



**HAL**  
open science

# Développement d'immunothérapies contre l'antigène de tumeur universel hTERT basées sur différentes stratégies vaccinales

Élodie Pliquet

► **To cite this version:**

Élodie Pliquet. Développement d'immunothérapies contre l'antigène de tumeur universel hTERT basées sur différentes stratégies vaccinales. Immunothérapie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066747 . tel-03616587

**HAL Id: tel-03616587**

**<https://theses.hal.science/tel-03616587>**

Submitted on 22 Mar 2022

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

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

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 515 - Complexité du Vivant

*INVECTYS, Institut Cochin, Paris*

*Unité de Rétrovirologie Moléculaire, CNRS-URA 3015, Institut Pasteur, Paris*

**Développement d'immunothérapies contre  
l'antigène de tumeur universel hTERT basées sur  
différentes stratégies vaccinales**

Thèse de doctorat d'Immunologie

par

**Elodie PLIQUET**

Dirigée par le Professeur Simon WAIN-HOBSON  
et par le Docteur Pierre LANGLADE-DEMOYEN

Présentée et soutenue confidentielle le 10 Juillet 2015

**Devant un jury composé de :**

Rapporteurs

Professeur Claude LECLERC

Docteur Loïc YSEBAERT

Examineurs

Docteur Fathia MAMI-CHOUAIB

Professeur Adrien SIX

Docteur Frédéric TANGY

Directeur INVECTYS

Docteur Pierre LANGLADE-DEMOYEN

Directeur de thèse

Professeur Simon WAIN-HOBSON





*Aux étoiles illuminant ma vie et à celles qui se sont éteintes...*

*« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi ! »*

*Albert Einstein  
(1879-1955)*



# Remerciements

Je tenais tout d'abord à remercier les deux co-fondateurs de la société Invectys, Pierre Langlade-Demoyen et Simon Wain-Hobson, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser une thèse CIFRE. D'un recrutement pour ingénieur d'étude à un double statut de thésarde, il n'y a finalement qu'un pas et beaucoup de discussions. Je tiens à vous remercier de m'avoir fait confiance pour contribuer aux différents projets de l'entreprise et d'avoir fait de ces trois années, une expérience à la fois unique et tumultueuse que je ne suis pas prête d'oublier.

Je remercie Pierre, pour ses discours passionnés, riches en idées ainsi que la grande autonomie qu'il m'a laissé pour gérer une collaboration qui a été très formatrice et intéressante.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Simon pour m'avoir écoutée et soutenue jusqu'à la finalisation de cette thèse. Merci pour ton enthousiasme, tes inégalables jeux de mots et tes expressions « *so british* » en tout genre souvent philosophiques.

Je souhaite également témoigner ma reconnaissance aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Je tiens particulièrement à remercier le Pr. Claude Leclerc et le Dr. Loïc Ysebaert d'avoir accepté le rôle de rapporteurs pour ce travail et de m'avoir fait part de vos remarques et suggestions afin d'améliorer mon manuscrit.

Je tiens également à remercier le Dr. Fathia Mami-Chouaib et le Dr. Frédéric Tangy d'avoir accepté d'être examinateurs. J'ai eu l'honneur de vous avoir respectivement comme expert et tuteur durant ces trois années de thèse au sein des comités et je vous remercie pour vos conseils, vos remarques et votre écoute qui m'ont beaucoup aidée.

Je souhaite sincèrement remercier le Pr. Adrien Six pour avoir accepté de présider ce jury. Je n'aurais pu espérer de meilleur président que mon professeur d'immunologie et d'APP à l'université, vous m'avez toujours prodigué de bons conseils et êtes en partie l'une des raisons pour lesquelles l'immunologie me passionne tant.

J'exprime aussi mes remerciements à Abderrahim Lachgar, pour la gestion des démarches de mon dossier de thèse CIFRE et pour ses conseils ; et à Thierry Huet, directeur R&D, pour les discussions constructives sur les différents aspects de ce travail.

Ensuite, je souhaiterais remercier, Christelle Liard, une personne qui n'est plus dans la société et à qui je dois beaucoup. Christelle, merci d'avoir partagé tes connaissances scientifiques et d'avoir été présente pour moi.

Je tiens aussi à exprimer mon immense gratitude à mon responsable nouvellement arrivé, Ludovic Bourré. Merci pour avoir passé tes week-ends à relire mon manuscrit, pour tes remarques et conseils au détour de nos discussions.

Enfin, mes collègues, tout particulièrement Jessie Thalmensi, sans qui cette thèse aurait été beaucoup plus difficile à réaliser. Au fil de ces trois ans, nous avons eu notre lot d'aléas et je suis contente de les avoir traversés avec toi. J'admire ta soif de connaissance et cela fut un réel plaisir de travailler, de gérer et de discuter avec toi, je pense que nous avons formé un bon « binôme » (avec les hauts comme les bas). Tu as toujours été franche avec moi, même si en général je « boude » après, c'est ce que j'apprécie le plus chez toi. Jess, merci pour ton soutien, « *boost* » inconditionnel durant cette étape, merci aussi pour les conversations délirantes et autres blagues en tout genre du style le café au tic-tac (celle-là, j'en ai aussi fait les frais) ou l'huile, certains comprendront...

Je souhaite aussi remercier Marie Escande, ma collègue d'arrivée à Invectys qui m'a soutenue et avec qui j'ai partagé ma phase d'adaptation à la thèse chez Invectys. Marie, merci de m'avoir formée sur certains gestes techniques, en effet, en rapidité d'attrapage des animaux à une main, il va falloir que je m'entraîne encore un peu si je veux t'égalier.

Ensuite, je tiens sincèrement à remercier toutes les personnes qui ont travaillé avec moi sur les projets. Thomas Bestetti et Marion Julithe, pour leur bonne humeur, leur contribution aux projets et leur aide inestimable chaque jour. Thomas, notre « *caféinoman* » imaginaire, bon je suis loin d'être celle qui te charrie le plus, mais comme on dit « qui aime bien, châtie bien ». Marion, toujours « feu patate » ou « lancée comme un frelon », expression dont j'ignorais complètement l'existence avant de te rencontrer. J'adore, et nos discussions pause-café aussi!

AnSo Pailhes-Jimenez, je ne t'ai pas oubliée non plus, en tant qu'ancienne « *western girl* », merci pour tes conseils et ton aide sur mon projet. Merci aussi pour ta bonne humeur et ton accent chantant du sud. Petite faveur pour la prochaine manip de cytotox vitro que vous planifiez, Jess et toi, prévenez nous du programme assez à l'avance, qu'on prenne des forces et des victuailles. La dernière fois, on a dégusté dans tous les sens du terme.

Les « filles » (Jess, AnSo, Marion et parfois Thomas !!), merci aussi pour tous ces « *after* » que nous avons pu partager, j'en garde des inégalables en mémoire.

Je remercie également, Anna Kostrzak et Emanuèle Bourges, pour leur aide dans mon projet et leur bonne humeur. Anna, j'espère que les petits livres de langue française te servent et que tu t'entraînes. Manue, tu es la joie incarnée, j'adore nos conversations complètement loufoques surtout en ce qui concerne la nourriture, merci pour les messages des « minions ».

Je remercie également Maria Loustau et Julien Caummartin, pour leurs conseils. Maria, j'attends le plat argentin que tu m'as promis. Alors, Julien, même si grâce à toi j'ai enfin regardé quelques épisodes de Kaamelott, saches que je te revaudrai le surnom qui va me poursuivre!

Je tiens également à remercier Sandrine Demoulin pour sa présence au cours de cette thèse sur tous les aspects à la fois administratif et humain. Merci pour ton aide et tes conseils.

J'en viens à remercier mes deux équipes d'adoption, tout d'abord celle de Rétrovirologie, avec Vincent, Momo, Rodolphe, Michel, Hélène, Camille, Valérie et Jean-Pierre. Merci pour votre accueil à chacune de mes apparitions.

Ensuite, dans l'équipe de G2V, je remercie ma petite Claude pour m'avoir grandement aidée sur ce projet. Merci pour ta bonne humeur et toute ton expertise. Merci aussi à Valérie et Chantal pour leur aide niveau construction et leur convivialité.

Merci aussi à Christophe Calvet, un ancien collaborateur pour ses bons conseils !

