-pulsed target cells. Equal numbers of each fraction (high or low) were injected i.v. into immunized and control mice. After 15 h, single-cell suspensions from spleens were analyzed by flow cytometry. The disappearance of peptide-pulsed cells was determined by comparing the ratio of pulsed to non-pulsed populations in immu-

nized versus control non-immunized mice and the percentage of specific killing was calculated as previously described [20].

2.10. Statistics

The non-parametric Mann–Whitney test was used to compare CD8 T cell responses among the different groups of immunized mice. Statistically significant differences were considered at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Immunization of HLA-B7 transgenic mice with recombinant lv-hTERT vector induces broad CTL responses against hTERT

To evaluate whether immunization with the recombinant lv-hTERT vector (Fig. 1A) could stimulate a broad CTL response,

HLA-B*0702 transgenic mice (HLA-B7 Tg) were immunized in foot pads, with a single dose 1×10^7 TU of recombinant lv-hTERT vector. Ten days after immunization, splenocytes were stimulated *in vitro* with HLA-B7-restricted hTERT peptides and peptide-specific CTL responses were monitored by a ^{51}Cr -release assay. Results presented in Table 1 show that the immunization with lv-hTERT triggers CTL responses against the majority of hTERT epitopes tested (8 out of 9). Four hTERT epitopes (p4, p277, p351 and p1123) induced strong CTL responses in nearly all immunized mice using a cutoff value of 10% specific lysis (Table 1). CTL responses against the four remaining peptides (p1, p68, p342 and p464) encoded by the vector were found in at least one immunized mouse (30–50% of responders) however, the intensity of the responses was lower. For the one “missing” epitope, (p1107), specific lysis under 10% was measured (data not shown). Thus, lv-hTERT vector immunization is highly effective to stimulate polyspecific CTLs against hTERT, indicating an efficient processing of peptides derived from the hTERT protein encoded in the lentiviral vector particles.

3.2. The recombinant lv-hTERT vector induces a stronger hTERT-specific CD8⁺ T cell response than hTERT-based peptide or DNA immunization

Having established that our hTERT-encoding lentiviral vector efficiently stimulates a diversified CTL repertoire, we aimed to evaluate the magnitude and strength of the CD8⁺ T cell response that can be triggered by this vector. To this end, we focused specifically on the immune response against the high affinity HLA-B*0702-restricted hTERT peptide p351, which has been shown to be highly immunogenic in mouse and humans [22]. HLA-B7 Tg mice were immunized either with a single dose of recombinant lv-hTERT particles, with hTERT-based peptide (p351 + adjuvant) or with DNA pDNA/hTERT vaccine. The induction of p351-specific CD8⁺ T cells was evaluated *ex vivo* 10 days post-vaccination by specific hTERT pentamer staining. As shown in Fig. 1B, higher frequency of B7/p351 pentamer positive CD8⁺ T cells were detected in splenocytes derived from lentivector-immunized mice ($2.5 \pm 0.6\%$) while the frequencies were 2–5-fold increased in the lentivector-vaccinated mice group compared to p351 + adjuvant ($1 \pm 0.2\%$) or to pDNA/hTERT ($0.5 \pm 0.3\%$) vaccinated mice (Fig. 1C). As pentamer analysis does not discriminate between anergic and functional T cells, we examined *ex vivo*, the capacity of these antigen-specific T cells to produce IFN- γ by ELISPOT. In agreement with pentamer analysis, we observed greater numbers of p351-specific IFN- γ -producing cells in lv-hTERT-immunized mice than in the p351 + adjuvant or pDNA/hTERT-immunized mice (Fig. 1D). As expected, no specific T cell responses were found in mice injected with the control lentiviral empty vector lv-GFP (Fig. 1D). Similar CD8 responses were observed in a second set of experiments against another HLA-B7-restricted hTERT peptide (p277, data not shown), supporting the efficacy of our lv-hTERT vector to mount CD8⁺ T cell response against hTERT.

3.3. The CD8⁺ T cells activated with lv-hTERT showed high avidity and were effective for *in vivo* killing

Previous studies have demonstrated that the avidity of T cells is a major determinant of anti-tumor immunity [24]. Therefore we investigated the CD8⁺ T cell avidity in the different hTERT-based vaccination groups. Freshly isolated CD8 lymphocytes from immunized mice were cultured in the presence of decreasing concentrations of p351 peptide and their capacity to produce IFN- γ was measured by ELISPOT. As shown in Fig. 2A, higher numbers of CD8⁺ T cells isolated from lentivector-immunized were capable of producing IFN- γ after stimulation with very low concentration of p351 ($<10^{-4}$ $\mu\text{g/mL}$) suggesting that these cells display a spe-

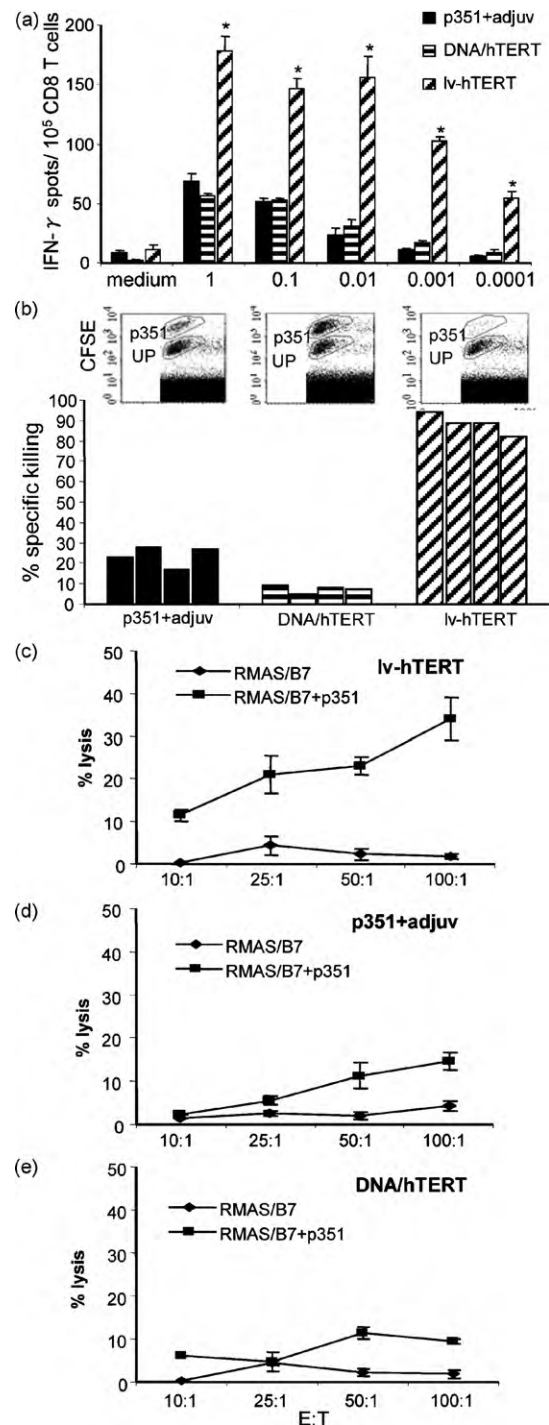


Fig. 2. Comparative analysis of T cells avidity and *in vivo* cytotoxicity. (A) In order to assess the T cell receptor avidity, HLA-B7 Tg mice were immunized as above. Ten days later spleen isolated CD8 T cells in each group were tested by *ex vivo* ELISPOT for their IFN- γ production in presence of decreasing p351 peptide concentration. One out of two representative experiments is shown ($n=3$ mice/group). (B) Ten days following vaccinations, HLA-B7 Tg mice were injected with 10^7 CFSE-labeled syngeneic splenocytes either pulsed with p351 peptide or unpulsed (UP). Mice spleen cells were harvested after 15 h and the disappearance of p351-pulsed cells in spleen was analyzed by flow cytometry. The percentage of specific lysis was calculated by comparing the ratio of pulsed to non-pulsed cells in vaccinated versus control mice. Representative FACS plot showing the elimination of target cells in each vaccinated group are shown. Bar represent individual mice in each group. (C–E) Spleen CD8⁺ T cells isolated from immunized mice were assayed for *ex vivo* cytotoxic activity against RMAS/B7 target cells pulsed or not with the p351 peptide was tested in a ^{51}Cr assay without any prior stimulation. One representative out of 2 experiments is shown ($n=3$ mice/group).

cific hTERT T cell receptor with high avidity. By contrast, CD8⁺ T cells from mice immunized with p351 + adjuvant or pDNA/hTERT did not respond to peptide concentration lower than 10^{-1} μ g/mL.

Next, we measured the *in vivo* cytolytic activity of the CD8⁺ T cells elicited by the respective hTERT-based immunization using an *in vivo* cytotoxic assay. As shown in Fig. 2B, a single immunization with lv-hTERT vector generated specific hTERT CTL capable of eliminating nearly all p351-pulsed target cells in mice (~90% of specific killing). In mice immunized with p351 + adjuvant, the specific *in vivo* killing activity was 5 times lower than in lv-hTERT

vaccinated group (~22% specific killing). No significant cytolytic responses were observed in mice injected with pDNA/hTERT (Fig. 2B). Furthermore, freshly isolated spleen CD8⁺ T cells from lv-hTERT-immunized mice were able to directly recognize and kill p351-loaded RMA/S/B7 cells without any step of *in vitro* stimulation (Fig. 2C). By contrast, CD8⁺ T cells derived from mice immunized with p351 + adjuvant or pDNA/hTERT showed low or no *ex vivo* killing of p351-pulsed RMA/S/B7 respectively (Fig. 2D and E). Thus lv-hTERT vector immunization can trigger CD8 T cells with strong *ex vivo* and *in vivo* cytolytic activity supporting their demonstrated high avidity.

3.4. Sustained hTERT-specific CD8 T responses induced with recombinant lv-hTERT vaccination

It has been suggested that the efficacy of an anticancer vaccine may be related to its ability to promote a sustained anti-tumor CD8 T cell response *in vivo* [25]. Therefore, we investigated the capacity of the lv-hTERT vector to stimulate long-lasting CD8⁺ T cell responses. Pentamer analyses performed 30 days after immunizations showed that greater numbers of p351/pentamer positive CD8 T cells persisted in the spleen of lentivector-immunized mice as compared to the peptide or DNA groups (Fig. 3A). When long term anti-hTERT CD8 T cells were measured by IFN- γ ELISPOT, significant p351-specific CD8⁺ T cells were detected in lv-hTERT vaccinated mice up to 60 days post-vaccination, supporting the pentamer staining analysis (Fig. 3B and C). Some p351-specific IFN- γ -producing cells were also detected in the comparative groups; however their numbers were very low.

3.5. Prime-boost vaccination strongly enhanced hTERT-specific CD8⁺ T cell responses

Heterologous prime-boost strategy has been shown to prevent the development of anti-lentivector immunity and to improve the breadth of the CD8⁺ T cell responses in lentivector-primed mice [26,27]. Therefore, we investigated the effect of an additional vaccine boost on lentivector-primed, p351-specific CD8⁺ T cell responses. To this end, mice received one injection of lv-hTERT vaccine followed, three weeks later, by a boost injection either with lv-hTERT, p351/IFA or pDNA/hTERT. The hTERT-specific CD8⁺ T cell responses were monitored 7 days after the boost. All the boost vaccine strategies successfully expanded p351-specific CD8⁺ T cells (Fig. 4A and B). The best responses were observed after the p351/IFA boost, with frequencies of B7/p351 pentamer positive CD8 T cells up to 6% of total CD8⁺ splenocytes. We found that homologous boost (two injections of lv-hTERT) also increased the numbers of hTERT-specific CD8⁺ T cells (Fig. 4A and B). The monitoring of the CD8⁺ T cell responses by *ex vivo* ELISPOT also showed that all boost injections enhanced the number of IFN- γ -producing cells in response to hTERT (Fig. 4C). Thus, both homologous and heterologous boosts strongly enhanced the magnitude and functionality of anti-hTERT CD8⁺ T cells following lv-hTERT vector immunization.

4. Discussion

Human telomerase reverse transcriptase (hTERT), represents a prototype of universal tumor antigen due to both its constitutive expression by the vast majority of tumors and its inherent functional involvement in oncogenic transformation. Indeed, it appears important with regard to hTERT to evaluate novel vaccine approaches capable to overcome HLA-restriction. In this study, we extend the use of lv-hTERT vector vaccine in the context of HLA-B*0702 allele, which is one frequent allele in Caucasian population that accounts for 15–20% [22]. We showed that the vaccination of HLA-B7 Tg mice with lv-hTERT vector induce high frequency of

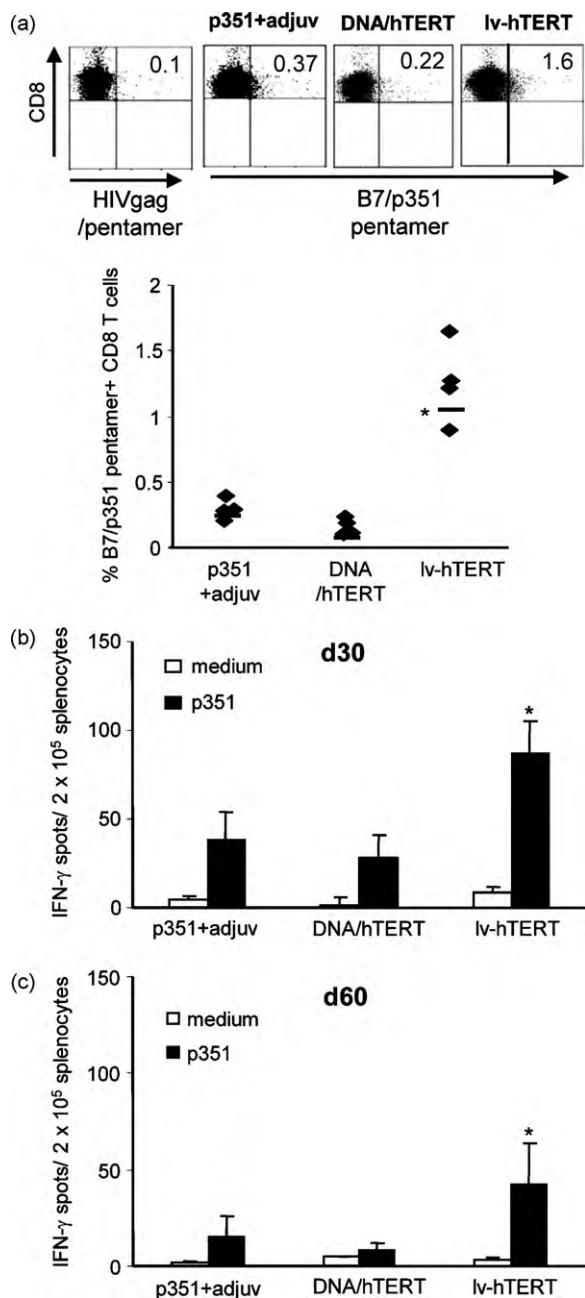


Fig. 3. Iv-hTERT vector vaccination induced long-lasting CD8⁺ T cell responses. (A) HLA-B7 Tg mice were immunized with a single injection lv-hTERT vector and p351-specific CD8⁺ T cells in the spleen were measured 30 days later by pentamer assay as above. The control mice were injected with p351 + adjuvant or pDNA/hTERT. (B and C) The specific IFN- γ production was tested 30 days (panel b) and 60 days (panel c) after the different vaccinations. Results from two representative experiments are shown ($n=6$ mice/group). *Indicates values that were considered significant ($P<0.05$).

fully functional and sustained hTERT-specific CD8⁺ T cell responses. The hTERT-specific CD8⁺ T cells activated with a lentivector also exhibit high avidity T cell receptor and strong *in vivo* cytotoxicity. The present study also suggests that the use of a lentiviral vector can greatly improve cellular immunity against hTERT *in vivo* as compared with hTERT-based peptide or DNA vaccines. We showed that two rounds of p351 peptide plus adjuvant (CpG and IFA) or pDNA/hTERT immunizations in HLA-B7 Tg mice induced approximately 0.5% and 1% of p351-specific CD8⁺ T cells respectively. By contrast, recombinant lv-hTERT vector induced as many as 3% of p351-specific CD8⁺ T cells that were highly functional.

Recently, our group has also demonstrated that lv-hTERT vaccination was capable of triggering a robust CD8⁺ T cell responses against hTERT in HLA-A*0201 mice model [28]. Indeed, we showed that lv-hTERT vaccination provided protective anti-tumor immunity in HHD mice [28]. Thus lentiviral vaccination can be broadly used to induce T cell specific responses in the context of several HLA types. It is worth noting that lentivector induces stronger hTERT-specific CD8⁺ T cells in HLA-B7 Tg mice than in HHD mice supporting our previous report [20]. It has also been described that individuals bearing both HLA-A*0201 and HLA-B*0702 alleles failed to respond to the HLA-A*0201 immuno-dominant CMV epitopes but mounted an HLA-B*0702-restricted CMV response demon-

strating that CMV-specific cellular immune responses restricted by HLA-B7 dominate those restricted by HLA-A2.1 [29]. Thus another advantage of lentiviral immunizations encoding full-length tumor antigen is to generate a broad antigen-specific T cell responses in the context of several HLA types, regardless of the immuno-dominance phenomena.