Un petit mot particulier à mes amis Am, Mat et Auré et d'autres qui se reconnaîtront pour avoir partagé les bancs de la fac ou du lycée avec moi, pour leur soutien, nos discussions style « Am, Auré et Elo, les bons tuyaux » et soirées décompression de folie.

Un grand merci à ma maman, à mon « beau papa » et à Martine, pour votre soutien et votre aide incroyable en corrections. A ma maman et à mes grands-parents qui ont toujours cru en moi et ont toujours été présents à mes côtés. Je vous aime !

Petit mot pour ma Yvette et ma Cricri, ceci est pour Pierrot et Michel. Pensées aussi, à mon papa, qui, j'espère aurait été fier de moi.

Merci aussi à mes beaux-parents pour leur aide et soutien inestimable.

A l'homme que j'aime et qui partage ma vie au quotidien, Romain. Merci d'être présent à mes côtés chaque jour. Merci d'avoir supporté et enduré cette période difficile, même avec tout mon amour, je ne te remercierai jamais assez pour ça.



# Sommaire

<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>13</b>
<b>PREAMBULE.....</b>	<b>15</b>
<b>CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....</b>	<b>17</b>
<b>I. Le Cancer - une pathologie mondiale .....</b>	<b>19</b>
1. Epidémiologie.....	19
2. Cancérogenèse .....	21
2.1. Processus multi-étapes .....	21
2.2. Les « hallmarks » du cancer .....	23
2.3. Le microenvironnement tumoral .....	25
3. Les traitements conventionnels et thérapies ciblées.....	26
3.1. Chirurgie.....	26
3.2. Chimiothérapie.....	26
3.3. Radiothérapie .....	27
3.4. Hormonothérapie .....	27
3.5. Thérapies ciblées.....	27
<b>II. Immunité anti-tumorale .....</b>	<b>33</b>
1. Rôle et classification des antigènes tumoraux .....	34
2. Immuno-édition, de l'immuno-surveillance à l'échappement .....	36
2.1. Elimination – Immuno-surveillance.....	37
2.1.1. Recrutement des cellules de l'immunité innée .....	37
2.1.1.1. Les cellules NK.....	37
2.1.1.2. Les cellules NKT.....	38
2.1.1.3. Les L $\gamma\delta$ .....	38
2.1.1.4. Les macrophages associés aux tumeurs .....	39
2.1.2. Capture et présentation antigénique par les DCs .....	39
2.1.3. Lymphocytes T spécifiques des tumeurs .....	41
2.1.3.1. Synapse immunologique et activation des lymphocytes .....	41
2.1.3.2. Lymphocytes T CD4 .....	43
2.1.3.3. Lymphocytes T CD8 .....	44
2.1.4. Rôle crucial des cytokines dans l'immuno-surveillance.....	46
2.2. Equilibre.....	48

2.3. Echappement .....	49
2.3.1. Résistance associée aux cellules tumorales .....	49
2.3.1.1. Molécules exprimées par les cellules tumorales .....	49
2.3.1.2. Facteurs immunosuppresseurs libérés par les cellules tumorales .....	50
2.3.2. Immunosuppression induite par le SI .....	51
3. La Télomérase Reverse Transcriptase humaine : TAA universel .....	53
3.1. Structure de la télomérase .....	54
3.2. Rôle de la télomérase dans la cancérogenèse .....	56
3.3. Expression de la télomérase dans le cancer .....	58
3.4. A la fois cible naturelle et thérapeutique .....	60
<b>III. Immunothérapie anti-tumorale .....</b>	<b>63</b>
1. Immunothérapie passive .....	64
1.1. Anticorps monoclonaux .....	64
1.2. Thérapie cellulaire adoptive .....	66
2. Immunothérapie active .....	68
2.1. Non spécifique .....	68
2.1.1. Bactéries/TLR adjuvants .....	68
2.1.2. Cytokines .....	69
2.2. Spécifique (vaccins thérapeutiques) .....	69
2.2.1. Vaccins basés sur les cellules tumorales .....	71
2.2.2. Vaccins basés sur les DCs .....	72
2.2.3. Vaccins basés sur les peptides ou protéines .....	73
2.2.4. Vaccins génétiques .....	74
3. Vaccination ADN .....	75
3.1. Historique .....	75
3.2. Mécanismes .....	76
3.3. Avantages et inconvénients .....	80
3.4. Voie d'injection et méthodes de transfert .....	81
3.4.1. La peau, un site immunitaire privilégié .....	82
3.4.2. Administration intradermique des vaccins ADN .....	84
3.4.3. Electrotransfert de gènes .....	85
3.5. Essais cliniques vaccin ADN anti-cancer .....	87
4. Vaccination basée sur un virus vivant atténué rougeole .....	88
4.1. Système viral de délivrance .....	88
4.2. Type de vecteurs : avantages et inconvénients .....	89
4.3. Virus de la rougeole et souche atténuée du vaccin .....	91
4.3.1. Structure, cycle viral et souche atténuée .....	91

4.3.2. Récepteurs .....	93
4.3.3. Vaccins atténués : efficacité et sécurité .....	93
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>96</b>
<b>OUTILS - METHODES.....</b>	<b>100</b>
<b>I. Vaccin ADN : constructions plasmidiques.....</b>	<b>103</b>
1. INVAC-1 : plasmide et protéine.....	103
2. Dérivés réarrangés d'INVAC-1 : pUTScram et pUTInv .....	104
<b>II. Vecteur dérivé du Vaccin Rougeole : MV-TERT .....</b>	<b>105</b>
1. Clonage des souches vaccinales du MV .....	105
2. Vecteur dérivé de la Souche Schwarz et insertion d'une ATU .....	108
3. Insertion du transgène Ubi- $\Delta$ hTERT-Flu-V5 au sein de l'ATU .....	110
4. Vecteur vaccinal MV-TERT obtenu à partir du pTM-MV-TERT .....	110
<b>III. Animaux transgéniques .....</b>	<b>112</b>
<b>IV. Epitopes CD4 et CD8 spécifiques de hTERT .....</b>	<b>113</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>116</b>
<b>I. Développement d'immunothérapies basées sur la vaccination ADN .....</b>	<b>118</b>
1. Vaccin INVAC-1 et procédure EGT optimisée (article #1 & #2) .....	118
1.1. ARTICLE #1 .....	118
1.2. ARTICLE #2 .....	130
2. Vaccins réarrangés dérivés d'INVAC-1 : Scrambled et Inverted .....	162
2.1. Dégradation des dérivés réarrangés d'INVAC-1 par la voie du protéasome .....	162
2.2. Profil d'exclusion nucléolaire et inactivité catalytique.....	163
2.3. Induction de fortes réponses CD8 hTERT spécifiques .....	165
2.4. Cytotoxicité des réponses CD8 spécifiques de hTERT .....	166
<b>II. Développement d'immunothérapie basée sur le vecteur recombinant rougeole .....</b>	<b>168</b>
2.1. Expression du transgène Ubi- $\Delta$ hTERT-Flu-V5 par le vecteur MV-TERT .....	169
2.2. Induction de fortes réponses LTs hTERT et MV spécifiques.....	170
2.3. La vaccination MV-TERT induit des CTLs spécifiques de hTERT .....	171
2.4. Non détection d'anticorps anti-hTERT en réponse à MV-TERT .....	173
2.5. Vaccination hétérologue INVAC-1 + MV-TERT .....	175

<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>178</b>
Pertinence de l'antigène tumoral hTERT .....	181
Evaluation de l'efficacité de la vaccination ADN hTERT combinée à une procédure EGT optimisée .....	183
Evaluation de l'efficacité du vecteur recombinant MV-TERT .....	190
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>194</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>198</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>204</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>236</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX.....</b>	<b>238</b>

# Abréviations

AA	Acide aminé
ACT	Transfert adoptif de cellule
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFP	$\alpha$ -fetoprotéine
APM	Antigen presentation machinery
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
ATU	Unité additionnelle de transcription
BCG	Bacille Calmette–Guérin
BCR-ABL	Breakpoint cluster region-Abelson
CCR	Récepteur chimiokine C-C
CD	Cluster de différenciation
CDC	Complement-dependent cytotoxicity
CEA	Antigène carcinoembryonnaire
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CMH	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CMV	Cytomégalo virus
CPA	Cellule présentatrice de l’antigènes
CSCs	Cellules souches cancéreuses
CTA	Cancer-testis antigen
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
CTLA	Cytotoxic T lymphocyte antigen
DAMPs	Danger-associated molecular patterns
DC	Dendritic cell
DLN	Ganglion drainant
EGT	Electrotransfert de gènes
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELISpot	Enzyme-linked immunospot assay
FcR	Récepteur au Fragment Fc
FGF	Fibroblast growth factor
Foxp3	Forkhead box P3
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GrB	Granzyme B
HBV	Hépatite B virus
HCV	Hépatite C virus
HER/EGFR	Human epidermal growth factor receptor
HIV	Virus de l’immunodéficience humaine
HLA	Human leukocyte antigen
HMGB1	High mobility group box 1
HPV	Human papilloma virus
HSV	Virus de l’Herpès Simplex
hTERC	Human telomerase RNA component
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
ID	Intradermique
IFN	Interféron
IFNAR	Récepteur Interféron-alpha/beta

IFNGR	Récepteur Interféron-gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IM	Intramusculaire
IT	Intratumorale
IV	Intraveineuse
LB	Lymphocyte B
LT	Lymphocytes
mAb	Anticorps monoclonal
MDSC	Cellules myéloïdes suppressives
MEC	Matrice extracellulaire
MICA/B	MHC class I chain-related A/B
MSH	DNA mismatch repair protein
MV	Virus de la Rougeole
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor- $\kappa$ B
NIS	Symport Na/I
NK/NKR	Natural killer/Natural killer receptor
NKT	Cellule NK tueuse
NLRs	Récepteurs de type NOD
NoLS	Nucleolar localization signal
NSCLC	Cancer du poumon non-à-petites cellules
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Cellule mononucléée du sang périphérique
PD-1	Programmed cell death 1
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PRRs	Pattern-recognition receptors
PSA	Antigène spécifique de la prostate
RCC	Renal cell carcinoma
SC	Sous-cutanée
SDF1	Stromal-cell-derived factor 1
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAA	Tumor-associated antigen
TAM	Tumor associated macrophage
TAP	Transporter associated with antigen processing
TCR	Récepteur des LTs
TGF $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
Th	LT helper
TILs	LTs infiltrant la tumeur
TLRs	Récepteurs de type Toll
TNF	Tumor necrosis factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg	LT régulateur
Treg	Lymphocyte T régulateur
TSA	Tumor-specific antigen
VEGF/VEGFR	Vascular endothelial growth factor/receptor
VSV	Virus de la Stomatite Vésiculaire

# Préambule

Durant des décennies, les mécanismes impliqués dans l'oncogenèse ont été étudiés et décryptés dans le but de proposer des traitements appropriés. En effet, la carcinogenèse est un processus multiphasés très complexe variable d'un patient à l'autre dans son développement et dans l'évolution de la maladie. L'oncogenèse est caractérisée par différentes phases, une phase d'initiation, de promotion et de progression tumorale, permettant la mise en place de mécanismes propres à la tumeur (Artandi and DePinho, 2010 ; Bjerkvig et al., 2005 ; Karin and Greten, 2005).

Paul Ehrlich en 1909, fut le premier à proposer que des cellules transformées apparaissent spontanément dans notre organisme donnant naissance à des tumeurs, et que le système immunitaire était capable de les reconnaître et de les éradiquer avant qu'elles ne se manifestent cliniquement (Ehrlich, 1909). Dans la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, Lewis Thomas et MacFarlane Burnet démontrent une protection immunitaire dans des modèles de transplantation tumorale (Burnet, 1957). Leurs résultats ont ainsi suggéré l'existence des antigènes associés aux tumeurs et ont formulé la base du concept d'immuno-surveillance. Ces théories furent étudiées et adaptées durant des années de recherche et sont aujourd'hui référencées sous le concept d'immuno-édition du cancer. Ce concept confère au système immunitaire un rôle fondamental dans la lutte contre le développement tumoral en veillant à l'élimination des tumeurs les plus immunogènes, entraînant cependant une sélection de variants moins immunogènes (Zitvogel et al., 2006a). En conséquence, de nombreuses études ont été menées pour tenter de cibler les molécules et les effecteurs immunitaires impliqués dans les différentes étapes du processus d'oncogenèse. Les immunothérapies disponibles à l'heure actuelle tentent de stimuler ou de moduler les réponses immunitaires efficaces contre différents types de cancer par le biais d'une vaccination thérapeutique (immunothérapie active) ou par l'injection de composants du système immunitaire (anticorps, cytokines : immunothérapie passive) (Bluestone and Small, 2012 ; Eggermont et al., 2013).

La vaccination anti-tumorale reposant sur la présence d'antigènes de tumeur présentés à la surface des tumeurs par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, a pour but d'induire une réponse immunitaire efficace et une cassure de la tolérance périphérique (Beatty and Vonderheide 2008).



# **CONTEXTE SCIENTIFIQUE**



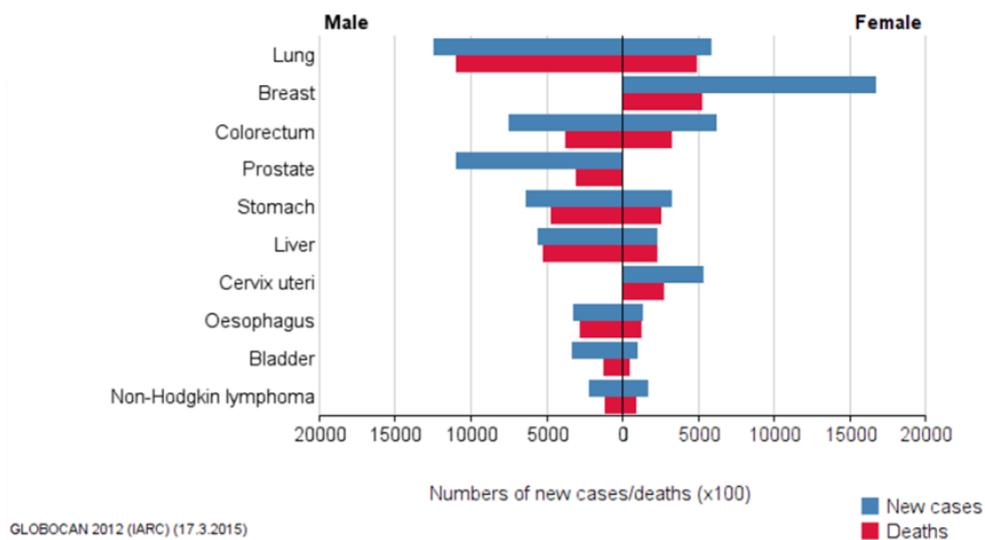
# I. Le Cancer - une pathologie mondiale

De nos jours, le cancer affecte des millions de personnes à travers le monde. Des écrits anciens remontant à l'Égypte ancienne ainsi qu'à la Grèce antique ont décrit les premiers cas de cancers (sein, os et peau). Cette maladie, bien que loin d'être récente, reste pourtant la deuxième cause de décès dans le monde après les maladies cardiovasculaires. Durant des siècles, de nombreuses théories et découvertes, jusqu'à celle des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs, se sont succédées afin d'expliquer le processus de cancérogénèse. Le cancer est une maladie complexe et variable d'un patient à un autre dans sa genèse et son évolution. La connaissance de ses mécanismes de développement a permis l'essor de traitements conventionnellement utilisés à l'heure actuelle.

## 1. Epidémiologie

Le cancer est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. Selon l'OMS, cette maladie est à l'origine d'environ 14,1 millions de nouveaux cas recensés et de 8,2 millions de décès en 2012 (Figure 1). Selon les données de l'Institut National du Cancer, pour la même année, le nombre de nouveaux cas en France a été estimé à 355 000 et le nombre de décès à 148 000. Il est ainsi prédit qu'au cours des vingt prochaines années, le nombre de cas augmente de 70% environ.