Our results are in agreement with previous studies that showed the capacity of lentivectors to trigger more potent anti-tumor T cell immunity than other viral vectors, genetic immunization, or peptide approaches [16,30–32]. For example, Chapatte et al. reported that vaccination with a lentivector carrying a Melan-A antigen was more effective for Melan-A-specific CD8⁺ T cells induction than free Melan-A peptide combining with CpG and IFA [27]. The major advantage of lentivectors is explained by their ability to efficiently target antigens to professional antigen presenting cells (APCs) notably to DCs [17,33]. In the case of plasmid DNA vaccination, the antigen presentation can also involve non-APCs such as keratinocytes or muscle cells that are not able to prime T cell responses [34]. In addition, when compared with naked plasmid DNA immunization, the lentivectors also triggered a more sustained production of antigen in transduced DCs *in vivo* that results in a longer presentation of the antigen which may provide a more efficient source of antigen for cross-priming [16]. Recently, it has been reported

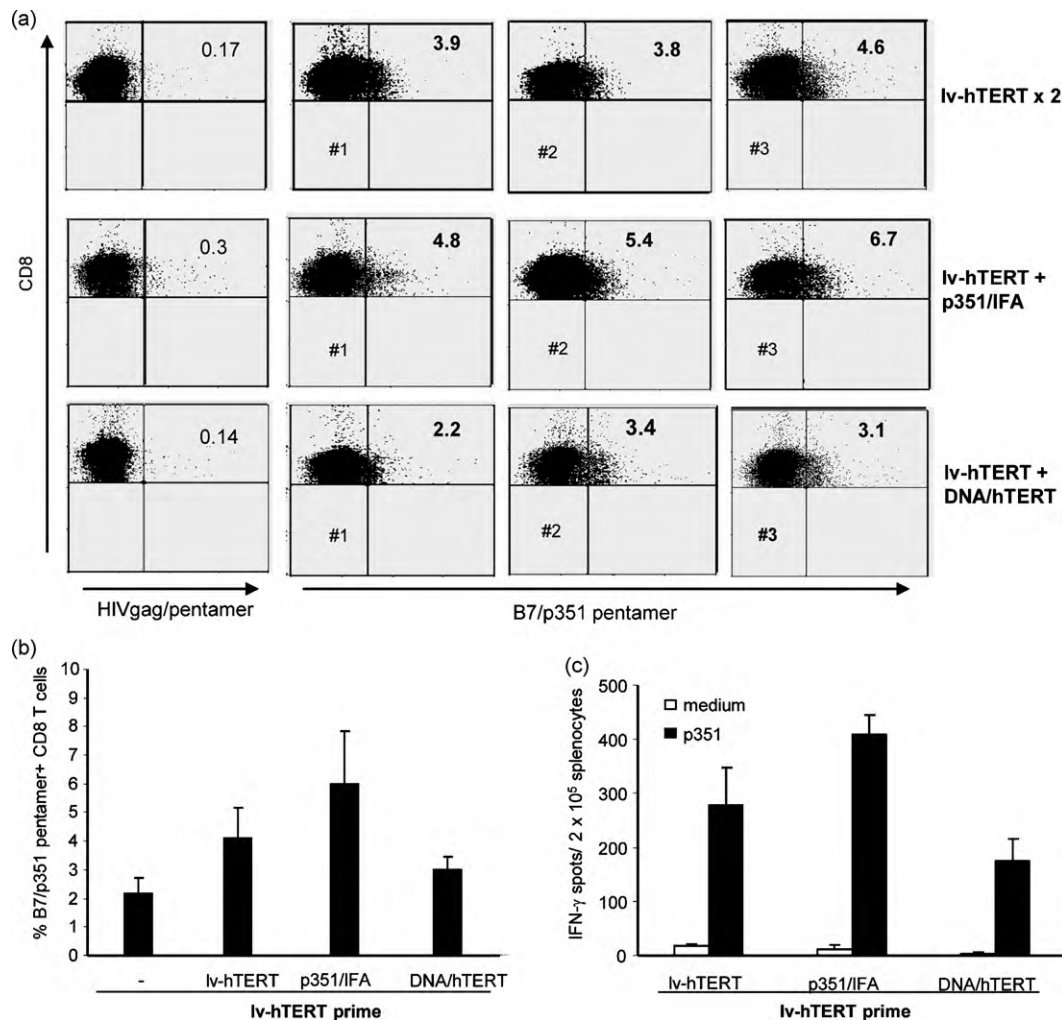


Fig. 4. Effect of homologous and heterologous boost on lv-hTERT vector primed CD8⁺ T cells. Mice were primed with lv-hTERT vector followed three weeks by a boost vaccination either with p351/IFA or DNA/hTERT (heterologous boost). Group of mice received homologous with the same lv-hTERT vector (homologous boost). (A) Pentamer staining was performed on harvested splenocytes 7 days after the last vaccination. Three representative plots mice per group of immunization were shown. (B) The mean $\pm$ SD of the pentamer frequency is shown ($n = 6$ mice/group). (C) hTERT-specific IFN- γ production of the splenocytes harvested from mice that received the different prime-boost vaccine is shown.

that lentivector-induced CD8⁺ T cells showed higher expression of interleukin-7 receptor α chain (IL-7R α , CD127) as compared to peptide-based vaccine [27,35]. Thus the expression of this survival/memory marker on antigen-specific CD8⁺ T cells may also contribute to the efficacy of lentivectors to promote sustained T cell responses *in vivo*.

A recent report showed that a lentivector that restricts antigen expression to the dectin-2⁺ (C-type lectin-like receptor) subset of CD11c⁺ DC is more effective in the induction of cellular immunity than conventional lentivectors [36]. Since we have not engineered the lv-hTERT vector to carry a “danger” signal and no adjuvant was combined with the immunization, we speculate that the lentivector itself was responsible for the DC activation *in vivo*. Indeed, *in vitro* experiments have shown that lentivectors are capable of providing the antigen and the appropriate signals to activate immature DCs [37]. In addition, lentivector constructions contain tubulovesicular structures that can trigger innate responses through TLR9 and induce maturation *in vivo* [38].

Heterologous prime-boost vaccination is one potent strategy to broaden and strengthen T cell responses [39]. Here, we used hTERT-derived peptide and DNA vaccinations to boost lentivector-immunized mice and showed a large expansion of anti-hTERT CD8 T cells *in vivo*. Although, pre-existing anti-lentivector immunity was not observed in the host, the choice of this heterologous prime-boost strategy was to bypass a possible anti-lentivector immunity that has been described after repetitive lentivector boosts [30,31]. However, in the present study, we also found that preexposure to immunizing doses of lv-hTERT vector does not inhibit the induction of immune response against encoded hTERT by a second vaccination with the same vector, suggesting that anti-vector immunity does not limit the immunogenicity of lv-hTERT vector vaccination at least after two injections.

Finally, lentiviral vector encoding full-length hTERT represent a potent strategy for active cancer immunotherapy with many advantages: (1) no HLA-restriction, (2) no need for additional adjuvant or carrier, (3) capacity to generate a strong polypeptide specific CD8⁺ T cell response thus potentially preventing tumor escape mechanisms, and (4) efficacy, even after a single injection, to induce a long-lasting memory response that could prevent the apparition of emerging tumor cells. This strategy can bypass many drawbacks of conventional cancer vaccines and could be applied to other broad tumor antigens.

Acknowledgements

We thank Pr. F. Lemonnier for providing HLA-B*0702 transgenic mice and RMA/HLA-B*0702 cell lines, Dr. Patrice Ravel for statistical analysis and Federico Sandoval for critical reading of the manuscript. This work was partially supported by Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France.

References

- [1] Rosenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 1999;10(3):281–7.
- [2] Romero P, Pittet M, Dutoit V, Zippelius A, Lienard D, Lejeune F, et al. Therapeutic cancer vaccines based on molecularly defined human tumor antigens. *Vaccine* 2002;20(Suppl. 4):A2–7.
- [3] Jager E, Ringhoffer M, Karbach J, Arand M, Oesch F, Knuth A. Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8⁺ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants *in vivo*. *Int J Cancer* 1996;66(May (4)):470–6.
- [4] Schmollinger JC, Vonderheide RH, Hoar KM, Maecker B, Schultze JL, Hodi FS, et al. Melanoma inhibitor of apoptosis protein (ML-IAP) is a target for immune-mediated tumor destruction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(March (6)):3398–403.
- [5] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266(December (5193)):2011–5.
- [6] Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997;33(5):787–91.
- [7] Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 2010;31(January (1)):9–18.
- [8] Blackburn EH. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett* 2005;579(February (4)):859–62.
- [9] Bernhardt SL, Gjertsen MK, Trachsel S, Moller M, Eriksen JA, Meo M, et al. Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: a dose escalating phase I/II study. *Br J Cancer* 2006;95(December (11)):1474–82.
- [10] Bolonaki I, Kotsakis A, Papadimitrakaki E, Aggouraki D, Konsolakis G, Vagia A, et al. Vaccination of patients with advanced non-small-cell lung cancer with an optimized cryptic human telomerase reverse transcriptase peptide. *J Clin Oncol* 2007;25(July (19)):2727–34.
- [11] Domchek SM, Recio A, Mick R, Clark CE, Carpenter EL, Fox KR, et al. Telomerase-specific T-cell immunity in breast cancer: effect of vaccination on tumor immunosurveillance. *Cancer Res* 2007;67(November (21)):10546–55.
- [12] Beatty GL, Vonderheide RH. Telomerase as a universal tumor antigen for cancer vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2008;7(September (7)):881–7.
- [13] Cortez-Gonzalez X, Zanetti M. Telomerase immunity from bench to bedside: round one. *J Transl Med* 2007;5:12.
- [14] Voskens CJ, Strome SE, Sewell DA. Synthetic peptide-based cancer vaccines: lessons learned and hurdles to overcome. *Curr Mol Med* 2009;9(August (6)):683–93.
- [15] Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2008;8(3):167–79.
- [16] He Y, Munn D, Falo Jr LD. Recombinant lentivector as a genetic immunization vehicle for antitumor immunity. *Expert Rev Vaccines* 2007;6(December (6)):913–24.
- [17] Breckpot K, Aerts JL, Thielemans K. Lentiviral vectors for cancer immunotherapy: transforming infectious particles into therapeutics. *Gene Ther* 2007;14(June (11)):847–62.
- [18] Firat H, Zennou V, Garcia-Pons F, Ginhoux F, Cochet M, Danos O, et al. Use of a lentiviral flap vector for induction of CTL immunity against melanoma. Perspectives for immunotherapy. *J Gene Med* 2002;4(January–February (1)):38–45.
- [19] Rohrlrich PS, Cardinaud S, Lule J, Montero-Julian FA, Prodhomme V, Firat H, et al. Use of a lentiviral vector encoding a HCMV-chimeric IE1-pp65 protein for epitope identification in HLA-transgenic mice and for ex vivo stimulation and expansion of CD8⁺ cytotoxic T cells from human peripheral blood cells. *Hum Immunol* 2004;65(May (5)):514–22.
- [20] Iglesias MC, Mollier K, Beignon AS, Souque P, Adotevi O, Lemonnier F, et al. Lentiviral vectors encoding HIV-1 polyepitopes induce broad CTL responses *in vivo*. *Mol Ther* 2007;15(6):1203–10.
- [21] Rohrlrich PS, Cardinaud S, Firat H, Lamari M, Briand P, Escriviou N, et al. HLA-B*0702 transgenic, H-2KbDb double-knockout mice: phenotypic and functional characterization in response to influenza virus. *Int Immunol* 2003;15(June (6)):765–72.
- [22] Adotevi O, Mollier K, Neuveut C, Cardinaud S, Boulanger E, Mignen B, et al. Immunogenic HLA-B*0702-restricted epitopes derived from human telomerase reverse transcriptase that elicit antitumor cytotoxic T-cell responses. *Clin Cancer Res* 2006;12(May (10)):3158–67.
- [23] Cortez-Gonzalez X, Sidney J, Adotevi O, Sette A, Millard F, Lemonnier F, et al. Immunogenic HLA-B7-restricted peptides of hTERT. *Int Immunol* 2006;18(12):1707–18.
- [24] Snyder JT, Alexander-Miller MA, Berzofsky JA, Belyakov IM. Molecular mechanisms and biological significance of CTL avidity. *Curr HIV Res* 2003;1(July (3)):287–94.
- [25] Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2002;2(April (4)):251–62.
- [26] Palmowski MJ, Lopes L, Ikeda Y, Salio M, Cerundolo V, Collins MK. Intravenous injection of a lentiviral vector encoding NY-ESO-1 induces an effective CTL response. *J Immunol* 2004;172(February (3)):1582–7.
- [27] Chapatte L, Colombetti S, Cerottini JC, Levy F. Efficient induction of tumor antigen-specific CD8⁺ memory T cells by recombinant lentivectors. *Cancer Res* 2006;66(January (2)):1155–60.
- [28] Adotevi O, Mollier K, Neuveut C, Dosset M, Ravel P, Fridman WH, et al. Targeting human telomerase reverse transcriptase with recombinant lentivector is highly effective to stimulate antitumor CD8 T-cell immunity *in vivo*. *Blood* 2010;115(April (15)):3025–32.
- [29] Lacey SF, Villacres MC, La Rosa C, Wang Z, Longmate J, Martinez J, et al. Relative dominance of HLA-B*07 restricted CD8⁺ T-lymphocyte immune responses to human cytomegalovirus pp65 in persons sharing HLA-A*02 and HLA-B*07 alleles. *Hum Immunol* 2003;64(April (4)):440–52.
- [30] Esslinger C, Chapatte L, Finke D, Miconnet I, Guillaume P, Levy F, et al. *In vivo* administration of a lentiviral vaccine targets DCs and induces efficient CD8⁺ T cell responses. *J Clin Invest* 2003;111(June (11)):1673–81.
- [31] Dullaers M, Van Meirvenne S, Heirman C, Straetman L, Bonehill A, Aerts JL, et al. Induction of effective therapeutic antitumor immunity by direct *in vivo* administration of lentiviral vectors. *Gene Ther* 2006;13(April (7)):630–40.
- [32] He Y, Zhang J, Mi Z, Robbins P, Falo Jr LD. Immunization with lentiviral vector-transduced dendritic cells induces strong and long-lasting T cell responses and therapeutic immunity. *J Immunol* 2005;174(March (6)):3808–17.
- [33] He Y, Zhang J, Donahue C, Falo Jr LD. Skin-derived dendritic cells induce potent CD8⁺ T cell immunity in recombinant lentivector-mediated genetic immunization. *Immunity* 2006;24(May (5)):643–56.

- [34] Rice J, Ottensmeier CH, Stevenson FK. DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8(February (2)):108–20.
- [35] Colombetti S, Levy F, Chapatte L. IL-7 adjuvant treatment enhances long-term tumor-antigen-specific CD8+ T-cell responses after immunization with recombinant lentivector. *Blood* 2009;113(June (26)):6629–37.
- [36] Lopes L, Dewannieux M, Gileadi U, Bailey R, Ikeda Y, Whittaker C, et al. Immunization with a lentivector that targets tumor antigen expression to dendritic cells induces potent CD8+ and CD4+ T-cell responses. *J Virol* 2008;82(January (1)):86–95.
- [37] Breckpot K, Emeagi P, Dullaers M, Michiels A, Heirman C, Thielemans K. Activation of immature monocyte-derived dendritic cells after transduction with high doses of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 2007;18(June (6)):536–46.
- [38] Pichlmair A, Diebold SS, Gschmeissner S, Takeuchi Y, Ikeda Y, Collins MK, et al. Tubulovesicular structures within vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped lentiviral vector preparations carry DNA and stimulate antiviral responses via Toll-like receptor 9. *J Virol* 2007;81(January (2)):539–47.
- [39] Schneider J, Gilbert SC, Hannan CM, Degano P, Prieur E, Sheu EG, et al. Induction of CD8+ T cells using heterologous prime-boost immunisation strategies. *Immunol Rev* 1999;170(August):29–38.