Les principaux cancers à l'origine de ces décès sont le cancer du poumon, du foie, de l'estomac, colorectal, du sein, de la prostate et de l'œsophage. Les épidémiologistes démontrent que 30% des décès sont dus à une liste de facteurs de risques comportementaux et alimentaires non exhaustive incluant majoritairement le tabagisme, la consommation d'alcool, une alimentation peu équilibrée (consommation insuffisante de fruits et légumes), la sédentarité (surcharge pondérale et manque d'exercice physique), les us et coutumes (mastication du bétel en Asie, forte consommation de nourriture salée au Japon) ainsi que l'exposition à certains virus (HBV, HCV et HPV).



**Figure 1 : GLOBOCAN 2012 Nombre de nouveaux cas et de décès par genre pour les principaux cancers**  
<http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx>

Le cancer est donc un problème de santé publique majeur justifiant que, durant les dernières décennies, les mécanismes impliqués dans son processus de genèse ont été étudiés et décryptés dans le but de proposer des traitements appropriés.

## 2. Cancérogenèse

### 2.1. Processus multi-étapes

La cancérogenèse est un processus multi-étapes très complexe dans lequel l'action d'un ou d'une combinaison de facteurs endogènes (génétiques, épigénétiques) et exogènes (chimiques, virus...) est capable de modifier l'homéostasie programmée d'une cellule entre survie et apoptose (Pitot, 1993). C'est-à-dire que la transformation des cellules « normales » en cellules tumorales leur confère la capacité de proliférer indéfiniment permettant l'envahissement des tissus distants pour former des métastases.

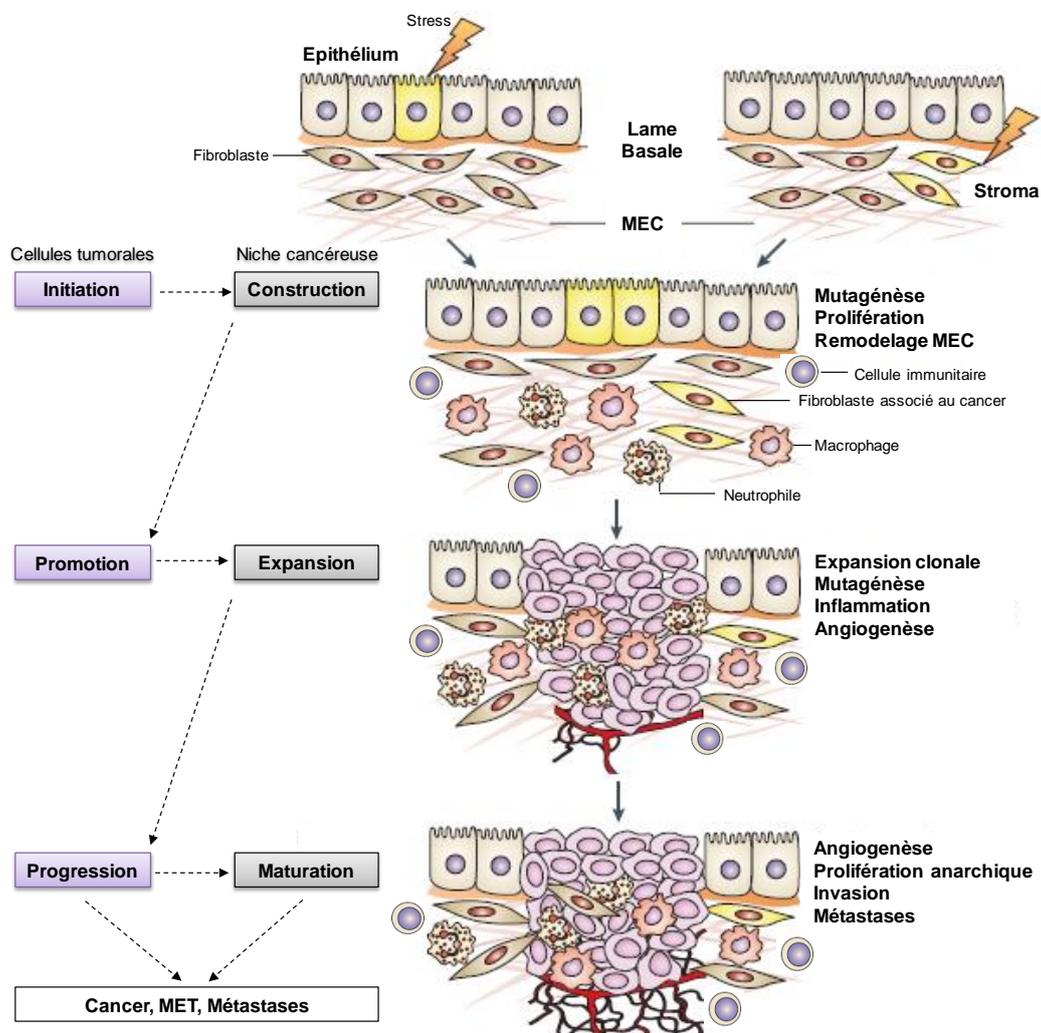
Ce mécanisme peut être divisé au minimum en trois phases : initiation (néoplasie), promotion (hyperplasie puis dysplasie) et progression tumorale (cancer invasif et métastases) (Figure 2).

L'initiation tumorale, caractérisée par de nombreuses altérations génétiques (mutations, délétions ou translocations..) et épigénétiques irréversibles, implique (1) l'activation anormale des gènes stimulant la division cellulaire, les proto-oncogènes en oncogènes (ras, Bcl2, C-myc, HER2...), (2) l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur (TP53, KRAS, Rb, WT1...), (3) l'inactivation des gènes de maintien de l'intégrité et de réparation de l'ADN (MSH2, MSH6...) ou encore (4) une instabilité chromosomique due au raccourcissement des télomères... Parallèlement à l'initiation, la construction d'une niche cancéreuse s'amorce grâce à des promoteurs de tumeurs (i.e, substances carcinogènes chimiques ou des radiations ionisantes). Ces promoteurs conduisent à un remodelage de la matrice extracellulaire (i.e, transformation des fibroblastes en fibroblastes associés au cancer) via des facteurs de croissance tels que le TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) ou encore le SDF1 (*Stromal-cell-Derived Factor 1*).

La promotion tumorale est ainsi favorisée à travers les interactions entre les cellules stromales et les cellules cancéreuses (Barcellos-Hoff et al., 2013). Cette phase consiste en une expansion clonale agressive (hyperplasie puis dysplasie) des cellules transformées ne répondant plus aux signaux de contrôle cellulaire. L'expansion parallèle de la niche cancéreuse implique aussi les effets pro-tumorigéniques de l'inflammation via la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor- $\kappa$ B*). En effet, les cellules immunitaires (macrophages associés aux tumeurs (TAMs), cellules dendritiques (DCs), neutrophiles,

mastocytes, lymphocytes T (LTs) ou cellules myéloïdes) recrutées dans le microenvironnement tumoral produisent des cytokines (TNF, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6) et des facteurs de croissance et d'angiogénèse (VEGF) favorisant la formation de tumeurs localisées ainsi que la progression tumorale (Karin and Greten, 2005).

Lorsque l'étape de progression tumorale est entamée, la tumeur a acquis la capacité de proliférer de façon anarchique, la capacité d'angiogénèse et les cellules tumorales ont perdu leur caractère différencié (notion de *cancer stem cell-like cells*) (Bjerkvig et al., 2005). En coordination avec leur microenvironnement, elles finissent par envahir et détruire les tissus et organes sains conduisant à la formation de métastases.



**Figure 2 : Étapes de la cancérogénèse**

Corrélations entre les phases classiques de la cancérogénèse et le développement du microenvironnement tumoral à travers leurs causes et leurs conséquences. MEC, matrice extracellulaire ; MET, microenvironnement tumoral. Adaptée de Barcellos-Hoff et al. (2013) et Albini and Sporn (2007).

## 2.2. Les « hallmarks » du cancer

Décrit par Hanahan and Weinberg (2000), le phénotype cancéreux est associé à au moins six propriétés intrinsèques. Une décennie plus tard, ces derniers décrivent quatre propriétés supplémentaires différenciant les cellules tumorales des cellules normales (Hanahan and Weinberg, 2011) (Figure 3).

**Maintien des signaux de prolifération :** dérèglement de la production et de la libération des signaux de prolifération qui coordonnent l'entrée des cellules dans leur cycle de division et de croissance. Production par les cellules cancéreuses de leurs propres facteurs de croissance, expression de récepteurs propres à ces facteurs (production autocrine) et développement d'une « hypersensibilité » aux facteurs de croissance limitant de l'environnement.

**Insensibilité aux signaux antiprolifératifs :** capacité à contourner les programmes qui régulent négativement la prolifération cellulaire liée à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs.

**Résistance à l'apoptose :** non détection des dommages irréversibles et irréparables de l'ADN liée à des mutations sur les gènes codant les protéines capables de détecter ces aberrations permettant d'entraîner l'apoptose (programme de mort cellulaire).

**Immortalité répllicative :** association du nombre de divisions cellulaires au phénomène de sénescence ou de crise. Un raccourcissement des télomères (limite de Hayflick) et une perte de leur fonction protectrice entraînent l'état de crise et une réactivation de la télomérase. En évitant l'érosion des télomères, les cellules échappent à la sénescence ce qui conduit à leur immortalisation.

**Capacité d'angiogenèse :** afin de croître, les cellules tumorales requièrent l'apport de nutriments et d'oxygène ainsi que la capacité d'évacuer les déchets métaboliques. Elles vont donc promouvoir la synthèse de nouveaux vaisseaux grâce à des facteurs angiogéniques (VEGF). Cette capacité est nécessaire pour l'invasion et la formation de métastases.

**Invasion et métastases :** modification de leur forme et leur jonction cellules-cellules au sein de la MEC. La perte de leur molécule d'adhésion et la sécrétion de protéases permettent une

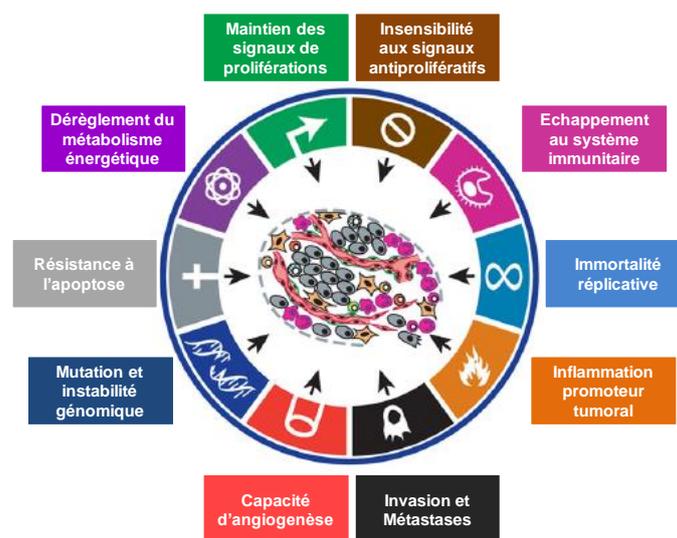
invasion locale des tissus environnants, puis une intravasation dans la circulation sanguine et lymphatique et conduisent à une colonisation de tissus éloignés du site primaire.

**Mutation et instabilité génomique :** les cellules cancéreuses sont caractérisées par un génome instable possédant de nombreuses altérations dues à des défauts des systèmes de maintenance ou de réparation. Ces altérations leur confèrent un avantage sélectif conduisant à l'acquisition des propriétés citées précédemment.

**Inflammation, promoteur tumoral :** la réponse inflammatoire associée aux tumeurs par la présence de cellules immunitaires au sein des lésions néoplasiques a l'effet paradoxal d'augmenter la cancérogenèse et sa progression.

**Dérèglement du métabolisme énergétique :** capacité à reprogrammer son métabolisme en le limitant à la glycolyse. Avantage pour la croissance et la division cellulaire.

**Echappement au système immunitaire :** les tumeurs les plus immunogènes sont généralement éliminées par le système immunitaire. Le processus « d'immuno-édition » permet la croissance et l'invasion de variants moins immunogènes capables d'échapper au système immunitaire.



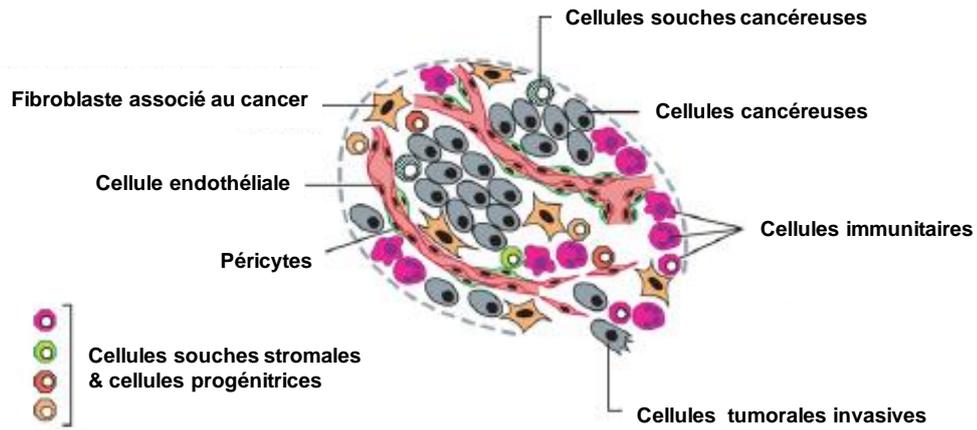
**Figure 3 : Les caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales**  
Adaptée de Hanahan and Weinberg, 2000 et 2011.

### 2.3. Le microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral est caractérisé par une hétérogénéité cellulaire importante impliquant des interactions dynamiques entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales avoisinantes. Durant les dernières décennies, il a été démontré que des cellules cancéreuses exposées à un microenvironnement « normal » perdaient leur malignité et qu'elles la conservaient lors d'une implantation dans un tissu altéré par des cellules tumorales (McCullough et al., 1998). Ainsi, la communication permanente entre les cellules tumorales et leur microenvironnement possède un rôle crucial dans le processus de cancérogenèse. Le microenvironnement tumoral, complexe et dynamique, englobe différents types cellulaires (Figure 4) (Albini and Sporn, 2007 ; Hanahan and Weinberg, 2011) :

- ✓ Cellules cancéreuses avec la coexistence de différents clones.
- ✓ Fibroblastes associés au cancer, représentent une population cellulaire prépondérante impliquée dans le remodelage de la MEC par la libération de nombreux facteurs et protéases.
- ✓ Cellules endothéliales, formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour l'apport énergétique et l'invasion.
- ✓ Péricytes, cellules de type mésenchymateuse (reliées aux cellules musculaires lisses) localisées autour des vaisseaux qui fournissent des facteurs de croissance. Ils sont aussi associés à l'intra/extravasation des cellules cancéreuses.
- ✓ Cellules souches et progénitrices, les cellules dérivées de la moelle osseuse au sein de la tumeur pourront se différencier en de nombreux types cellulaires du stroma et produire des substances pro-tumorigènes.
- ✓ Cellules immunitaires recrutées pour l'élimination ou pour la promotion tumorale. La présence de TAMs ainsi que celle des neutrophiles est souvent associée à un mauvais pronostic. Ces derniers ainsi que les lymphocytes et les DCs seront décrits plus en détails dans le cadre de l'immuno-surveillance (Contexte scientifique partie II).

Figure 4 :  
Les cellules du microenvironnement tumoral



ral

Adaptée de Hanahan and Weinberg, 2011.

### 3. Les traitements conventionnels et thérapies ciblées

Durant des décennies, les scientifiques ont tenté de travailler sur des traitements qui guériraient le cancer ou prolongeraient considérablement la survie des patients tout en conservant la meilleure qualité de vie possible.

#### 3.1. Chirurgie

Déjà pratiquée dans l'antiquité, la chirurgie a perduré au cours des décennies et jusqu'à aujourd'hui comme le plus simple, le moins coûteux et surtout le plus efficace des traitements pour de nombreux cancers. La chirurgie est souvent préconisée dans les cas de tumeurs locales qui n'ont pas encore métastasé. De plus, elle peut être associée en amont ou en aval à d'autres traitements. A l'heure actuelle, des techniques moins invasives existent telles que la cryochirurgie, les lasers ou encore l'ablation par radiofréquence (Sudhakar, 2009).