Targeting human telomerase reverse transcriptase with recombinant lentivector is highly effective to stimulate antitumor CD8 T-cell immunity in vivo

Olivier Adotévi,¹⁻³ Karine Mollier,⁴ Christine Neuveut,⁵ Magalie Dosset,² Patrice Ravel,⁶ Wolf-Hervé Fridman,³ Eric Tartour,^{2,3} Pierre Charneau,⁴ Simon Wain-Hobson,¹ and Pierre Langlade-Demoyen¹

¹Unité de Rétrovirologie Moléculaire, Institut Pasteur, Paris; ²Inserm U970, Paris; ³Hôpital Européen Georges Pompidou Assistance Publique-Hopitaux de Paris (AP-HP), Service d'Immunologie Biologique, Paris; ⁴Unité de Virologie Moléculaire et Vectorologie, Institut Pasteur, Paris; ⁵Unité d'Oncogenèse et Virologie Moléculaire Inserm U579, Institut Pasteur, Paris; and ⁶Centre de Biochimie Structurale, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Unité Mixte de Recherche (UMR) 504, Inserm UMR 554, and Université Montpellier, Montpellier, France

The success of active immunotherapy is based on the vaccine's ability to overcome immune tolerance through recalibrating the immune system so that it is able to recognize tumor antigens as foreign rather than self. In this study, we used a lentiviral vector system to target human telomerase reverse transcriptase (lv-hTERT), a widely expressed tumor antigen. Immunization of HLA-A*0201 transgenic HHD mice with recombinant lv-hTERT vector induces potent and

diversified cytotoxic T lymphocyte responses that recognize in vitro murine tumor cells, which overexpress telomerase. Compared with peptide-based vaccinations, the lv-hTERT vector triggers better and more sustained CD8⁺ T-cell response against self/TERT epitope in vivo. The study found that the additional use of a heterologous boosted vaccination drastically improves self/TERT-specific CD8 responses in lv-hTERT primed mice. Both primary and long-lasting self/TERT-specific

CD8⁺ T-cell responses induced with lv-hTERT vector required the presence of CD4 T cells in vivo. This lv-hTERT-based active immunotherapy efficiently inhibits the growth of telomerase expressing tumors (B16/HLA-A2.1 murine melanoma) in HHD mice. These data show that targeting hTERT with lentivector is highly effective in stimulating a broad range of CD8 T-cell immunity that can be exploited for cancer immunotherapy. (*Blood*. 2010;115(15):3025-3032)

Introduction

The stimulation of tumor-specific T-cell responses with active immunotherapy has several theoretical advantages over other forms of cancer treatment.^{1,2} However, heterogeneous expression of most of the characterized tumor antigens limits the broad applicability of cancer vaccines that target such antigens. During the past few years, telomerase (TERT) has emerged as the first bona fide common tumor antigen and is actively investigated as the target for cancer immunotherapy.^{3,4} Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is the catalytic subunit of telomerase enzyme that synthesizes telomeric DNA at the chromosome ends.^{5,6} hTERT is overexpressed in most human tumors (> 85%) and virtually all types of cancer.⁷ Telomerase activation has become one of the most important tumor escape mechanisms to circumvent the telomere-dependent pathways of cell death.^{8,9} It is well established that therapeutic strategies targeting antigens not involved in tumor growth can result in the selection of antigen-loss tumor mutants that are clinically progressive.^{10,11} Hence, down-regulation or loss of telomerase activity will severely impact the growth potential of the tumor cells. All these findings justify the clinical applications of hTERT for anticancer immunotherapy. Broadly used in several anticancer vaccine trials, peptide vaccination is the most advanced strategy concerning hTERT antigen.^{3,12-16} Although the potential of a vaccination with minimal hTERT-derived peptides exceeds other vaccine strategies, several factors could influence the optimal success of this peptide-based strategy, such as (1) human leukocyte antigen (HLA) restriction, (2) natural processing of peptide on

tumor cells, (3) antigen loss on tumors, (4) functionality of the antigen-specific T cells, and (5) persistence of the immune response in the host.¹

One main obstacle of active anticancer immunotherapy is its inability to overcome immune tolerance. hTERT, like most tumor antigens, is a self-antigen; the induction of T-cell immunity against such shared self/tumor antigen could be controlled by mechanisms of central and peripheral tolerance that prevent detrimental immune responses against self. Consequently, it appears essential with regard to hTERT to evaluate novel approaches other than peptide vaccines, such as potent viral vectors capable of delivering hTERT-derived polypeptide vaccines to overcome immune tolerance.

Recently, recombinant lentiviral vectors (lentivectors) have gained substantial interest as an alternative method of antigen-specific immunization. These vectors have been able to effectively target the antigen to dendritic cells (DCs) in vivo and to elicit effective cell-mediated immune responses.¹⁷ Indeed, lentivector has been shown to trigger T-cell responses against some tumor antigens, such as melanoma-associated (NY-ESO-1 [New-York Esophageal 1], tyrosinase-related protein)¹⁸⁻²⁰ and tumor-associated OVA foreign antigen.^{21,22} In our previous studies, we reported that the use of a lentiviral vector is very effective in stimulating CD8 T-cell responses against viral or tumor antigens.^{23,24} More recently, Liu et al showed that vaccination with a lentivector carrying mouse melanoma self/

Submitted November 13, 2009; accepted January 9, 2010. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, February 3, 2010; DOI 10.1182/blood-2009-11-253641.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge

payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2010 by The American Society of Hematology

Table 1. In vitro CTL responses in HHD mice immunized with recombinant lv-hTERT vector

Peptides	Sequence	Relative avidity	Protein of origin	CTL response	
				R/T	Percentage specific lysis
p152	LLARCALPV	Low	hTERT	0/6	—
pY152	YLARCALPV	High	hTERT	0/6	—
p540	ILAKFLHWL	High	hTERT	5/6	64, 48, 57, 65, 41
p555	ELLRSFFYV	Low	hTERT	0/6	—
pY555	YLLRSFFYV	High	hTERT	1/6	16
p572	RLFFYRKSV	Low	hTERT/mTERT	5/6	41, 42, 48, 52, 26
pY572	YLFFYRKSV	High	hTERT/mTERT	6/6	48, 51, 64, 71, 38, 21
p865	RLVDDFLV	High	hTERT	3/6	54, 49, 33
p988	DLQVNSLQTV	Low	hTERT/mTERT	6/6	46, 39, 48, 15, 19, 34
pY988	YLQVNSLQTV	High	hTERT/mTERT	6/6	61, 44, 79, 27, 33, 52

The HLA-A*0201-restricted hTERT-derived peptides and their respective relative avidity have been already described.²⁹⁻³¹ HHD mice were immunized subcutaneously with 2×10^7 TU of recombinant lv-hTERT vector, and their splenocytes were restimulated in vitro 10 days later with each peptide: p540 or p865, or with the pool of native and optimized form of indicated cryptic peptides (p152/pY152, p555/pY55, p572/pY572, and p988/pY988; 10 μ g/mL). Peptide-specific CTLs were tested against RMAS/HHD cells pulsed or not with the corresponding peptide. Data represent the percentage of specific lysis of peptide-pulsed target cells at a 50:1 splenocyte/target ratio, after subtraction of nonspecific lysis of nonpulsed target cells (0%-8%).

CTL indicates cytotoxic T lymphocytes; HHD, HLA-A2.1 transgenic mice; R/T, number of responder/total number of immunized; and —, not applicable.

antigen can stimulate strong antitumor/melanoma CD8 T-cell responses that induce successful tumor regression, thus supporting the ability of lentivector to break immune tolerance.²⁵

In this study, taking advantage of the high homology between hTERT and mTERT,²⁶ we constructed a lentivector expressing the full-length hTERT gene (lv-hTERT) and evaluated its immunogenicity and antitumor effect in an animal model of HLA transgenic mice. We compared the efficacy of the recombinant lv-hTERT vaccination with the hTERT peptide vaccination containing CD8-restricted epitopes. We show that vaccination with lv-hTERT permits to break tolerance against self and induce strong, broad, and highly functional hTERT-specific T CD8⁺ cells and confer a superior prophylactic and therapeutic antitumor response compared with hTERT-derived peptide plus adjuvant. Our results strongly support the use of the lentivector hTERT vaccine as a new potential option for telomerase-based active immunotherapy against cancers.

Methods

Mice

H-2 class I knockout, HLA-A*0201-transgenic mice (HHD) have been previously described.²⁷ Eight- to 10-week-old female mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions in our animal facility (Institut Pasteur). All animal experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Office Laboratory of Animal Care at the Pasteur Institute and were approved by the Pasteur Institute Institutional Review Board.

Cell lines and telomerase detection

HHD-transfected TAP-deficient RMAS cell lines (RMAS/HHD) have been described elsewhere.²⁷ The HLA-A2.1-expressing B16F10 murine melanoma cells (B16/A2) were kindly provided by Dr N. Chaput (Institut Gustave Roussy). Wild-type B16F10 cell line (wt B16) was purchased from ATCC. Telomerase detection in tumor cells was achieved by flow cytometry as previously reported²⁸ using anti-hTERT monoclonal antibody (Rockland), which cross reacts with mouse TERT.

Synthetic peptides

The HLA-A2.1-restricted, hTERT-derived peptides were previously described (Table 1). Briefly, p540 and p865 are high-affinity hTERT peptides.^{29,32} The peptides p152, p555, p572, and p988 were described as

low-affinity cryptic hTERT epitopes. First amino acid substitution (with a tyrosine Y) of these cryptic peptides strongly increased their binding capacity to HLA-A2.1 and immunogenicity.^{30,31} The 2 peptides p572 and p988 are fully conserved in hTERT and mouse TERT (mTERT) and were used as self/TERT epitope in HHD mice.^{30,31} All peptides were synthesized by NeoMPS.

Recombinant lentivector preparation

Plasmid DNA expressing full-length hTERT was previously described.²⁸ The hTERT DNA was subcloned into lentivector-transferred plasmid pTRIP. Δ U3.CMV.IRES.GFP²³ by replacing the enhanced GFP gene to generate pTRIP. Δ U3.CMV.hTERT. Recombinant vector particles containing hTERT (hereafter referred to as lv-hTERT) were produced by a transient calcium phosphate cotransfection of 293T cells, and vector stock titration was done by real-time quantitative polymerase chain reaction as previously described.²⁴

Immunizations

For recombinant lv-hTERT vector vaccination, HHD mice were immunized subcutaneously at the right abdominal flank with 2×10^7 transduction units (TU) of recombinant lv-hTERT vector particles (the same dose was used throughout the study). hTERT peptide immunization was performed using 100 μ g of pY572 along with hepatitis B–derived helper peptide emulsified in incomplete Freund adjuvant (IFA) (pY572/adjuv) at day 0 and day 14, as previously reported.^{31,33} For prime-boost vaccination, mice were first injected with lv-hTERT (2×10^7 TU) and then received 3 weeks later a boost injection with pY572 (100 μ g) in IFA (pY572/IFA).

CD4 T-cell depletion

For CD4⁺ T-cell depletion, mice were injected with 100 μ g of anti-CD4 antibody (GK1.5, kindly provided by Dr C. Leclerc, Institut Pasteur) 3 days before the first immunization as previously reported.²⁴

Pentamer assay

To quantify p572-specific T cell, purified spleen CD8⁺ T lymphocytes (CD8⁺ T-cell isolation kit, Miltenyi Biotec; 5×10^5 cells) were incubated with phycoerythrin-conjugated pentamer recognizing the optimized pY572 peptide (pY572/pentamer; ProImmune) for 30 minutes at 4°C. The p572-specific pentamer is not available because of the low affinity of this peptide.³¹ After 2 washes, cells were stained with anti-mouse CD8-APC (eBioscience) for 20 minutes at 4°C. Irrelevant HLA-A2.1 pentamer recognizing an HIV gag-peptide (HIVgag/A2) was used as a control. Samples were analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur.

ELISpot

Ficoll-purified lymphocytes or purified spleen CD8⁺ T lymphocytes (CD8⁺ T-cell isolation kit, Miltenyi Biotec) were incubated (in triplicates) in ELISpot plates in the presence of medium or hTERT peptide.²⁸ Plates were incubated for 20 to 30 hours at 37°C, and the interferon- γ (IFN- γ) spots were revealed following the manufacturer's instructions (Diaclone).

CTL generation and chrome assay

Splenocytes from immunized mice were stimulated with γ -irradiated lipopolysaccharide blasts loaded with hTERT peptides as described previously.^{30,31} The cytolytic activity of peptide-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) against RMA-S/HHD, wt B16, or B16/A2 cells was performed using standard ⁵¹chromium-release assay.^{28,31} The wt B16 and B16/A2 cell lines were treated with 20 ng/mL recombinant IFN- γ for 48 hours before use.

In vivo tumor protection

For therapeutic vaccination, HHD mice were challenged subcutaneously with 3×10^5 viable B16/A2 cells on the right abdominal flank. At day 5, tumor-bearing mice were subsequently vaccinated either with pY572/adjuv (days 0 and 14) or lv-hTERT, or lv-hTERT plus pY572/IFA boost as detailed previously. Control mice were immunized with lv-GFP (empty vector). Tumor size was monitored every 2 to 3 days using a caliper, and mice were killed when the tumor mass reached more than 200 mm³. The inhibition of lung pseudometastases experiment was performed as follows: HHD mice were vaccinated with pY572/adjuv (days 0 and 14) or with lv-hTERT plus pY572/IFA boost; and 7 days later, anesthetized mice were challenged intravenously with a high lethal dose of B16/A2 cells (10^6). Mice were killed at day 18 after tumor challenge and lung pseudometastases were counted. When these were too numerous (> 200 per mouse), they are shown as 200.

Statistics

The nonparametric Mann-Whitney test was used to compare CD8 T-cell responses among the groups of immunized mice. One-way analysis of variance and Neuman-Keuls tests were used to analyze the average tumor sizes among the respective groups of immunization. The Mann-Whitney test was used to study the effect of respective vaccinations on the number of lung pseudometastases. Mouse survival time was estimated using the Kaplan-Meier method, and the log-rank test was used. Statistically significant differences were considered at *P* less than .05.

Results

Induction of hTERT polyspecific CTL responses in HHD mice immunized with recombinant lv-hTERT vector

The recombinant lv-hTERT were produced by transient transfection of 293T cells with the lentivector plasmid pTRIP.ΔU3. CMV.HIV1 containing the full-length *hTERT* gene (Figure 1). HHD mice were immunized with a single dose of 2×10^7 TU of recombinant lv-hTERT. Results presented in Table 1 show that a single immunization with lv-hTERT induces strong CTL responses against most of the hTERT epitopes. Six of 10 epitopes induce strong CTL responses in the majority of HHD mice. Among them, 2 low-affinity peptides (p572 and p988) are fully conserved between hTERT and mTERT and can be considered as self-epitopes in the HHD mouse (Table 1). Interestingly, we found that the specific CTL responses against the low-affinity self/TERT epitopes (p572 and p988) were as strong as against the high-affinity non-self-epitopes, such as p540 and p865 in most mice. Thus, immunization of HHD mice with lv-hTERT vector induces a

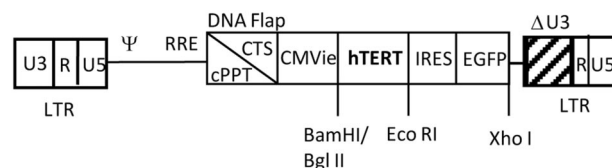


Figure 1. Schematic diagram of lentiviral vector encoding hTERT. The human telomerase reverse transcriptase (hTERT) sequence was inserted into the TRIP.ΔU3.BR.IRES green fluorescent protein (GFP) lentiviral vector between the *Bam*HI and *Eco*RI cloning sites. The ensuing bi-cistronic construct contains the full-length hTERT coding sequence under the control of the human cytomegalovirus immediate early promoter (CMVie), followed by the encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site (IRES) and the enhanced green fluorescent protein (EGFP). LTR indicates long terminal repeat; cPPT, central polyuracine tract; and CTS, central termination sequence.

polyepitopic CTL response against HLA-A*0201-restricted peptides, including self/TERT epitopes.

The in vivo primed CTLs with lv-hTERT vector recognize B16/A2 tumor cells

Because lv-hTERT vector stimulates CTLs against peptides present in mTERT sequence, we then assessed the cytolytic activity of these CTLs against endogenously processed mTERT as previously reported. To this end, CTL lines specific for pY572, pY988, and p540 were generated from spleen cells of mice immunized with lv-hTERT vector, and their cytolytic activity was tested against B16/A2 tumor cells. Figure 2A shows that these cells express high amounts of mTERT protein while also possessing sufficient cell-surface HLA-A2.1 complex after IFN- γ treatment. Peptide recognition by CTLs was checked using the RMA-S/HHD cells loaded with the corresponding peptide (Figure 2B-D). We found that both CTL_{pY572} (Figure 2B) and CTL_{pY988} (Figure 2C) were able to lyse B16/A2 cells, but no cytotoxicity was observed against the HLA-A2.1⁻ parental tumor cells (wt B16). In contrast, we showed that CTL_{p540} failed to kill B16/A2 cells (Figure 2D), confirming that p540 epitope is not processed from mTERT protein. Thus, CTLs primed in vivo with lv-hTERT immunization are able to recognize and kill tumor cells in a HLA-A2.1-restricted manner. Our data also support previous studies showing that these 2 shared cryptic epitopes (p572 and p988) are naturally presented on HLA-A*0201⁺ tumors from both humans and mice.^{31,33} Consequently, we decided in this study to focus specifically on the immune response against p572 epitope.

The lv-hTERT vector induces a stronger and long-lasting self/TERT-specific CD8 T-cell response than hTERT peptide-base vaccination

We immunized HHD mice with a single dose of lv-hTERT particles and focused on the immune response against the shared human and mouse self/TERT epitope p572. The lentivector strategy was compared with hTERT-based peptide vaccination using the cryptic optimized hTERT peptide pY572 plus adjuvant (pY572/adjuv), already reported to stimulate CTL responses against its native counterpart p572 (self/epitope) in both mice and humans.^{31,33,34} The induction of p572-specific CD8⁺ T cells was evaluated ex vivo 10 days after vaccination using the A2/pY572 pentamer. We showed that a single injection with lv-hTERT vector induced greater p572-specific CD8⁺ T-cell response compared with pY572/adjuv vaccination (Figure 3A). The frequencies of A2/pY572 pentamer-specific CD8⁺ T cells detected in HHD mice were approximately 5-fold higher after lv-hTERT injection, 1.34% plus or minus 0.33% versus 0.32% plus or minus 0.23% A2/pY572 pentamer⁺ CD8⁺

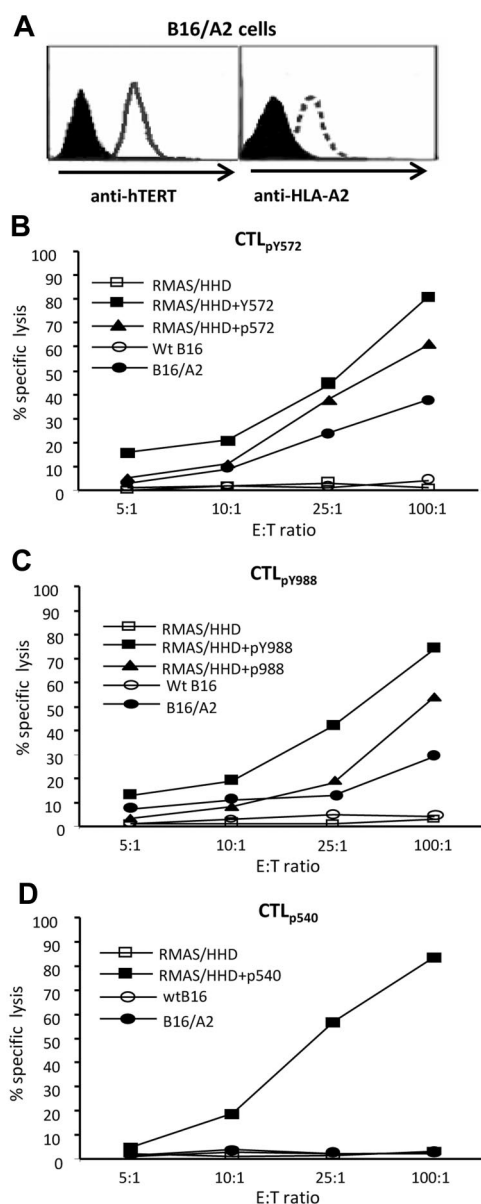


Figure 2. CTLs stimulated with lv-hTERT vector kill TERT-expressing tumor cells in vitro. (A) Flow cytometric analysis of HLA-A2.1 and TERT expressions on the B16/A2 cell line. (B-D) Splenocytes from lentiviral vector (lv)-hTERT-immunized HHD mice were restimulated twice in vitro with the indicated hTERT peptide. The peptide-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs), CTL_{pY572} (B), CTL_{pY988} (C), and CTL_{p540} (D), were then tested against IFN- γ -treated tumor cells. Peptide recognition of CTLs was confirmed using RMAS/HHD cells pulsed with respective peptides (B-D). Results represent the percentage of lysis at various CTL/target ratios. The summarized data from 2 independent experiments are shown.

T cells in the pY572/adjuv group. No A2/pY572 pentamer⁺ cells were detected in mice immunized with lv-GFP (empty vector; Figure 3A right). Because pentamer analysis does not discriminate between anergic and functional T cells, we also monitored antigen-specific CD8 T-cell response by ex vivo IFN- γ ELISpot. In agreement with pentamer analysis, we showed a greater number of IFN- γ -producing CD8 T cells in response to pY572 and p572 in the lv-hTERT-vaccinated mice in contrast with the pY572/adjuv group (Figure 3B). These results demonstrate the efficient priming of functional anti-self/TERT CD8 T cells using the recombinant lv-hTERT vector.

It has been proposed that the efficacy of active immunotherapy may be related to the capacity of the vaccine to promote sustained

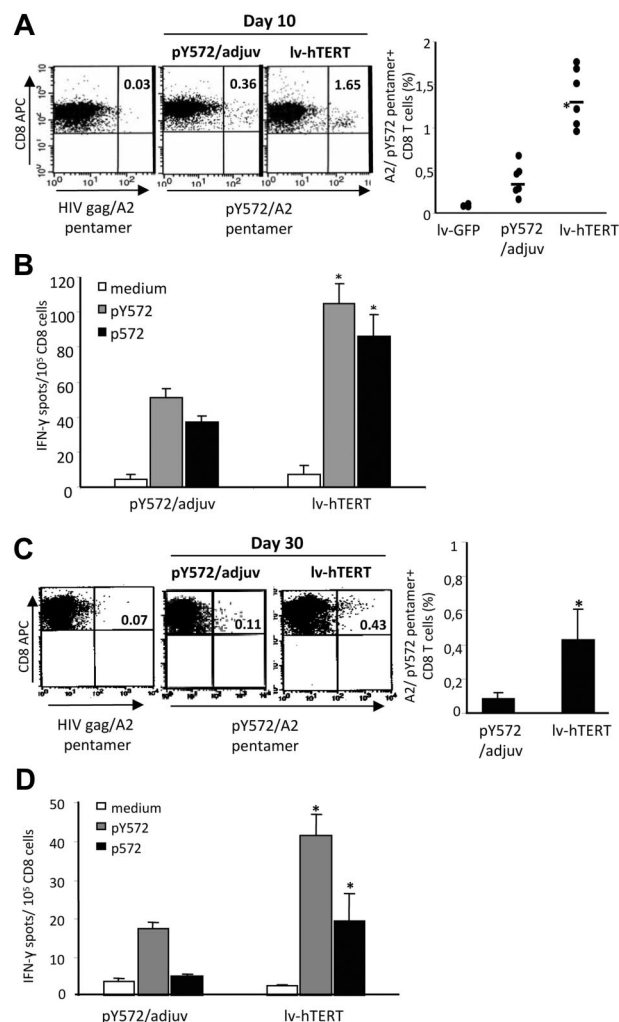


Figure 3. Comparison of primary and long-term self/TERT-specific CD8 T-cell responses in mice immunized with lv-hTERT vector or with pY572/adjuv. Spleen lymphocytes from HHD mice immunized with recombinant lv-hTERT or with pY572/adjuv 10 days later were stained ex vivo either with pY572/pentamer or with irrelevant HIVgag/pentamer (N = 3-6 mice per group). Control mice were vaccinated with lv-GFP (empty vector). Representative fluorescence-activated cell sorter (FACS) plots of pentamer staining are presented (A left), and the mean percentages of pY572/pentamer⁺ CD8 T cells after subtraction of irrelevant pentamer are shown (A right). (B) Freshly isolated spleen CD8 T cells were cultured with p572 or pY572 peptide (5 μ g/mL), and the IFN- γ -producing CD8 T cells were detected by IFN- γ ELISpot. The mean of specific IFN- γ spots plus or minus SD in each group are shown (n = 6 mice/group). The long-lasting responses are measured 30 days after the respective immunization with pentamer and IFN- γ ELISpot done ex vivo. (C) Representative FACS plots of pentamer staining and the mean of pY572/pentamer⁺ CD8 T cells are presented (n = 6 mice/group). (D) The mean of IFN- γ -producing CD8 T cells in response to p572 or pY572 peptide are shown (n = 4 mice/group). *Statistically significant value (P < .05, Mann-Whitney test).

T-cell responses in vivo.³⁵ We therefore investigated the capacity of recombinant lv-hTERT immunization to induce long-lasting CD8 T-cell responses. HHD mice were immunized with a single injection of recombinant lv-hTERT or with pY572/adjuv, and the CD8 T-cell responses were measured 30 days after vaccination by pentamer and ELISpot assay. As shown in Figure 3C, A2/pY572 pentamer staining detected greater amounts of p572-specific CD8 T cells in lv-hTERT-immunized mice than in the pY572/adjuv-vaccinated group (0.43% $\pm$ 0.17% vs 0.08% $\pm$ 0.03% A2/pY572 pentamer⁺ CD8 T cells, respectively). When the long-lasting CD8 T-cell responses were evaluated by ex vivo ELISpot assay, we found that significant IFN- γ -producing CD8 T cells in response to self/epitope p572 can only be detected in mice injected with

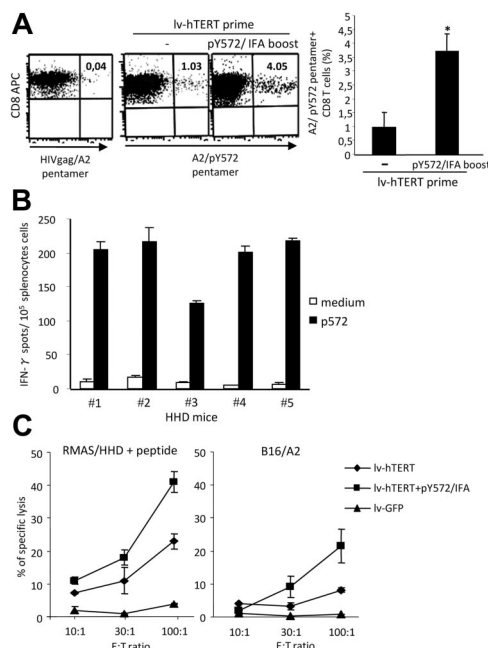


Figure 4. Heterologous boost vaccination strongly increases p572-specific CD8 T-cell responses in lentivector-primed mice. HHD mice ($n = 4$ –6/group) were immunized with lv-hTERT vector alone or with pY572/IFA boost done 3 weeks later. (A) Enumeration of pY572/pentamer⁺ CD8 T cells by pentamer staining. Representative FACS dot plots for each group is shown (left) and the mean percentage of pY572/pentamer⁺ CD8 T cells after subtraction of irrelevant pentamer (right). *Statistically significant value ($P < .05$). (B) IFN- γ -producing spleen lymphocytes were detected by an ex vivo IFN- γ ELISpot in response to p572 peptide. Responses from individual mice are shown. (C) The ex vivo cytotoxicity of CD8 T cells was tested against RMAS/HHD cells pulsed with pY572 (left) or against B16/A2 tumor cells (right). Results represent the specific lysis (percentage) plus or minus SD in each immunized group of mice ($n = 3$ mice/group), after subtraction of nonspecific lysis measured in the presence of nonpulsed RMAS/HHD or wt B16 cells. The CD8 T cells from mice immunized with lv-GFP were used as negative control.

lv-hTERT (Figure 3D). We did not detect p572-specific cells in mice vaccinated with pY572/adjuv 30 days earlier. However, a minor response against pY572 was found in these mice (Figure 3D). Thus, recombinant lv-hTERT stimulates better and sustained CD8 T-cell responses against self/TERT epitope than pY572/adjuv vaccination.

Heterologous prime boost greatly improves the self/TERT-specific CD8 T-cell responses

Previous data showed that heterologous prime-boost vaccination improves the breadth of CD8 T-cell responses in lentivector-primed mice and allows circumvention of antivector immunity.^{19,36} Therefore, we investigated the effect of heterologous boost on self/TERT-specific CD8 T-cell response. To this end, HHD mice received lv-hTERT immunization followed 3 weeks later by pY572/IFA boost vaccination. The antigen-specific CD8 T-cell responses were monitored 7 days after the boost. We showed that the pY572/IFA boost drastically increased the CD8 T-cell responses in lentivector-primed mice. The A2/pY572 pentamer⁺ CD8 T cells reach more than 3% within spleen CD8 T cells compared with mice primed with lv-hTERT alone (Figure 4A). Accordingly, we found high numbers of IFN- γ -producing cells in response to p572 peptide stimulation in mice that received the boost injection (Figure 4B). To measure more precisely the function of the CD8 T cells, we performed ex vivo cytotoxicity test using ⁵¹Cr-labeled target cells. Results in Figure 4C show that freshly isolated CD8 T cells from prime-boost immunized mice were able to kill pY572-pulsed

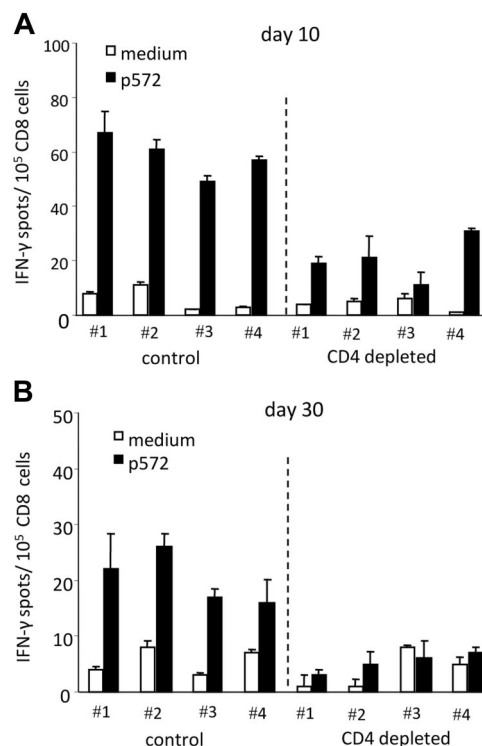


Figure 5. CD4 T-cell depletion reduces the self/TERT-specific CD8 T cells in lv-hTERT-immunized mice. HHD mice (4/group) were treated either with anti-CD4 monoclonal antibody (GK1.5; CD4 depleted) or with saline (control), 3 days before immunization. Ten (A) or 30 days (B) later, spleen-isolated CD8 T cells were cultured with p572 peptide or medium. The p572-specific CD8 T cells were detected ex vivo by IFN- γ ELISpot.

RMAS/HHD target cells and also exert direct cytotoxicity against B16/A2 tumor cells. Although the CD8 T cells from lv-hTERT-primed mice could kill peptide-loaded target cells, they failed to recognize B16/A2 tumor ex vivo (Figure 4C). Altogether, the peptide-based heterologous boost vaccination strongly enhances the magnitude and the avidity of self/TERT-specific CD8 T cells primed with lv-hTERT vector.

The self/TERT-specific CD8 T-cell responses required CD4 T-cell help in lv-hTERT-immunized mice

We next addressed the role of the CD4 T cell on the induction of the p572-specific CD8 T cells with lv-hTERT immunization. After immunization of CD4-depleted or nondepleted HHD mice, p572-specific CD8 T cells were evaluated by ex vivo IFN- γ ELISpot. Ten days after lv-hTERT injection, we showed lower numbers (2–3 times) of p572-specific CD8 T cells in CD4 T cell-depleted mice than in nondepleted mice (Figure 5A). In mice immunized 30 days earlier, the p572-specific CD8 T-cell responses were strongly reduced in CD4 T cell-depleted mice, whereas significant numbers of IFN- γ -producing cells were detected ex vivo in control mice as shown in Figure 5B. Thus, CD4⁺ T cells are required for optimal priming and persistence of p572-specific CD8 T cells in lv-hTERT-immunized mice. We could not discriminate in our study whether help was the result of CD4 response against hTERT, mTERT-specific epitopes, or both. Nevertheless, these results support previous finding showing that delivery of antigen with lentivector allows access to major histocompatibility complex (MHC) class II antigen-presenting pathways and triggers CD4 T-cell responses.^{37,38}

Recombinant lv-hTERT vaccination protects HHD mice against the growth of B16/A2 tumor

The therapeutic effect of lv-hTERT vaccination was then investigated using the B16/A2 melanoma in HHD mice.³⁹ Five days after tumor inoculation, tumor-bearing mice were immunized as indicated. We found that a single injection of lv-hTERT could induce tumor regression in 3 of 10 mice and reduce the size of tumor in the remainder (Figure 6A). When tumor-bearing mice were treated with lv-hTERT plus pY572/IFA boost, B16/A2 tumors were cured in 7 of 10 mice and significant reduction of tumor size was seen in the remainder (Figure 6A). In contrast, no tumor regression was found in the pY572/adjuv group, but we observed a minor delay of B16/A2 tumor growth compared with the control mice (Figure 6A). Furthermore, the lv-hTERT-based vaccinations increased the survival of tumor-bearing mice. Whereas unvaccinated mice died at day 40, the survival time in the group immunized with lv-hTERT-based vaccinations was significantly prolonged compared with pY572/adjuv-immunized mice (Figure 6B).