#### 3.2. Chimiothérapie

La chimiothérapie consiste en l'utilisation de médicaments ou substances chimiques dans le but de tuer les cellules cancéreuses ou de ralentir leur progression en ciblant leurs propriétés intrinsèques. Ces médicaments impactent dans un premier temps la synthèse d'ADN et les phases mitotiques du cycle cellulaire. Ils sont répertoriés en catégories, (1) agents alkylants (nitrogènes moutarde ou des triazines), (2) composés platine, (3) antimétabolites, (4) anthracyclines, (5) antibiotiques anti-tumoraux, (6) inhibiteurs de topoisomérase et (7) inhibiteurs mitotiques (famille des taxanes ou des agents antimicrotubule) (American Cancer Society <http://www.cancer.org> ; Bracci et al. (2014)).

La chimiothérapie bien que s'avérant efficace dans certains cas, manque de spécificité et implique de nombreux effets secondaires. Ces composés agissent généralement sur les cellules en division rapide, par conséquent sur les cellules tumorales mais aussi sur les cellules souches hématopoïétiques, celles du tube digestif, les cellules reproductrices et celles des follicules pileux. Certaines chimiothérapies peuvent affecter des organes vitaux tels que le cœur, les poumons, les reins, la vessie et le système nerveux.

### **3.3. Radiothérapie**

La radiothérapie est considérée comme traitement curatif d'environ 40% des cancers. Elle utilise une radiation de haute énergie via des faisceaux de photons (rayons-X, rayons gamma), de protons (Sudhakar, 2009) ou encore d'isotopes radioactifs placés directement dans la tumeur au sein du patient (Patel and Arthur, 2006). Les radiations provoquent sur les cellules cancéreuses des dommages de leur ADN. Leur incapacité à les réparer conduit à l'arrêt de leur division et de leur prolifération et donc à leur mort. En dépit des avantages, la radiothérapie cause des effets secondaires dépendants du tissu ciblé ainsi que de la méthode utilisée ; en effet les cellules normales avoisinantes peuvent aussi être endommagées.

### **3.4. Hormonothérapie**

L'hormonothérapie est un traitement efficace et non toxique principalement utilisé dans le cas des cancers hormono-dépendants tels que le cancer du sein, de la prostate ou de l'endomètre. Elle consiste en l'administration d'hormones de synthèse inhibitrices ou antagonistes à celles impliquées dans la croissance tumorale. A titre d'exemple, les deux traitements les plus communément utilisés dans le cancer du sein sont le tamoxifène, antagoniste sélectif du récepteur aux œstrogènes et les inhibiteurs des aromatases bloquant la production d'œstrogènes. Les traitements contre le cancer de la prostate sont généralement des anti-androgènes soit par diminution de la testostérone ou par des inhibiteurs du récepteur tel que le bicalutamide (Jones et al., 2004).

### **3.5. Thérapies ciblées**

Les progrès technologiques en biologie moléculaire ont permis d'identifier certains dysfonctionnements dans les voies de signalisation cellulaire caractérisant les tissus cancéreux et de proposer des approches thérapeutiques ciblées spécifiques de ces anomalies moléculaires.

Ces approches thérapeutiques utilisées depuis plus de 10 ans, sont regroupées sous le nom de thérapies ciblées. Certaines peuvent être techniquement considérées comme des « chimiothérapies » entraînant par ailleurs moins de dommages sur les cellules normales en division que ces dernières ou comme des « immunothérapies » notamment certains anticorps monoclonaux (mAbs).

Leur but est l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses par interférence avec des molécules spécifiques requises pour la croissance et le développement tumoral (Gerber, 2008). Leur mode d'action peut viser soit les voies de signalisations extracellulaires soit les voies intracellulaires. La signalisation au niveau extracellulaire peut être bloquée à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre des facteurs de croissance ou contre la partie extracellulaire de leur récepteur membranaire. Le blocage de la signalisation intracellulaire s'effectue à l'aide d'inhibiteurs de phosphorylation, agissant sur la partie intracellulaire du récepteur ou au niveau de protéines intracellulaires intermédiaires impliquées dans la cascade de signalisation (Ciavarella et al., 2010). Leur mission finale est cependant très dépendante du type de cancer et du stade de la maladie.

Les thérapies ciblées sont souvent regroupées selon la façon dont elles agissent ou selon la molécule qu'elles ciblent : les inhibiteurs d'enzyme (nommés différemment selon l'enzyme qu'elles bloquent) et les inhibiteurs d'angiogenèse (la plupart bloquant le facteur de croissance vasculaire endothélial ou son récepteur, VEGF/VEGFR) (American Cancer Society <http://www.cancer.org>).

A l'heure actuelle, deux types de thérapies ciblées sont principalement utilisés (Gerber, 2008) :

- ✓ Les **anticorps monoclonaux** (mAbs) développés pour attaquer certaines cibles sur les cellules tumorales.

La structure protéique des anticorps est dénaturée par le tractus gastro-intestinal, par conséquent les anticorps sont administrés par voie intraveineuse (IV). Les anticorps monoclonaux sont aussi la base des stratégies d'immunothérapie passive et seront décrits en partie III de cette introduction.

- ✓ Les **petites molécules inhibitrices** nommées à l'inverse des grandes molécules que sont les anticorps (Tableau 1).

Elles ont pour rôle d'interrompre les processus cellulaires en interférant avec la signalisation intracellulaire de certaines enzymes dont les tyrosines kinases. La signalisation via les tyrosines kinases conduit à la croissance cellulaire, à la prolifération, à la migration et à l'angiogenèse dans les cellules normales et cancéreuses. Contrairement aux anticorps, qui possèdent une demi-vie allant de quelques jours à plusieurs semaines, les petites molécules ont une demi-vie de quelques heures et nécessitent un dosage quotidien. Elles sont principalement administrées oralement (seul le bortezomib est injecté en IV)

Les premières cibles des thérapies ciblées ont été dirigées contre CD20, CD33 et CD52, protéines présentes à la surface des lymphomes et des leucémies et seront décrites en partie III.

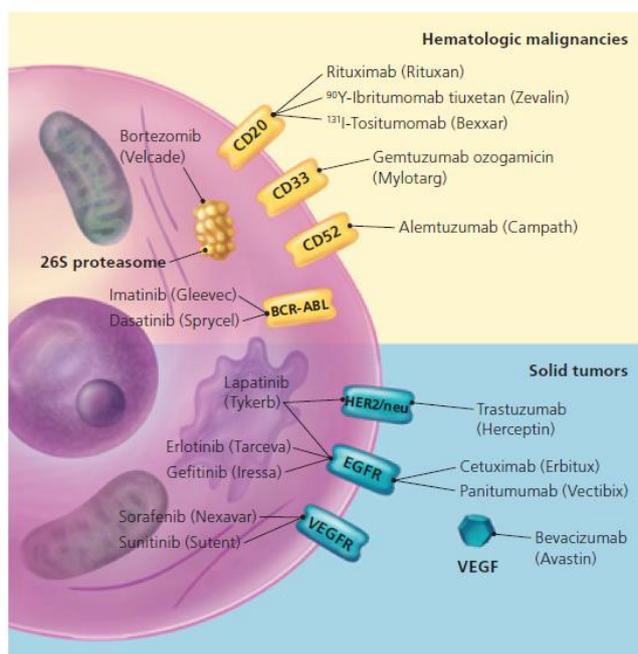
Dans le traitement des tumeurs solides, les principales cibles moléculaires actuellement visées par les traitements disponibles sont de trois types (Figure 5).

(1) les **récepteurs de la famille HER ou EGFR** (*Human Epidermal Growth Factor Receptor*) constitués de quatre protéines HER1, HER2, HER3, HER4. Ces récepteurs contribuent à la prolifération, invasion et migration des cellules tumorales. L'utilisation d'anticorps monoclonaux permet d'inhiber la fixation du ligand sur son récepteur et donc de bloquer le signal de transduction, e.g. cetuximab (Erbix) dans le cadre des cancers colorectaux et tête-et-cou ou trastuzumab (Herceptine) dans les cancers du sein surexprimant

HER2 (Gonzalez-Angulo et al., 2006). La seconde approche pour bloquer ce signal est l'élaboration d'inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) capables de se fixer sur le site de phosphorylation du récepteur, e.g. gefitinib (Iressa) et erlotinib (Tarceva) dans le cancer du poumon (Ladanyi and Pao, 2008).