We also determined whether lv-hTERT-based vaccination could mediate prophylactic protection against a high dose of B16/A2 tumors. To this end, HHD mice were previously immunized with recombinant lv-hTERT plus pY572/IFA or with pY572/adjuv vaccine as control, and then challenged intravenously with a high intravenous dose of B16/A2 cells that induce pseudometastases in lung. Eighteen days later, lungs were recovered and pseudometastases were counted. As shown in Figure 6C, animals injected with pY572/adjuv developed very aggressive tumors in their lungs. In contrast, we found a stronger inhibition of pseudometastases growth in all mice immunized with lv-hTERT plus pY572/IFA boost (Figure 6C). Overall, these results showed that interference with tumor growth of mTERT-expressing B16/A2 cells was obtained by active immunization with recombinant lv-hTERT vector.

Discussion

In our study, taking advantage of the high homology between hTERT and mTERT,²⁶ we have explored an hTERT-based active immunotherapy using a lentivector delivery system. We showed that HLA-A*0201 transgenic HHD mice immunized with lv-hTERT simultaneously developed CTL against several HLA-A*0201-restricted hTERT epitopes, notably against low-affinity self/TERT epitopes. The lv-hTERT vector was capable of triggering robust and long-lasting self/TERT-specific CD8 T-cell response compared with the hTERT peptide-based vaccination, and provided protective and therapeutic immunity against TERT⁺ murine tumor B16, engineered to express HLA-A*0201.

Active cancer immunotherapy relies on the fundamental concept that tumor antigens exist and are presented in the context of MHC molecules for recognition by specific effector T cells. However, heterogeneous expression of most of the characterized tumor antigens limits the broad applicability of cancer vaccines that target such antigens. Telomerase, on the other hand, represents a prototype of a universal tumor antigen because of both its expression by the majority of tumors and its inherent functional involvement in oncogenic transformation.⁹ Given these attractive features, several active immunotherapy studies targeting hTERT have been conducted and hTERT peptide-based vaccinations have been the most used approach during the past few years.⁴ The relative ease of construction and production, chemical stability, and lack of oncogenic potential

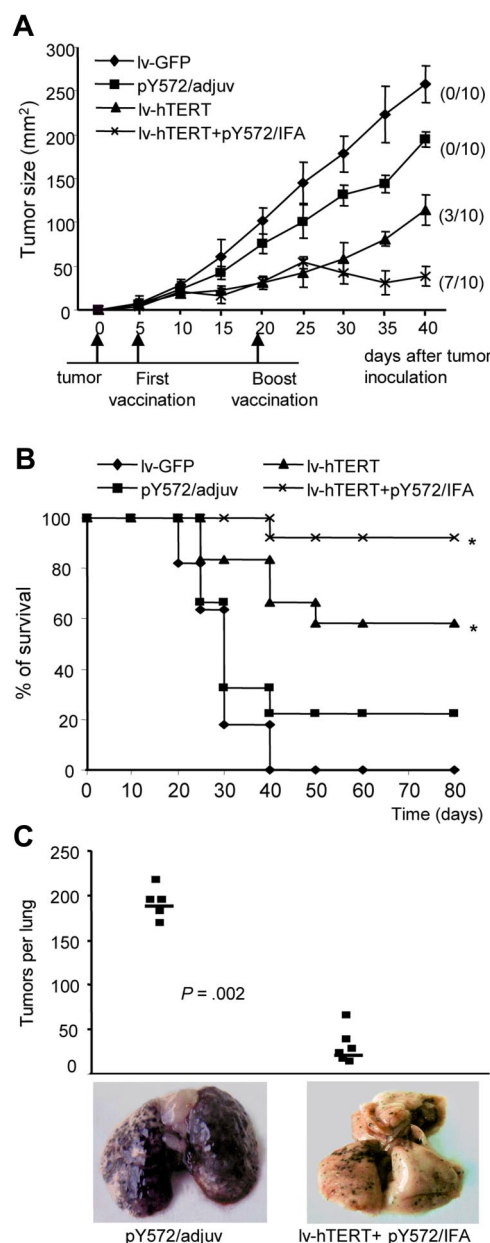


Figure 6. Lentivector-based immunizations inhibit B16/A2 tumor growth in vivo. HHD mice were inoculated with 3×10^5 B16/A2 cells and immunized 5 days later as indicated ("In vivo tumor protection"). (A) Tumor sizes in each vaccinated group of mice are shown. The numbers in parentheses indicate the number of mice that have tumor recurrence of a total of 10. (B) The mouse survival time was estimated using the Kaplan-Meier method and recorded until 80 days. *Statistically significant survival value between lentivector groups and peptide group ($P < .05$; log-rank test). (C) HHD mice ($n = 6$ /group) were prior immunized either with pY572/adjuv or with lv-hTERT plus pY572/IFA and subsequently challenged intravenously with 10^6 B16/A2 cells. Results represent the number of lung metastases counted after 18 days in each mouse, and representative photographs of lung from 1 mouse per group are shown.

have made the peptide-based vaccine very popular. However, several obstacles limit the widespread use of peptide vaccines. These include HLA restriction, low immunogenicity, the need for adjuvants and carriers, failure or absence of epitope expression on tumor cells, low level of memory responses, and their inability to break immune tolerance.⁴⁰

Recently, the use of potent viral vectors, such as lentiviral vectors, can allow us to circumvent many of these obstacles.

Numerous studies have shown that lentivectors efficiently targeted tumor antigens to DC and trigger more potent and longer specific CTL responses than other viral vectors as well as genetic immunization approaches.^{21,22,37,38,41} In this study, we showed that vaccination of mice with a lentivector carrying the full-length *hTERT* gene allowed the generation of broad, multifunctional, and sustained hTERT-specific CTL responses and provided better antitumor immunity than peptide-based vaccination. The hTERT-specific CTL responses induced with this lv-hTERT vector were obtained without addition of any adjuvant, suggesting efficient *in vivo* cross-presentation of the hTERT protein. Because we did not engineer the lv-hTERT vector to carry a “danger” signal, we speculated that the lentivector itself was responsible for the DC activation *in vivo*. Indeed, *in vitro* experiments have shown that lentivectors are capable of providing the antigen and the appropriate signals to activate immature DCs.⁴² In addition, lentivector constructions contain tubulovesicular structures that can trigger innate responses through TLR9 and induce maturation *in vivo*.⁴³ Similar results were reported by Chapatte et al showing that vaccination of HLA-A2/K^b mice with lentivector carrying a Melan-A antigen, was more effective for antigen-specific memory CD8⁺ T-cell induction than peptide-based vaccines.³⁶ The authors also showed that the high expression of the survival/memory marker interleukin-7 receptor α chain on antigen-specific CD8 T cells induced with lentivector may contribute to the efficacy of this strategy compared with peptide-based vaccine.^{36,44}

Another major point concerning the success of active cancer immunotherapy is the capacity of vaccine to overcome mechanisms of immune tolerance. To break this immune tolerance to self/tumor antigens and induce high-avidity antitumor T cells, several approaches, such as altered peptide ligands, xenoantigens, blockade of immune suppression pathways, or the use of potent viral vector system, have been used.^{2,45} About the lentiviral vectors, recent data from Liu et al showed the capacity of a lentivector carrying self/melanoma antigen to promote rupture of the immune tolerance against self/melanoma derived epitopes in mice.²⁵ In this study, we found that immunization of HHD mice with recombinant lentivirus carrying hTERT induced CTLs against hTERT epitopes and also resulted in high expansion of CD8 T cells specific for self/mouse TERT epitopes (p572 and p988) shared between the 2 species.^{31,33} Furthermore, the self/p572-specific CD8 T response generated with lv-hTERT vector was stronger than one elicited with the heteroclitic peptide pY572 plus adjuvant vaccination (pY572/adjuv). It should be noted that HHD mice are knockout for their endogenous MHC class I (H-2); consequently, only the HLA-A*0201-restricted self/TERT-specific CD8 responses are probably responsible for the *in vivo* therapeutic effects of lv-hTERT vector compared with heteroclitic pY572/adjuv vaccination. As outlined, we especially focused on the CD8 T-cell responses against the self/TERT peptide p572 or its analog pY572 because they have already been shown to induce CTL responses in HHD mice and are used to vaccinate humans.^{30,31,33,34} However, our lentivector carries hTERT that is a heterologous antigen in mouse. Therefore, this xenogenic vaccination was able to break self-tolerance and to inhibit the progression of established tumor as previously reported.^{46,47} On the other hand, we found also a decrease of both primary and long-lasting self/p572-specific CD8 responses when CD4 T cells were depleted before lv-hTERT vector vaccination. Because the endogenous MHC class II molecules I^{A/E} are still constitutively expressed in HHD mice,²⁷ these results suggest that hTERT-specific CD4 T cells

were induced after lv-hTERT immunization and could participate in the optimal priming of self/p572-specific CD8 T-cell response *in vivo*. Nonetheless, we cannot discriminate whether the help is provided from nonself or self/TERT-specific CD4 T-cell responses. This question would be addressed in future studies using transgenic mouse for human class II molecules and class II, I^{A/E} knockout.

The challenge with regard to telomerase-based active immunotherapy is to develop a strategy capable of generating immune responses against this self/tumor antigen as robust as safe. As already reported, there are differences in telomerase expression in normal versus tumor tissues, making telomerase a potential safe cancer target.⁹ In the present study, we did not observe any deleterious effects in lv-hTERT-treated animals despite evidence of strong self/TERT-specific CTLs *in vivo*. In line with our observations, Mennuni et al recently showed that repeated immunizations with mTERT-encoding DNA resulted in anti-self/mTERT T-cell immunity and important delay of tumor growth in mouse models of prostate and colon cancers without adverse effects.⁴⁸ These recent data support other cumulative observations in animal models and in humans concerning the safety of telomerase-based immunotherapy.^{9,33,49,50} However, future investigations should be conducted to address whether the duration of telomerase inhibition by active immunotherapy can affect normal tissues.

In conclusion, vaccination with recombinant lv-hTERT is highly effective to break tolerance against hTERT and elicits antitumor CD8⁺ T-cell immunity in HHD mice. Delivery of hTERT using lentivector may represent a potential approach to improve telomerase-based active immunotherapy.

Acknowledgments

The authors thank Dr F. Lemonnier and Dr N. Chaput for providing HHD mice and B16/HLA-A*0201 cell lines, respectively, and Drs Sylvie Rusakiewicz and Federico Sandoval for critical reading of the manuscript and editorial assistance.

This work was supported by Institut National du Cancer, Paris, France.

Authorship

Contribution: O.A. designed and performed research, analyzed data, and wrote the paper; C.N. and P.C. designed research and performed lentivector expressing hTERT construction; K.M. and M.D. performed immunologic studies and analyzed data; P.R. performed statistical analysis; W.-H.F., E.T., and S.W.-H. designed research and analyzed data; and P.L.-D. designed research, analyzed data, and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Pierre Langlade-Demoyen, Institut Pasteur, Rétrovirologie Moléculaire, Unité de Rétrovirologie Moléculaire, Inserm U579; 25-28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France; e-mail: planglad@pasteur.fr; or Olivier Adotévi, Hôpital Européen Georges Pompidou AP-HP, Immunologie Biologique, 20 rue Leblanc 75015 Paris, France; e-mail: olivier.adotevi@egp.aphp.fr.

References

- Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med*. 2004;10(9):909-915.
- Disis ML, Bernhard H, Jaffee EM. Use of tumour-responsive T cells as cancer treatment. *Lancet*. 2009;373(9664):673-683.
- Cortez-Gonzalez X, Zanetti M. Telomerase immunity from bench to bedside: round one. *J Transl Med*. 2007;5:12.
- Beatty GL, Vonderheide RH. Telomerase as a universal tumor antigen for cancer vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2008;7(7):881-887.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266(5193):2011-2015.
- Blackburn EH. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett*. 2005;579(4):859-862.
- Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 1997;33(5):787-791.
- Counter CM, Hahn WC, Wei W, et al. Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(25):14723-14728.
- Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(3):167-179.
- Jäger E, Ringhoffer M, Karbach J, Arand M, Oesch F, Knuth A. Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int J Cancer*. 1996;66(4):470-476.
- Schmollinger JC, Vonderheide RH, Hoar KM, et al. Melanoma inhibitor of apoptosis protein (ML-IAP) is a target for immune-mediated tumor destruction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(6):3398-3403.
- Parkhurst MR, Riley JP, Igarashi T, Li Y, Robbins PF, Rosenberg SA. Immunization of patients with the hTERT:540-548 peptide induces peptide-reactive T lymphocytes that do not recognize tumors endogenously expressing telomerase. *Clin Cancer Res*. 2004;10(14):4688-4698.
- Mavroudis D, Bolonakis I, Cornet S, et al. A phase I study of the optimized cryptic peptide TERT(572y) in patients with advanced malignancies. *Oncology*. 2006;70(4):306-314.
- Domchek SM, Recio A, Mick R, et al. Telomerase-specific T-cell immunity in breast cancer: effect of vaccination on tumor immunosurveillance. *Cancer Res*. 2007;67(21):10546-10555.
- Bernhardt SL, Gjertsen MK, Trachsel S, et al. Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: a dose escalating phase I/II study. *Br J Cancer*. 2006;95(11):1474-1482.
- Kyte JA. Cancer vaccination with telomerase peptide GV1001. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009;18(5):687-694.
- Breckpot K, Aerts JL, Thielemans K. Lentiviral vectors for cancer immunotherapy: transforming infectious particles into therapeutics. *Gene Ther*. 2007;14(11):847-862.
- Metharom P, Ellem KA, Schmidt C, Wei MQ. Lentiviral vector-mediated tyrosinase-related protein 2 gene transfer to dendritic cells for the therapy of melanoma. *Hum Gene Ther*. 2001;12(18):2203-2213.
- Palmowski MJ, Lopes L, Ikeda Y, Salio M, Cerundolo V, Collins MK. Intravenous injection of a lentiviral vector encoding NY-ESO-1 induces an effective CTL response. *J Immunol*. 2004;172(3):1582-1587.
- Garcia Casado J, Janda J, Wei J, et al. Lentivector immunization induces tumor antigen-specific B and T cell responses in vivo. *Eur J Immunol*. 2008;38(7):1867-1876.
- He Y, Zhang J, Mi Z, Robbins P, Falo LD Jr. Immunization with lentiviral vector-transduced dendritic cells induces strong and long-lasting T cell responses and therapeutic immunity. *J Immunol*. 2005;174(6):3808-3817.
- He Y, Zhang J, Donahue C, Falo LD Jr. Skin-derived dendritic cells induce potent CD8(+) T cell immunity in recombinant lentivector-mediated genetic immunization. *Immunity*. 2006;24(5):643-656.
- Firat H, Zennou V, Garcia-Pons F, et al. Use of a lentiviral vector for induction of CTL immunity against melanoma: perspectives for immunotherapy. *J Gene Med*. 2002;4(1):38-45.
- Iglesias MC, Mollier K, Beignon AS, et al. Lentiviral vectors encoding HIV-1 polyepitopes induce broad CTL responses in vivo. *Mol Ther*. 2007;15(6):1203-1210.
- Liu Y, Peng Y, Mi M, et al. Lentivector immunization stimulates potent CD8 T cell responses against melanoma self-antigen tyrosinase-related protein 1 and generates antitumor immunity in mice. *J Immunol*. 2009;182(10):5960-5969.
- Greenberg RA, Allsopp RC, Chin L, Morin GB, DePinho RA. Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene*. 1998;16(13):1723-1730.
- Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Perarnau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med*. 1997;185(12):2043-2051.
- Adotévi O, Mollier K, Neuveut C, et al. Immunogenic HLA-B*0702-restricted epitopes derived from human telomerase reverse transcriptase that elicit antitumor cytotoxic T-cell responses. *Clin Cancer Res*. 2006;12(10):3158-3167.
- Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*. 1999;10(6):673-679.
- Scardino A, Gross DA, Alves P, et al. HER-2/neu and hTERT cryptic epitopes as novel targets for broad spectrum tumor immunotherapy. *J Immunol*. 2002;168(11):5900-5906.
- Hernandez J, Garcia-Pons F, Lone YC, et al. Identification of a human telomerase reverse transcriptase peptide of low affinity for HLA A2.1 that induces cytotoxic T lymphocytes and mediates lysis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12275-12280.
- Miney B, Hipp J, Firat H, Schmidt JD, Langlade-Demoyen P, Zanetti M. Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(9):4796-4801.
- Gross DA, Graff-Dubois S, Opolon P, et al. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest*. 2004;113(3):425-433.
- Bolonakis I, Kotsakis A, Papadimitrakaki E, et al. Vaccination of patients with advanced non-small-cell lung cancer with an optimized cryptic human telomerase reverse transcriptase peptide. *J Clin Oncol*. 2007;25(19):2727-2734.
- Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(4):251-262.
- Chapatte L, Colombetti S, Cerottini JC, Levy F. Efficient induction of tumor antigen-specific CD8+ memory T cells by recombinant lentivectors. *Cancer Res*. 2006;66(2):1155-1160.
- Dullaers M, Van Meirvenne S, Heirman C, et al. Induction of effective therapeutic antitumor immunity by direct in vivo administration of lentiviral vectors. *Gene Ther*. 2006;13(7):630-640.
- Rowe HM, Lopes L, Ikeda Y, et al. Immunization with a lentiviral vector stimulates both CD4 and CD8 T cell responses to an ovalbumin transgene. *Mol Ther*. 2006;13(2):310-319.
- Chaput N, Scharzt NE, Andre F, et al. Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine: II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection. *J Immunol*. 2004;172(4):2137-2146.
- Naz RK, Dabir P. Peptide vaccines against cancer, infectious diseases, and conception. *Front Biosci*. 2007;12:1833-1844.
- Esslinger C, Chapatte L, Finke D, et al. In vivo administration of a lentiviral vaccine targets DCs and induces efficient CD8(+) T cell responses. *J Clin Invest*. 2003;111(11):1673-1681.
- Breckpot K, Emeagi P, Dullaers M, Michiels A, Heirman C, Thielemans K. Activation of immature monocyte-derived dendritic cells after transduction with high doses of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*. 2007;18(6):536-546.
- Pichlmair A, Diebold SS, Gschmeissner S, et al. Tubulovesicular structures within vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped lentiviral vector preparations carry DNA and stimulate antiviral responses via Toll-like receptor 9. *J Virol*. 2007;81(2):539-547.
- Colombetti S, Levy F, Chapatte L. IL-7 adjuvant treatment enhances long-term tumor-antigen-specific CD8+ T-cell responses after immunization with recombinant lentivector. *Blood*. 2009;113(26):6629-6637.
- Finn OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med*. 2008;358(25):2704-2715.
- Pupa SM, Iezzi M, Di Carlo E, et al. Inhibition of mammary carcinoma development in HER-2/neu transgenic mice through induction of autoimmunity by xenogeneic DNA vaccination. *Cancer Res*. 2005;65(3):1071-1078.
- Gallo P, Dharmapuri S, Nuzzo M, et al. Xenogeneic immunization in mice using HER2 DNA delivered by an adenoviral vector. *Int J Cancer*. 2005;113(1):67-77.
- Mennuni C, Ugel S, Mori F, et al. Preventive vaccination with telomerase controls tumor growth in genetically engineered and carcinogen-induced mouse models of cancer. *Cancer Res*. 2008;68(23):9865-9874.
- Nair SK, Heiser A, Boczkowski D, et al. Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat Med*. 2000;6(9):1011-1017.
- Danet-Desnoyers GA, Luongo JL, Bonnet DA, Domchek SM, Vonderheide RH. Telomerase vaccination has no detectable effect on SCID-repopulating and colony-forming activities in the bone marrow of cancer patients. *Exp Hematol*. 2005;33(11):1275-1280.

The Angiogenic Growth Factor and Biomarker Midkine Is a Tumor-Shared Antigen

Jerome Kerzerho,* Olivier Adotevi,^{†,‡} Florence A. Castelli,* Magalie Dosset,^{†,‡} Karine Bernardeau,[§] Natacha Szely,* Francois Lang,[§] Eric Tartour,^{†,‡} and Bernard Maillere*

The angiogenic factor Midkine (MDK) is overexpressed in various human malignant tumors, although its expression is low or undetectable in normal adult tissues. Its expression in tumors and its detection in plasma have been associated with poor disease outcome, whereas its blockade was found to contribute to tumor regression. By weekly stimulation of T lymphocytes harvested in HLA-A2 healthy donors, we derived CD8 T cell lines specific for several MDK peptides. The T cell response was mostly dominated by two nonamer peptides localized in the signal peptide and in the C-terminal part of the protein, as assessed by IFN- γ ELISPOT and HLA-A2 tetramer labeling. Peptide-specific T cell lines recognized cells transfected with an MDK-encoded plasmid and tumor cell lines naturally expressing the MDK protein, but not untransfected cells. T cell presentation of the two MDK epitopes was found to be TAP dependent. Experiments performed in HLA-A2 transgenic mice demonstrated the capacity of the two identified CD8 T cell epitopes to elicit a cytotoxic response. Altogether, our data show that the secreted MDK protein is a candidate vaccine for multiple cancers. *The Journal of Immunology*, 2010, 185: 000–000.

The number of well-characterized tumor Ags has steadily increased in recent years. More than 200 class I-restricted cytotoxic T lymphocyte peptide epitopes have been characterized from multiple proteins (1). Tumor Ags differ widely in their expression pattern in tumor and healthy cells, in their contribution to tumor survival, and their immunogenic properties. One major group of tumor Ags is represented by cancer-germline Ags encoded by genes that are totally silent in most normal tissues and are overexpressed in a variety of tumor types (2). Members of this group include genes encoding MAGE, BAGE, or LAGE. Another important type of Ag is composed of differentiation Ags that are found in both the tumors and the normal cells from which they derived. The most studied differentiation Ags are probably the Melan-A/MART-1 and gp100 proteins, which are present in both melanocytes and melanoma. Although both types of Ags appeared to be able to elicit a tumor-specific immune response, they are dispensable for the tumor and hence facilitate tumor escape from immune attack through loss of Ags (3, 4). Because of their almost strict tumor-restricted expression, cancer-germline Ags also suffer from interindividual expression discrepancies in cancer patients (5, 6), whereas differentiation Ags are only found in a defined type

of tumor. As a result, a few identified tumor Ags exhibit a wide expression in multiple cancer patients and contribute to survival and growth of cancer cells. These cancer targets mainly comprise telomerase reverse transcriptase (7), which is required for the control of telomere length in the tumor, and survivin (8), and Bcl-2 (9), which provide resistance to apoptosis. T cell epitopes of these proteins (8–10) have been already delineated, but their efficiency in eliciting a tumor-eradicating immune response is not formerly demonstrated.

Midkine (MDK) is a heparin-binding growth factor found as the product of a retinoic acid-responsive gene (11). This secreted protein has been found to be overexpressed in various human malignancies, such as bladder, prostate, breast, lung, liver, and colon tumors, whereas its expression is typically low or undetectable in normal adult tissues (12–14). Its natural role is mainly to participate in neuronal development during embryogenesis (15). It has also been implicated in ischemic renal injury (16) and autoimmune responses (17). In tumor cells, MDK has not only an angiogenic role (18), but also a mitogenic (19) and antiapoptotic function (20). Its blockade contributes to tumor regression in a mouse model (21), demonstrating its importance in tumor expansion. Interestingly, its expression in the tumor (12, 22) and its concentration in plasma (23) were found to be related to poor disease outcome. Its expression in tumors can be detected early (13), and it was therefore considered as a relevant biomarker of disease progression. Its expression in tumors can be determined by blood (23, 24) and urinary analysis (25). Because of its functions, its wide expression in tumors, and its biomarker status, we have investigated whether MDK can induce a cellular cytotoxic response in humans. Both in vitro primary stimulation experiments performed with HLA-A2 healthy donors and immunization trials performed in HLA-A2 transgenic mice revealed the capacity of MDK to elicit tumor-specific CTL response.

Material and Methods

Peptides and proteins

MDK nonamer peptides were synthesized using standard 9-fluorenylmethoxycarbonyl chemistry on an Advanced ChemTech Apex synthesizer (Advanced ChemTech, Louisville, KY) and cleaved from the resin by 95%

*Commissariat à l'Énergie Atomique-Saclay, Institut de Biologie et Technologies, Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines, Gif-sur-Yvette; [†]Centre de Recherche Cardiovasculaire, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U970, Université Paris Descartes, Paris; [‡]Hôpital Européen Georges Pompidou, Unité d'Immunologie Biologique, Assistance Publique-Hopitaux de Paris, Paris; and [§]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U601, Institut de Biologie, Nantes, France

Received for publication April 1, 2009. Accepted for publication April 27, 2010.

This work was supported by the Commissariat à l'Énergie Atomique and grants from l'Institut National du Cancer, Immucan, and Cancéropole d'Ile de France.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Bernard Maillere, Commissariat à l'Énergie Atomique, Institute of Biology and Technologies, Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines, Gif-sur-Yvette, F-91191, France. E-mail address: bernard.maillere@cea.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cell; ER, endoplasmic reticulum; HHD, HLA-A2 transgenic mice; MDK, Midkine; pMDK, Midkine plasmid.

Copyright © 2010 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/10/\$16.00

trifluoroacetic acid. If necessary, peptides were purified by reversed-phase HPLC on a C18 Vydac column (Interchim, Montluçon Cedex, France). Their purity was >90%, as indicated by analytical HPLC. Sequences of the 13–21 and 114–122 peptides were ALLALTSAV and AQCQETIRV, respectively.

Construction of MDK expression plasmid

Total RNA was extracted from A549 cells and reverse transcribed into cDNA using reverse transcriptase and oligo(dT) (ImProm-II Reverse Transcription System, Promega, Charbonnières-les-bains, France). MDK cDNA was amplified by PCR using the upstream primer 5'-GTGGTGAATT-CACCACTGCAGCACCAGGCTTCCTC-3' and the downstream primer 5'-AAACTCGAGCCAGGCTTGGCGTCTAGTC-3'. MDK cDNAs were ligated with EcoRI and XhoI, then digested into pcDNA3.1 expression vector predigestion. The corresponding plasmid (pMDK) was purified on plasmid kit columns under endotoxin-free conditions (Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France).

Cell culture and transfection

A549 human lung carcinoma, CIR human B lymphoblast, HepG2 human hepatocellular carcinoma, and DLD-1 human colorectal adenocarcinoma were from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). The pcDNA3.1-MDK (pMDK) (20 µg) was introduced into CIR-A2 cells (3×10^6 cells) by electroporation (0.9 kV, 250 µF, 0.4-cm gap) with a Gene Pulser II (Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France). The treated cells were suspended in 40 ml prewarmed RPMI 1640 medium with 10% fetal serum and incubated under 5% CO₂/air at 37°C. Forty-eight hours later, transfection efficacy was assessed by flow cytometry as endogenous MDK expression in matured dendritic cells (DCs) and HepG2 and DLD1 cells. Briefly, cells were permeabilized with 75 µl fixation/permeabilization solution (BD Biosciences, Le pont de Claix, France) for 20 min at 4°C and washed twice with BD Perm/Wash buffer plus 2% FCS (BD Biosciences). They were stained for 30 min on ice with anti-MDK-PE Ab (BD Biosciences) or anti-isotype control. Cell staining was assessed in an FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

Generation of Ag-specific CD8⁺ T cell lines from healthy donors

Blood cells were collected from anonymous healthy donors at the Etablissement Français du Sang (Rungis, France) as buffy-coat preparations after informed consent and following Etablissement Français du Sang guidelines. PBMCs were isolated by density centrifugation on Ficoll-Hyperpaque gradients (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). HLA-A2 donors were identified by using extracellular staining with anti-HLA-A2-PE Ab (BD Biosciences). Monocyte-derived DCs were generated from plastic-adherent cells of PBMCs after 5–7 d of culture in AIM V medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 1000 U/ml recombinant human IL-4 and recombinant human GM-CSF (tebu-bio, Le-Perray-en-Yvelines, France). Immature DCs were collected at day 5 or 6. Mature DCs were generated after addition of 1 µg/ml LPS (Sigma-Aldrich). CD8 T lymphocytes were isolated from the nonadherent phase by positive selection using an anti-CD8

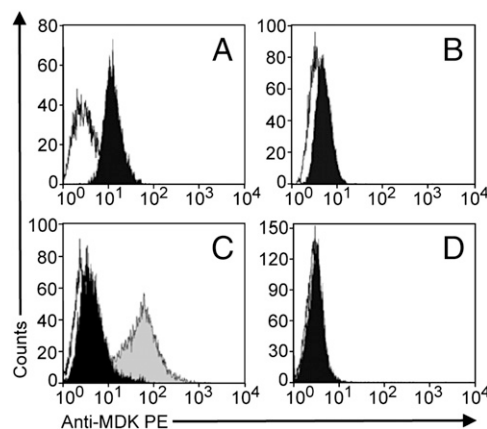


FIGURE 1. Flow cytometry analysis of MDK expression in normal and tumor cells. Cells were permeabilized and stained intracellularly with an MDK-specific Ab and analyzed by flow cytometry. HepG2 DC (A), DLD1 (B), and CIR-A2 cells (C) and DCs (D). Black, endogenous expression of MDK; gray, expression of MDK posttransfection with the MDK plasmid; open, isotype control.

mAb coupled to magnetic microbeads (Miltenyi Biotec, Paris, France) and by magnetic cell sorting, as recommended by the manufacturer. Mature DCs (10^6 cells/ml) were incubated at 37°C, 5% CO₂, for 4 h in complete IMDM medium containing 5 µg/ml β₂-microglobulin and a mixture of MDK peptides, each peptide being at a concentration of 10 µg/ml. Pulsed cells were washed and added at 10^4 per round-bottom microwell to 2×10^5 autologous CD8 lymphocytes in 200 µl IMDM supplemented by 1000 U/ml IL-6 (R&D Systems, Lille, France) and 10 ng/ml IL-12 (R&D Systems). The CD8 T lymphocytes were restimulated on days 7, 14, and 21 with autologous DCs freshly loaded with the MDK peptides and were grown in complete IMDM medium supplemented with 10 U/ml IL-2 (R&D Systems) and 5 ng/ml IL-7 (R&D Systems). Flow cytometry analysis confirmed that growing cells were CD8 T lymphocytes. Specificity of the T cell lines was investigated by IFN-γ ELISPOT assays at day 28 as described previously (10) using HLA-A2-transfected CIR (CIR-A2) as APC. Cytotoxicity of the T cell lines was evaluated using perforin ELISPOT assays or calcein-acetoxymethyl assays (calcein) (26). Briefly, target cells were incubated with calcein for 30 min at 37°C and, after extensive washings, were added to culture wells (5000 cells per well) with MDK-specific T cell lines (20,000

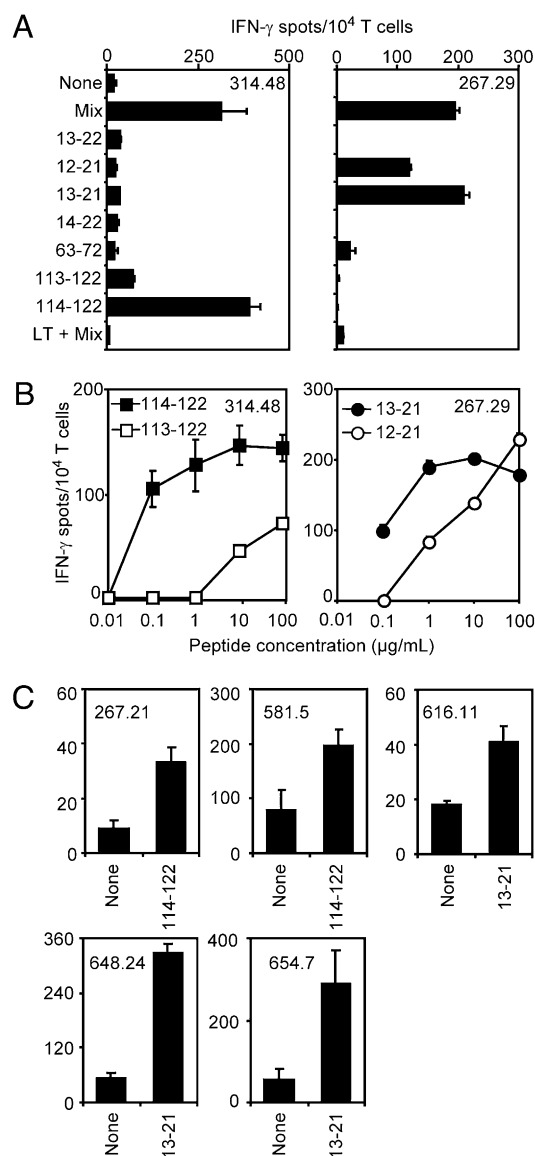


FIGURE 2. Peptide specificity of T cell lines derived from HLA-A2 healthy donors. CD8 T cell lines were obtained after three weekly stimulations by autologous mature DCs loaded the selected peptides. Lymphocytes (10^4 per well) were incubated in duplicate with 3×10^3 CIR-A2 cells in the presence or absence of peptides (A, C) or a dose range of appropriate peptides (B). The specificity of the T cell lines was assessed by IFN-γ ELISPOT after 24-h incubation.

cells per well). After a 4-h incubation at 37°C, emitted fluorescence was measured on a Gemini Spectramax Fluorimeter (Molecular Devices, St. Gregoire, France) (excitation at 485 nm and emission at 530 nm).