(2) le ciblage de la **transduction du signal** et des **seconds messagers** impliqués dans la cascade d'activation intracellulaire du gène **RAS** (protéine HRAS, KRAS et NRAS). L'utilisation d'inhibiteurs de la farnésyl transférase bloque la farnésylation essentielle à l'activation des protéines RAS, e.g. tipifarnib (Zarnestra) et lonafarnib (Sarasar) (Downward, 2003); les inhibiteurs de sérine-thréonine kinase dans la voie Ras/Raf/MEK/ERK, e.g. imatinib (Gleevec) pour les leucémies myéloïdes chroniques ou sunitinib (Sutent) pour le cancer du rein métastatique ; les inhibiteurs des voies RAS/PI3K/PTEN/Akt/mTOR, e.g. everolimus (Afinitor), temsirolimus (Torisel) et rapamycin (Sirolimus) dans le cadre de cancer du rein, de leucémie et cancer hématologiques avancés (Chappell et al., 2011).

(3) les **agents angiogéniques et leurs récepteurs** qui soutiennent la croissance tumorale et facilitent le processus métastatique. L'utilisation de molécules anti-angiogéniques ciblant le VEGF ou le VEGFR permet de contrôler la croissance tumorale, e.g. sunitinib (Sutent) pour le VEGFR dans les cancers du rein (Motzer et al., 2007), bevacizumab (Avastin) pour le VEGF dans le cadre des cancer colorectaux métastatiques (Ellis and Hicklin, 2008).



**Figure 5 : Mécanismes des thérapies ciblées**

Certaines cibles moléculaires présentées sur cette figure sont aussi exprimées par les cellules normales. Par exemple, le CD20 est présent à la fois sur les lymphomes et sur les cellules lymphoïdes normales, HER2/neu est présent à 30% dans le cancer du sein et VEGFR est présent dans la vascularisation classique et celle associée à la tumeur.

Certaines petites molécules, e.g., sorafenib (Nexavar), sunitinib (Sutent), imatinib (Gleevec), dasatinib (Sprycel), ont des cibles multiples qui ne sont pas décrites ici.

CD, cluster de différenciation ; BCR-ABL, *breakpoint cluster region-Abelson* ; EGFR, récepteur du facteur de croissance épithélial ; VEGFR, récepteur du facteur de croissance vasculaire endothéliale ; VEGF, facteur de croissance vasculaire endothéliale. Tirée de Gerber (2008)

<b>Médicament</b>	<b>Cible</b>	<b>Indications approuvées FDA</b>
<b>Bortezomib (Velcade)</b>	26S proteasome	Myélome multiple, Lymphome de manteau
<b>Dasatinib (Sprycel)</b>	BCR-ABL, SRC family, c-KIT, PDGFR	Leucémie myéloïde chronique, Leucémie lymphocytaire aigüe
<b>Erlotinib (Tarceva)</b>	EGFR	Cancer du poumon non-à petites cellules, cancer pancréatique
<b>Gefitinib (Iressa)</b>	EGFR	Cancer du poumon non-à petites cellules
<b>Imatinib (Gleevec)</b>	BCR-ABL, c-KIT, PDGFR	Leucémie myéloïde chronique, Leucémie lymphocytaire aigüe, tumeur stromale gastrointestinale, mastocytose systémique
<b>Lapatinib (Tykerb)</b>	HER2/neu, EGFR	Cancer du sein avec HER2/neu surexprimé
<b>Sorafenib (Nexavar)</b>	BRAF, VEGFR, EGFR, PDGFR	Cancer du rein, carcinome hépatocellulaire
<b>Sunitinib (Sutent)</b>	VEGFR, PDGFR, c-KIT, FLT3	Cancer du rein, tumeur stromale gastrointestinale
<b>Temsirolimus (Torisel)</b>	Mammalian target o rapamycin (mTOR)	Cancer du rein avancé

**Tableau 1 : Exemple de petites molécules inhibitrices en thérapie ciblée dans le cancer**

FDA, U.S. Food and Drug Administration; BCR-ABL, breakpoint cluster region-Abelson; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; EGFR, epidermal growth factor receptor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor. Adapté de Gerber (2008).

Au vu de tous les éléments cités dans cette section, la compréhension des mécanismes impliqués dans la cancérogenèse est essentielle pour le développement de traitements plus spécifiques. Il apparaît évident que les tumeurs sont des tissus complexes et dynamiques impliquant des interactions spécifiques entre les cellules tumorales et le microenvironnement avoisinant.



## II. Immunité anti-tumorale

Paul Ehrlich, en 1909, fut le premier à proposer qu'il existait une immuno-surveillance des tumeurs éliminant les cellules cancéreuses naissantes (Ehrlich, 1909). Cinquante ans plus tard, ce même concept était développé postulant que les cellules immunitaires agissent telles des sentinelles capables de reconnaître spécifiquement les cellules tumorales et de les éliminer (Burnet, 1957). L'utilisation de modèles tumoraux induits viralement ou chimiquement (methylcholanthrène, MCA) a également démontré une protection anti-tumorale spécifique lors de réimplantation suggérant l'existence d'antigènes associés aux tumeurs (Old and Boyse, 1964). Ces théories furent étudiées et adaptées durant des années de recherche et sont aujourd'hui référencées sous le concept d'immuno-édition du cancer. Ce concept est basé sur le fait que le système immunitaire n'est pas uniquement responsable de l'élimination des cellules tumorales mais façonne aussi l'immunogénicité des tumeurs, le tout en lien avec l'expression des antigènes associés aux tumeurs (Dunn et al., 2002 ; Kim et al., 2007). L'immuno-édition du cancer inclut une phase d'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire, suivi par une phase d'équilibre s'achevant par une phase d'échappement tumoral.

Au sein de cette partie, nous aborderons donc le rôle et la classification des antigènes tumoraux, leur impact sur le concept d'immuno-édition et l'antigène universel la télomérase.

## 1. Rôle et classification des antigènes tumoraux

Un principe fondamental dans l'immuno-surveillance des tumeurs est que les cellules tumorales expriment des antigènes qui les différencient des cellules normales. Les premiers antigènes tumoraux à avoir été identifiés, dès les années 1990, sont les antigènes des mélanomes codés par les familles des gènes MAGE, BAGE ou GAGE dont le Melan-A/MART-1, Pmel17/gp100, tyrosinase, protéine reliée à la tyrosinase TRP-1/gp75 ou TRP-2 (Boon et al., 1997 ; Brichard et al., 1993 ; Kawakami et al., 1994). Grâce aux avancées technologiques et aux différentes approches utilisées, d'autres antigènes associés aux tumeurs et reconnus par le système immunitaire ont pu être identifiés (Cheever et al., 2009 ; Novellino et al., 2005).

Les antigènes tumoraux, pour la plupart antigènes du soi, sont considérés comme faiblement immunogènes à cause de la sélection thymique s'opérant précocement dans la constitution du répertoire immunitaire. Ainsi, le niveau et le type d'antigène tumoral exprimé conditionnent l'immunité ou la tolérance d'une tumeur (Smyth et al., 2001). De plus, il a été démontré que l'immuno-surveillance d'une tumeur non éditée serait attribuée à l'expression d'antigènes tumoraux hautement immunogènes et que la perte de ces antigènes via une immuno-sélection T-dépendante représentait un des mécanismes d'immuno-édition (Matsushita et al., 2012).

La classification initiale des antigènes tumoraux fut basée sur leur profil d'expression (Dagleish and Pandha, 2006). Elle distingue les antigènes « spécifiques de tumeur » (*tumor-specific antigen*, TSA) exprimés exclusivement par la tumeur, des antigènes exprimés non seulement par les tumeurs mais aussi par d'autres cellules de l'organisme (*tumor-associated antigen*, TAA). Font partie des TAA, les antigènes spécifiques du groupe *cancer-testis* (CTAs), les antigènes de différenciation et les antigènes surexprimés.

Cependant, la classification moderne les regroupe selon leur structure moléculaire et leur origine (Tableau 2) (Abbas et al., 2012).