In vivo immunogenicity studies

H-2 class I knockout, HLA-A*0201-transgenic mice (HHD II) have been previously described (27). Eight- to 10-wk-old female mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions in our animal facility. HHD mice were injected s.c. at day 0 and day 14 with 50 µg MDK peptides 13–21 or 114–122 along with 140 µg I-A^b MHC class II helper peptide TPPAYRPPNAIL (T13L), which corresponds to amino acids 128–140 of the hepatitis B virus core protein in IFA. For DNA immunizations, HHD mice were injected with 50 µl cardiotoxin into each regenerating tibialis anterior muscle 5 to 6 d prior to DNA injection. Fifty microliters of pMDK (1 µg/µl in PBS) was injected directly into each pretreated muscle at days 0 and 14. Seven to 10 d after the last immunization, spleen cells of immunized mice were harvested, and Ficoll-purified lymphocytes were isolated. Specific T cells were detected *ex vivo* using ELISPOT assay. For CTL function analysis, splenocytes were stimulated for 5 to 6 d with peptide-pulsed (10 µg/ml) gamma-irradiated (5000 rad) syngenic splenocytes. Specific cytotoxic activity of effector CTL was measured by standard [⁵¹Cr] release assay.

Results

MDK expression in tumor cell lines and healthy cells

As MDK expression has been mostly evaluated at the transcriptional level, we evaluated its protein expression by flow cytometry. As shown in Fig. 1, MDK was easily detected in the hepatocarcinoma HepG2 cell line (Fig. 1A), whereas its expression was extremely low in DLD1 cells (Fig. 1B). MDK was also weakly expressed in the CIR-A2 cell line, whereas CIR-A2 cells transfected with pMDK exhibited a high expression of MDK (Fig. 1C). In contrast, human DCs did not express MDK (Fig. 1D). We also observed good expression of MDK in A549 and Caski cell lines, whereas it was not expressed in monocytes, lymphocytes, or activated T lymphocytes (data not shown). We thus confirmed that MDK was overexpressed in several tumor cell lines in contrast to normal cells derived from the blood.

Induction of MDK peptide-specific T cell lines

Based on HLA-A2 scores provided by the prediction programs BIMAS, SYFPEITHI, and PROPPRED, 14 peptides of 9 to 10 aas were initially selected for preliminary T cell priming experiments. These experiments included three HLA-A2⁺ healthy individuals. CD8 T cell lines were obtained after three weekly stimulations by autologous mature DCs loaded with a mixture of selected peptides

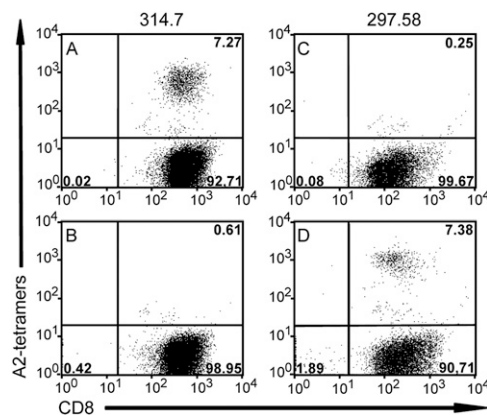


FIGURE 3. Tetramer labeling of peptide-specific T cell lines. T cell lines 314.7 (A, B) and 297.58 (C, D) are specific to the peptides 114–122 and 13–21, respectively. Each line was stained with anti-CD8-FTC and PE-labeled HLA-A2/114–122 (A, C) or HLA-A2/13–21 (B, D) tetramers and analyzed by flow cytometry. The percentage of each cell population is indicated in the corresponding quadrants.

and characterized by IFN-γ ELISPOT. Seven peptides, namely 13–21, 12–21, 13–22, 14–22, 63–72, 113–122, and 114–122, elicited peptide-specific T cell lines and were retained for further experiments. As shown in Fig. 2A, T cell lines 314.48 and 267.29 were activated by MDK⁺ HLA-A2⁺ CIR-A2 cells presenting the peptides 113–122 and 114–122 or 12–21 and 13–21, respectively. Omission of the peptides or addition of inappropriate peptides did not activate them. Dose-range experiments (Fig. 2B) showed that the optimal peptides were the 9-mers 114–122 and 13–21. They were recognized at low concentration as compared with the 10-mers 113–122 and 12–21, the midactivating dose being ~0.01 µg/ml (equivalent to 10^{–8} M). The peptide-specific T cells appeared therefore to possess a good affinity for the corresponding peptide–HLA-A2 complexes. As shown in Fig. 3, the T cell line 314.7, which was specific for the 114–122 peptide in ELISPOT (not shown), was nicely labeled by the corresponding HLA-A2 tetramers (Fig. 3A), although very few cells were labeled by the 13–21 specific tetramer (Fig. 3B). In contrast, the T cell line 297.58, which was specific for

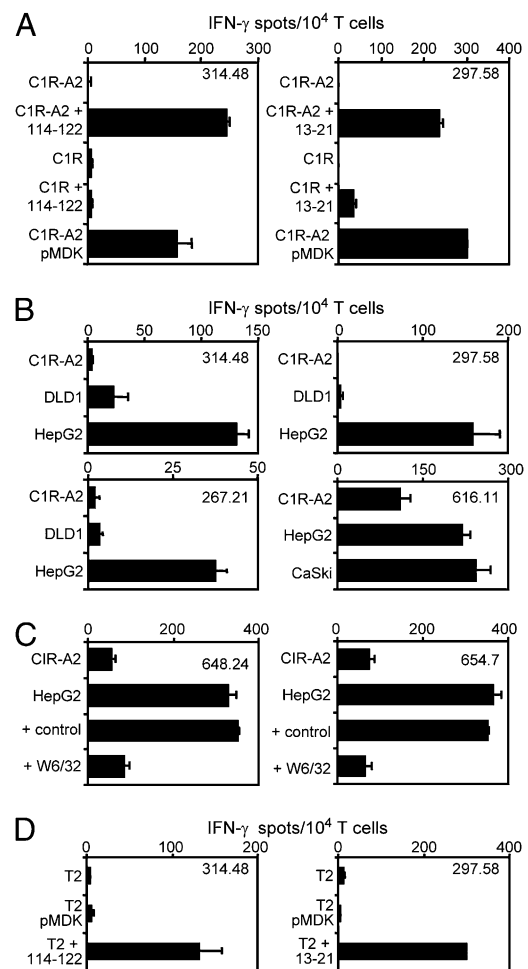


FIGURE 4. HLA-A2 restriction of peptide-specific T cell lines and stimulation by tumor cells. *A*, HLA-A2-transfected CIR cells (CIR-A2) and CIR cells were pulsed for 4 h with peptide 13–21 or 114–122. CIR-A2 cells were transfected with pMDK. These lines were incubated (3×10^4 cells per well) with 114–122 (314.48) or 13–21 (297.58) specific T cell lines in IFN-γ ELISPOT assays. *B*, HLA-A2⁺ CIR-A2 (MDK⁺), DLD1 (MDK[–]), CaSki (MDK⁺), and HepG2 (MDK⁺) were incubated (30,000 cells per well) with 114–122 (314.48 and 267.21) and 13–21 (297.58, 616.11, 648.24, and 654.7) specific T cell lines. *C*, For inhibition experiments, W6/32 Mab and the isotype control were added at the same concentration (10 µg/ml) directly to the wells. T cell activation was revealed by IFN-γ ELISPOT assay. *D*, Same conditions as in *A* using TAP-deficient T2 cell line.

the peptide 13–21 in ELISPOT, was labeled by the 13–21 specific tetramer (Fig. 3C), but not by the 114–122 specific tetramer (Fig. 3D). For both T cell lines, ~7% of the cells were peptide-specific, confirming their good peptide specificity. From 12 different HLA-A2⁺ healthy donors, we derived seven T cell lines specific for peptide 13–21 and eight T cell lines specific for peptide 114–122, as illustrated by T cell lines presented Fig. 2C. We therefore demonstrated that peptides 13–21 and 114–122 were able to prime a CD8 T cell response in HLA-A2⁺ healthy donors.

Restriction, function, and tumor specificity of peptide-specific T cell lines

HLA-A2 restriction of five T cell lines was confirmed using HLA-A2-transfected and untransfected APCs. Representative experiments with the T cell lines 314.48 and 297.58 are presented in Fig. 4A. In contrast to the HLA-A2⁺ CIR-A2 cells, HLA class I-deficient CIR cells were unable to present the appropriate peptide to T cell lines specific for either 13–21 or 114–122. Moreover, transfection of pMDK into MDK[−] CIR-A2 cells was as efficient as peptides 13–21 or 114–122 in stimulating the T cells, demonstrating that both epitopes were appropriately processed and presented by the APCs. Because transfection led to a higher production of endogenous MDK, we also assessed whether HLA-A2 tumor cells (HepG2) naturally expressing MDK could be recognized by the peptide-specific T cell lines. As shown for four different T cell lines specific for 114–122 (Fig. 4B, left panels) and 13–21 (Fig. 4B, right panels), very strong stimulation of the T cell lines occurred in the presence of the HLA-A2⁺ MDK⁺ HepG2 cell line, whereas CIR-A2 and DLD1 were almost unable to activate them. The 616.11 T cell line was also tested with success for recognition of other HLA-A2⁺ MDK⁺ tumor cells (Caski) (Fig. 4B). For two T cell lines (Fig. 2C), we showed that tumor recognition occurred in an HLA class I-restricted manner. Activation of the 13–21 specific T cell lines 648.24 and 654.7 was inhibited by the HLA class I-specific mAb (W6/32) but not by the isotype control Ab. We investigated the TAP dependence of the MDK presentation using TAP-deficient T2 cells (Fig. 4D). Although the peptides were efficiently presented to peptide-specific T cells,

transfection of the T2 cells with pMDK did not restore T cell stimulation. This plasmid was, however, used with success to activate the same T cell lines (Fig. 4A) by transfection of CIR-A2. Therefore, presentation of both 13–21 and 114–122 appeared to be TAP dependent. Finally, we evaluated the cytotoxicity of T cell lines by their capacity to release perforin (Fig. 5A) or to lyse labeled cells (Fig. 5B). T cell lines 365.55 and 365.36, which were specific for peptide 114–122 and 13–21, respectively, gave rise to a large number of perforin spots when they were in contact with CIR-A2 loaded with the appropriate peptide or with HepG2 (Fig. 5A). They remained inactivated in contact with unloaded CIR-A2 cell lines. Cold target inhibition experiments performed with the 114–122 specific T cell line 581.5 confirmed the peptide specificity of the tumor recognition (Fig. 5B). CIR-A2 cells loaded with the 114–122 peptides were more efficient than unloaded CIR-A2 to inhibit the T cell activation. Altogether, MDK peptides 13–21 and 114–122 elicit HLA-A2-restricted T cells in different donors. The T cells were cytotoxic and specifically recognized MDK⁺ tumor cells and MDK-transfected cell lines.

Induction of MDK-specific T cells in HHD mice

We also investigated the immunogenic properties of pMDK and the identified CD8 T cell epitopes in HHD mice. Mice were immunized with pMDK (Fig. 6A) or the individual peptides (Fig. 6B), and the ex vivo T cell response specific to the two HLA-A2-restricted peptides was evaluated by IFN- γ ELISPOT. All of the individual mice immunized with pMDK exhibited a T cell response to the peptides 114–122 and 13–21. Immunization with individual peptides led to good peptide-specific T cell responses

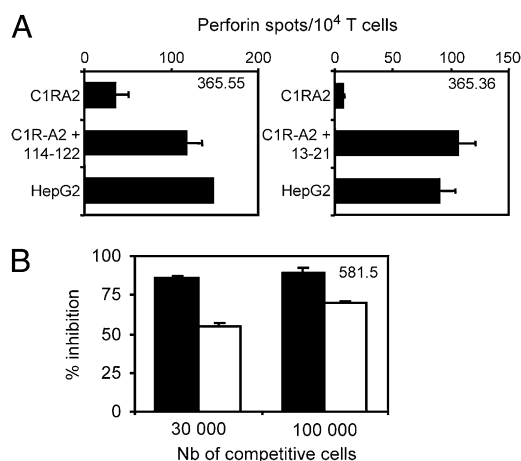


FIGURE 5. Cytotoxic activities of MDK-specific T cell lines. *A*, HLA-A2-transfected CIR cells (CIR-A2) were pulsed for 4 h with peptide 13–21 or 114–122. Target cells (HepG2 or CIR-A2) were incubated (3×10^4 cells per well) with 114–122 (365.55) or 13–21 (365.36) specific T cell lines. T cell cytotoxicity was revealed by perforin ELISPOT. *B*, Calcein-loaded HepG2 cells (5000 cells per well) were incubated with the MDK 114–122 specific T cell line 581.5 (20,000 cells per well) with CIR-A2 loaded with the peptide (black) or unloaded (blank). Specific cell lysis was calculated using values obtained with killed calcein-loaded HepG2 as maximum values and unkilld calcein-loaded HepG2 as background. Data were reported as inhibition percentage of the recognition in absence of competitive cells.

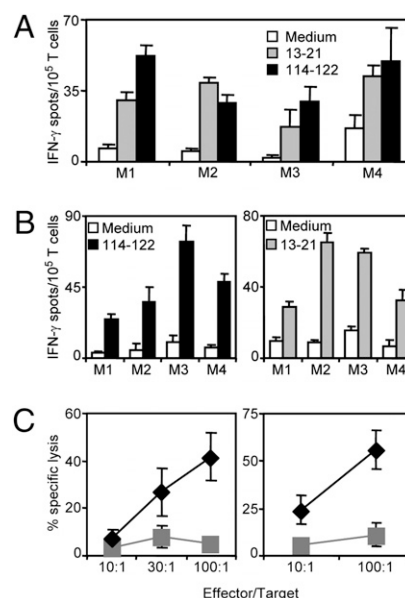


FIGURE 6. Induction of MDK-specific CTL responses in HHD transgenic mice. Groups of four HHD transgenic mice (M1, M2, M3, and M4) were immunized with MDK DNA (*A*) or with the individual peptides 114–122 (*B*, left panel) and 13–21 (*B*, right panel). At day 10, splenocytes were harvested and incubated (1×10^5 cells per well) with 2.5 μ g/ml MDK peptide 13–21 (gray) or 114–122 (black) or with culture medium (white). T cell activation was evaluated by IFN- γ ELISPOT assay. Data were reported for each mouse. *C*, Splenocytes of four HHD transgenic mice immunized with MDK DNA were stimulated with the individual peptides 114–122 (left panel) and 13–21 (right panel) for 1 wk. A standard 4-h [⁵¹Cr] release assay was then performed using RMA-S-HHD cells pulsed for 4 h with the individual MDK peptides (black squares) or an irrelevant peptide (gray squares) as targets at the indicated E:T ratios (100 represents 1×10^5 effector cells per well). Results are expressed as the mean specific lysis obtained with four mice.

in all of the mice. Finally, cytotoxic activity of the peptide-specific T cells was demonstrated by the [^{51}Cr] release assay (Fig. 6C). Our data obtained in vitro on human cells or in vivo in HLA-A2 transgenic mice show that MDK constitutes a novel tumor-shared Ag.

Discussion

We provide the first evidence that the protein MDK can be considered as a tumor-shared Ag. Human CD8 $^{+}$ T cell response specific for MDK-expressing tumor cells was induced in vitro using PBMCs from healthy donors, and immunized HHD transgenic mice developed a cytotoxic response specific for MDK. Because of its wide expression in cancer tissues and its contribution to tumorigenesis, MDK appears as an attractive candidate for a cancer vaccine.

MDK was initially isolated as a protein induced in the early stage of differentiation of embryonal carcinoma cells (11). Further investigations demonstrated its wide expression in tumors (12–14) and its multiple functions in favor of tumor expansion (28). These studies supported therapeutic strategies based on MDK neutralization using antisense DNA (21) or Abs (29) to block the growth of tumor cells. A gene suicide-based strategy using MDK promoter has been also proposed (30). We therefore considered the opportunity to target MDK by the cellular response to obtain a T cell response specific for a wide range of tumors. Although a basal level of MDK was seen in healthy individuals, we did not fear some deleterious effect in eliciting an MDK-specific cytotoxic response. Although required for neuronal embryogenesis, its role in adults rarely appears beneficial, as MDK seems to participate in ischemic renal injury (16) and autoimmune responses (17). Accordingly, MDK-deficient mice do not exhibit serious developmental abnormalities (16, 31), and mice vaccinated with peptides and DNA in our studies did not show any signs of autoimmunity. Finally, its crucial role in tumor growth is expected to limit tumor escape from immune attack through its selective loss. Its angiogenic function is extremely attractive to limit metastasis, as proposed for the angiogenic cell growth factor-1, for which a mutated form has been found to be the natural target of CTL T cells in patients with multiple myeloma (32).

MDK is a secreted protein like other identified tumor Ags (33–36) and is therefore produced in the endoplasmic reticulum (ER) after cleavage of the signal peptide. Because presentation of the MDK peptide 114–122 appeared to be TAP dependent, three alternative pathways could be employed to present it to CD8 T cells. First, secreted proteins like calreticulin (37) could be present in the cytosol due to an aborted translocation mechanism. Alternatively, the secreted molecule is either translocated from the ER into the cytosol (38) or captured by the APCs through a receptor-mediated mechanism, as shown for matrix metalloproteinase-2 (34). Capture by the LRP receptor has indeed been implicated in the targeting of MDK to proteasome degradation (39). Interestingly, the T cell epitope MDK 13–21 we identified in HLA-A2 healthy donors and HLA-A2 transgenic mice is localized in the signal peptide (MDK 1–22). Signal peptides comprise multiple hydrophobic residues that serve to anchor the nascent polypeptide to the membrane (40). They could also serve as anchor residues for HLA class I molecules, especially for HLA-A2, which has a marked preference for hydrophobic residues (41). Accordingly, elution of naturally processed peptides revealed their natural presentation by HLA-A class I molecules (42), and CD8 T cell epitopes derived from signal peptides have been described in virus (43) and tumor Ags (44, 45). In contrast to a recently identified T cell epitope localized in the peptide signal of preprocalcitonin (35), the 13–21 MDK T cell epitope did not seem to be processed in the lumen of the ER but required translocation from the cytosol to the ER by the TAP transporter and hence should be processed in the cytosol. This is not a particular

feature of MDK CD8 T cell epitopes, as presentation of other epitopes derived from the signal peptide was also TAP dependent (43).

Finally, MDK has been proposed as a biomarker for diagnosis of tumor-bearing patients. MDK was found to be expressed at early stages of carcinogenesis of colorectal (13) and prostate (46) cancers. As a secreted protein, MDK can also be quantitated in the serum (47). In healthy donors, the serum level of MK is ~ 0.15 ng/ml with a cutoff of 0.5 ng/ml, whereas it is significantly higher in various types of human carcinomas (48), such as hepatocellular (48) esophageal (49), gastric (50), and neuroblastoma cancers (23). MDK was detectable at early stages (48), and the plasma level has been reported to be correlated with poor outcome (23, 24). Interestingly, MDK was also detectable in urine samples of patients with cancer (25). Although significant, the increase in serum concentration observed between healthy patients and patients with cancer remains limited (48). This increase is therefore not expected to dramatically alter the CD8 T cell response observed with healthy donors, because this response seems to be affected by high concentrations of soluble Ags only (51). In contrast to many tumor Ags, MDK expression in tumors could be revealed by its detection in the blood or the urine. MDK-based vaccination using peptides, DNA, the whole protein, or viral vectors could be applied to patients who have a significant level of MDK in their body fluids.

We showed that human CD8 $^{+}$ T cell response specific for MDK-expressing tumor cells can be induced in vitro using PBMCs from healthy donors and immunized HHD transgenic mice developed a cytotoxic response specific for MDK. Preliminary experiments performed on eight different patients with cancer did not reveal any spontaneous T cell response specific for the MDK epitopes (Supplemental Fig. 1), but we did not have access to MDK expression in these donors. We also did not show any effect of peptide immunization on the growth of B16 transfected with HLA-A2 and naturally expressing the murine MDK (data not shown). These preliminary experiments were not fully conclusive as several differences exist between human and murine MDK sequences especially in the 13–21 epitope. Further studies will address the vaccine potential in HHD mice using stable transfectants of human MDK. In conclusion, because of its wide expression in cancer tissues and its contribution to tumorigenesis, MDK appears as a novel attractive candidate for a cancer vaccine.

Acknowledgments

We thank Dr. S. Raffestin for advice.

Disclosures

J.K. and B.M. are coauthors of a pending patent.

References

- Novellino, L., C. Castelli, and G. Parmiani. 2005. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol. Immunother.* 54: 187–207.
- Boon, T., P. G. Coulie, B. J. Van den Eynde, and P. van der Bruggen. 2006. Human T cell responses against melanoma. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 175–208.
- Jäger, E., M. Ringhoffer, M. Altmannsberger, M. Arand, J. Karbach, D. Jäger, F. Oesch, and A. Knuth. 1997. Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int. J. Cancer* 71: 142–147.
- Riker, A., J. Cormier, M. Panelli, U. Kammula, E. Wang, A. Abati, P. Fetsch, K. H. Lee, S. Steinberg, S. Rosenberg, and F. Marincola. 1999. Immune selection after antigen-specific immunotherapy of melanoma. *Surgery* 126: 112–120.
- Brasseur, F., M. Marchand, R. Vanwijck, M. Héryn, B. Lethé, P. Chomez, and T. Boon. 1992. Human gene MAGE-1, which codes for a tumor-rejection antigen, is expressed by some breast tumors. *Int. J. Cancer* 52: 839–841.
- Serrano, A., B. Lethé, J. M. Delroisse, C. Lurquin, E. De Plaen, F. Brasseur, D. Rimoldi, and T. Boon. 1999. Quantitative evaluation of the expression of MAGE genes in tumors by limiting dilution of cDNA libraries. *Int. J. Cancer* 83: 664–669.

7. Vonderheide, R. H., W. C. Hahn, J. L. Schultze, and L. M. Nadler. 1999. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 10: 673–679.
8. Schmitz, M., P. Diestelkoetter, B. Weigle, F. Schmachtenberg, S. Stevanovic, D. Ockert, H. G. Rammensee, and E. P. Rieber. 2000. Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.* 60: 4845–4849.
9. Andersen, M. H., J. C. Becker, and P. Thor Straten. 2005. The antiapoptotic member of the Bcl-2 family Mcl-1 is a CTL target in cancer patients. *Leukemia* 19: 484–485.
10. Wang, X. F., J. Kerzerho, O. Adotevi, H. Nuytens, C. Badoual, G. Munier, S. Oudard, S. Tu, E. Tartour, and B. Maillere. 2008. Comprehensive analysis of HLA-DR- and HLA-DP4-restricted CD4+ T cell response specific for the tumor-shared antigen survivin in healthy donors and cancer patients. *J. Immunol.* 181: 431–439.
11. Kadomatsu, K., M. Tomomura, and T. Muramatsu. 1988. cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151: 1312–1318.
12. O'Brien, T., D. Cranston, S. Fuggle, R. Bicknell, and A. L. Harris. 1996. The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res.* 56: 2515–2518.
13. Ye, C., M. Qi, Q. W. Fan, K. Ito, S. Akiyama, Y. Kasai, M. Matsuyama, T. Muramatsu, and K. Kadomatsu. 1999. Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 79: 179–184.
14. Koide, N., H. Hada, T. Shinji, K. Ujiie, S. Hirasaki, Y. Yumoto, T. Hanafusa, K. Kadomatsu, H. Muramatsu, T. Muramatsu, and T. Tsuji. 1999. Expression of the midkine gene in human hepatocellular carcinomas. *Hepatogastroenterology* 46: 3189–3196.
15. Haynes, L., and M. Rumsby. 2001. The pleiotropin/midkine family of cytokines: role in glial-neuronal signalling. *Prog. Brain Res.* 132: 313–324.
16. Sato, W., K. Kadomatsu, Y. Yuzawa, H. Muramatsu, N. Hotta, S. Matsuo, and T. Muramatsu. 2001. Midkine is involved in neutrophil infiltration into the tubulointerstitium in ischemic renal injury. *J. Immunol.* 167: 3463–3469.
17. Maruyama, K., H. Muramatsu, N. Ishiguro, and T. Muramatsu. 2004. Midkine, a heparin-binding growth factor, is fundamentally involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 50: 1420–1429.
18. Choudhuri, R., H. T. Zhang, S. Donnini, M. Ziche, and R. Bicknell. 1997. An angiogenic role for the neurokines midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res.* 57: 1814–1819.
19. Muramatsu, H., and T. Muramatsu. 1991. Purification of recombinant midkine and examination of its biological activities: functional comparison of new heparin binding factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177: 652–658.
20. Wang, Q., Y. Huang, Y. Ni, H. Wang, and Y. Hou. 2007. siRNA targeting midkine inhibits gastric cancer cells growth and induces apoptosis involved caspase-3,8,9 activation and mitochondrial depolarization. *J. Biomed. Sci.* 14: 783–795.
21. Takei, Y., K. Kadomatsu, S. Matsuo, H. Itoh, K. Nakazawa, S. Kubota, and T. Muramatsu. 2001. Antisense oligodeoxynucleotide targeted to Midkine, a heparin-binding growth factor, suppresses tumorigenicity of mouse rectal carcinoma cells. *Cancer Res.* 61: 8486–8491.
22. Maeda, S., H. Shinchi, H. Kurahara, Y. Mataka, H. Noma, K. Maemura, K. Aridome, T. Yokomine, S. Natsugoe, T. Aikou, and S. Takao. 2007. Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma. *Br. J. Cancer* 97: 405–411.
23. Ikematsu, S., A. Nakagawara, Y. Nakamura, M. Ohira, M. Shinjo, S. Kishida, and K. Kadomatsu. 2008. Plasma midkine level is a prognostic factor for human neuroblastoma. *Cancer Sci.* 99: 2070–2074.
24. Kaifi, J. T., H. C. Fiegel, S. L. Rafnisdottir, K. Aridome, P. G. Schurr, U. Reichelt, R. Wachowiak, H. Kleinhans, E. F. Yekebas, O. Mann, et al. 2007. Midkine as a prognostic marker for gastrointestinal stromal tumors. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 133: 431–435.
25. Ikematsu, S., K. Okamoto, Y. Yoshida, M. Oda, H. Sugano-Nagano, K. Ashida, H. Kumai, K. Kadomatsu, H. Muramatsu, Takashi Muramatsu, and S. Sakuma. 2003. High levels of urinary midkine in various cancer patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306: 329–332.
26. Neri, S., E. Mariani, A. Meneghetti, L. Cattini, and A. Facchini. 2001. Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8: 1131–1135.
27. Firat, H., F. Garcia-Pons, S. Tourdot, S. Pascolo, A. Scardino, Z. Garcia, M. L. Michel, R. W. Jack, G. Jung, K. Kosmatopoulos, et al. 1999. H-2 class I knockout, HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies. *Eur. J. Immunol.* 29: 3112–3121.
28. Kadomatsu, K., and T. Muramatsu. 2004. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett.* 204: 127–143.
29. Maehara, H., T. Kaname, K. Yanagi, H. Hanzawa, I. Owan, T. Kinjou, K. Kadomatsu, S. Ikematsu, T. Iwamasa, F. Kanaya, and K. Naritomi. 2007. Midkine as a novel target for antibody therapy in osteosarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358: 757–762.
30. Miyauchi, M., Y. Yoshida, Y. Tada, M. Narita, T. Maeda, R. Bahar, K. Kadomatsu, T. Muramatsu, S. Matsubara, A. Nakagawara, et al. 2001. Expression of herpes simplex virus-thymidine kinase gene controlled by a promoter region of the midkine gene confers selective cytotoxicity to ganciclovir in human carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 91: 723–727.
31. Zou, P., H. Muramatsu, M. Sone, H. Hayashi, T. Nakashima, and T. Muramatsu. 2006. Mice doubly deficient in the midkine and pleiotrophin genes exhibit deficits in the expression of beta-tectorin gene and in auditory response. *Lab. Invest.* 86: 645–653.
32. Slager, E. H., M. W. Honders, E. D. van der Meijden, S. A. van Luxemburg-Heijs, F. M. Kloosterboer, M. G. Kester, I. Jedema, W. A. Marijt, M. R. Schaafsma, R. Willemze, and J. H. Falkenburg. 2006. Identification of the angiogenic endothelial-cell growth factor-1/thymidine phosphorylase as a potential target for immunotherapy of cancer. *Blood* 107: 4954–4960.
33. Correale, P., K. Walmsley, S. Zaremba, M. Zhu, J. Schlom, and K. Y. Tsang. 1998. Generation of human cytolytic T lymphocyte lines directed against prostate-specific antigen (PSA) employing a PSA oligopeptide peptide. *J. Immunol.* 161: 3186–3194.
34. Godefroy, E., A. Moreau-Aubry, E. Diez, B. Dreno, F. Jotereau, and Y. Guilloux. 2005. alpha v beta3-dependent cross-presentation of matrix metalloproteinase-2 by melanoma cells gives rise to a new tumor antigen. *J. Exp. Med.* 202: 61–72.
35. El Hage, F., V. Stroobant, I. Vergnon, J. F. Baurain, H. Echchakir, V. Lazar, S. Chouaib, P. G. Coulie, and F. Mami-Chouaib. 2008. Preprocalcitonin signal peptide generates a cytotoxic T lymphocyte-defined tumor epitope processed by a proteasome-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 10119–10124.
36. Yokoyama, Y., F. Grünebach, S. M. Schmidt, A. Heine, M. Häntschel, S. Stevanovic, H. G. Rammensee, and P. Brossart. 2008. Matrilysin (MMP-7) is a novel broadly expressed tumor antigen recognized by antigen-specific T cells. *Clin. Cancer Res.* 14: 5503–5511.
37. Shaffer, K. L., A. Sharma, E. L. Snapp, and R. S. Hegde. 2005. Regulation of protein compartmentalization expands the diversity of protein function. *Dev. Cell* 9: 545–554.
38. Lilley, B. N., and H. L. Ploegh. 2004. A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429: 834–840.
39. Suzuki, N., Y. Shibata, T. Urano, T. Murohara, T. Muramatsu, and K. Kadomatsu. 2004. Proteasomal degradation of the nuclear targeting growth factor midkine. *J. Biol. Chem.* 279: 17785–17791.
40. Hegde, R. S., and H. D. Bernstein. 2006. The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem. Sci.* 31: 563–571.
41. Rammensee, H. G., T. Friede, and S. Stevanović. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41: 178–228.
42. Wei, M. L., and P. Cresswell. 1992. HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature* 356: 443–446.
43. Guéguen, M., W. E. Biddison, and E. O. Long. 1994. T cell recognition of an HLA-A2-restricted epitope derived from a cleaved signal sequence. *J. Exp. Med.* 180: 1989–1994.
44. Wölfel, C., I. Drexler, A. Van Pel, T. Thres, N. Leister, W. Herr, G. Sutter, C. Huber, and T. Wölfel. 2000. Transporter (TAP)- and proteasome-independent presentation of a melanoma-associated tyrosinase epitope. *Int. J. Cancer* 88: 432–438.
45. Mitchell, M. S., T. A. Lund, A. K. Sewell, F. M. Marincola, E. Paul, K. Schroder, D. B. Wilson, and J. Kan-Mitchell. 2007. The cytotoxic T cell response to peptide analogs of the HLA-A*0201-restricted MUC1 signal sequence epitope, M1.2. *Cancer Immunol. Immunother.* 56: 287–301.
46. Konishi, N., M. Nakamura, S. Nakaoka, Y. Hiasa, M. Cho, H. Uemura, Y. Hirao, T. Muramatsu, and K. Kadomatsu. 1999. Immunohistochemical analysis of midkine expression in human prostate carcinoma. *Oncology* 57: 253–257.
47. Muramatsu, H., X. J. Song, N. Koide, H. Hada, T. Tsuji, K. Kadomatsu, T. Inui, T. Kimura, S. Sakakibara, and T. Muramatsu. 1996. Enzyme-linked immunosorbent assay for midkine, and its application to evaluation of midkine levels in developing mouse brain and sera from patients with hepatocellular carcinomas. *J. Biochem.* 119: 1171–1175.
48. Ikematsu, S., A. Yano, K. Aridome, M. Kikuchi, H. Kumai, H. Nagano, K. Okamoto, M. Oda, S. Sakuma, T. Aikou, et al. 2000. Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas. *Br. J. Cancer* 83: 701–706.
49. Shimada, H., Y. Nabeya, M. Tagawa, S. Okazumi, H. Matsubara, K. Kadomatsu, T. Muramatsu, S. Ikematsu, S. Sakuma, and T. Ochiai. 2003. Preoperative serum midkine concentration is a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 94: 628–632.
50. Obata, Y., S. Kikuchi, Y. Lin, K. Yagyu, T. Muramatsu, H. Kumai, and Tokyo Research Group on Prevention of Gastric Cancer. 2005. Serum midkine concentrations and gastric cancer. *Cancer Sci.* 96: 54–56.
51. Loirat, D., M. Mancini-Bourguin, J. P. Abastado, and M. L. Michel. 2003. HBsAg/HLA-A2 transgenic mice: a model for T cell tolerance to hepatitis B surface antigen in chronic hepatitis B virus infection. *Int. Immunol.* 15: 1125–1136.