Type d'antigènes	Caractéristiques	Exemples
<b>Produits de gènes mutés impliqués dans cancérogène</b>	Mutations sur oncogène et gènes suppresseurs de tumeurs  Production de protéines altérées spécifiques  Induction de réponses immunitaires contre ces protéines.	RAS : 10% des carcinomes Réarrangement Bcr/Abl : CML Surexpression de Her-2/neu : Carcinome et cancer du sein p53 : ~50% des tumeurs
<b>Produits de gènes mutés non impliqués dans cancérogène</b>	Induction de mutations aléatoires indépendamment de la fonction des gènes  Methylcholanthrene (MCA) <i>tumor-specific transplantation antigens</i>	Mutation p91A : mastocytome murin Protéines mutées dans mélanome
<b>Protéines cellulaires anormalement exprimées</b>	Protéines produites en quantité faible dans les cellules normales ou exprimées uniquement dans certains tissus  Protéines non mutées et dérégulation de l'expression protéique dans les cellules tumorales	Tyrosinase, gp100, MART : Mélanocytes normaux / mélanomes. Antigènes cancer-testis (MAGE) : cellules germinales / mélanomes, carcinomes et sarcomes
<b>Antigènes de virus oncogène (ADN et ARN)</b>	Synthèse endogène des protéines virales par les cellules tumorales induites par virus  Peptides fortement immunogènes (non-soi)	EBNA-1 du Virus Epstein-Barr : lymphome B, carcinome de nasopharynx E6, E7 du HPV : cancer utérin, cancer oropharyngé Virus lymphotropique des LT (HTLV-1): leucémie/lymphome des LT
<b>Antigènes onco-fœtaux</b>	Haute expression dans les cellules tumorales et dans les cellules fœtales normales en développement  Normalement non exprimé dans les tissus adultes	Antigène carcinoembryonnaire (CEA) $\alpha$ -fetoprotéine (AFP)
<b>Glycolipides et glycoprotéines</b>	Forte expression et structure anormale associées à des propriétés métastatiques	Ganglioside monosialique (GM) 2 et disialique (GD) 2 : mélanome
<b>Antigènes de différenciation tissu-spécifique</b>	Expression préexistante de l'antigène au sein du tissu	Antigènes spécifiques de la prostate (PSA) CD20 : lymphome B

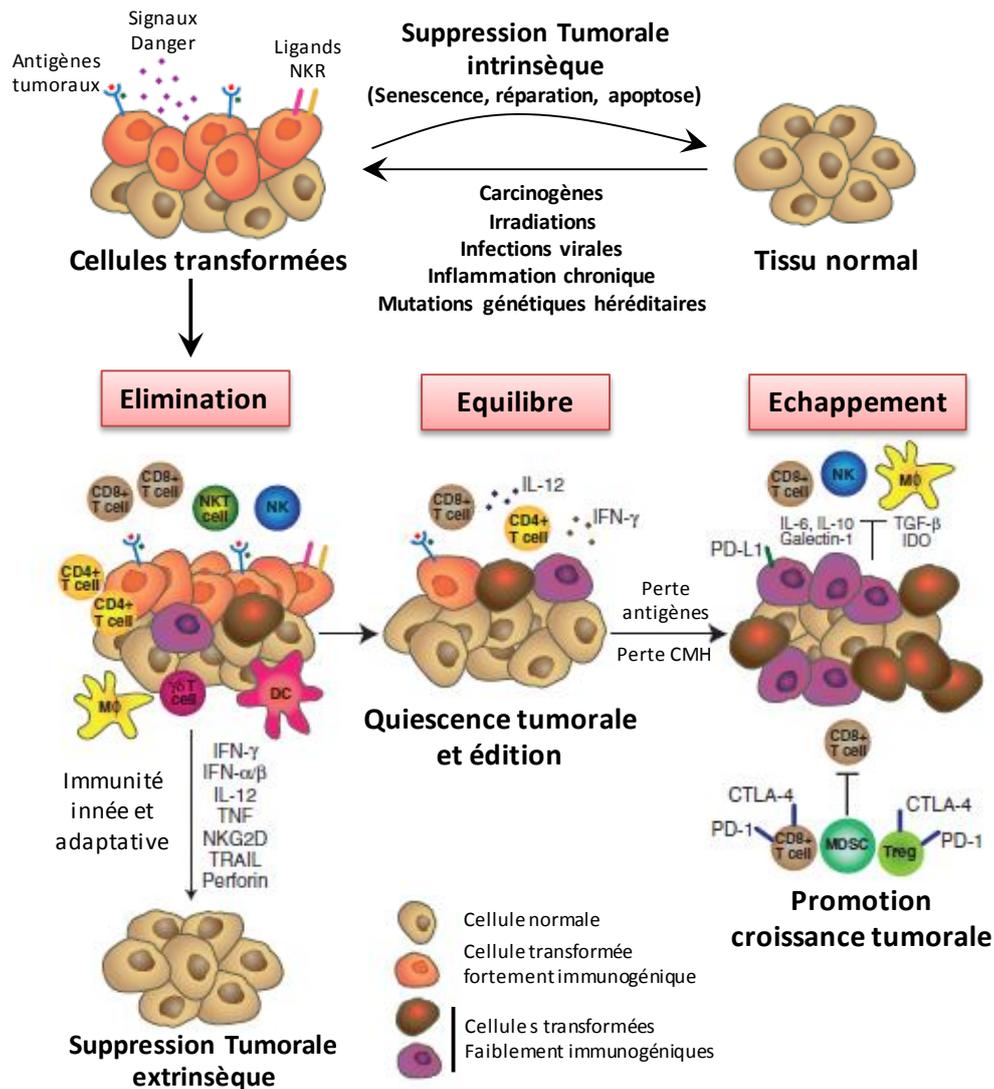
**Tableau 2 : Classification moderne des antigènes tumoraux**

CML, Leucémie myéloïde chronique, MART, antigène du mélanome; MAGE, antigène associé au mélanome; EBNA-1, Antigène nucléaire d'Epstein-Barr. Adapté de Abbas et al. (2014)

De par leur caractéristique immunitaire et leur expression privilégiée, les antigènes associés aux tumeurs possèdent un rôle central dans le processus d'immuno-édition du cancer.

## 2. Immuno-édition, de l'immuno-surveillance à l'échappement

L'immuno-édition du cancer est le processus par lequel le système immunitaire protège l'hôte et façonne l'immunogénicité tumorale des tumeurs en développement, et comprend trois phases (la théorie des 3Es ; Figure 6): Elimination, Equilibre et Echappement (Dunn et al., 2004 ; Schreiber et al., 2011).



**Figure 6 : Concept de l'immuno-édition**

Lors de l'élimination, les cellules des systèmes immunitaires inné et adaptatif reconnaissent à la surface de cellules tumorales transformées des signaux de danger ou molécules spécifiques conduisant à leur destruction. Cependant, des variants cellulaires tumoraux peuvent survivre à cette phase et entrent dans la phase d'équilibre durant laquelle les cellules de l'immunité adaptative (LTs et cytokines) contiennent la croissance tumorale et maintiennent la tumeur dans un état de dormance. L'édition de l'immunogénicité tumorale apparaît au cours de la phase d'équilibre. La conséquence de cette pression de sélection immunitaire constante sur les cellules tumorales génétiquement instables provoque l'émergence de variants. Ces variants ne sont plus reconnus par le système immunitaire devenant insensibles aux mécanismes immunitaires et induisant un état immunosuppresseur dans le microenvironnement tumoral. Les cellules tumorales vont alors échapper à tout contrôle jusqu'à l'apparition clinique de la pathologie. Adaptée de Schreiber et al. (2011).

## 2.1. Elimination – Immuno-surveillance

L'élimination est une phase de coopération entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif qui a pour objectif l'éradication des tumeurs précoces (cellules tumorales en développement) avant que celles-ci ne deviennent cliniquement visibles. Le concept d'immuno-surveillance a été démontrée via des modèles murins délétés de certaines cellules immunitaires, de molécules de reconnaissance, de voie de signalisation ou de cytokines (e.g. souris Rag1 ou 2<sup>-/-</sup>, TCRβ<sup>-/-</sup>, TCRδ<sup>-/-</sup>, IFNGR1<sup>-/-</sup>, IFNAR1<sup>-/-</sup>, IFNAR 2<sup>-/-</sup> ou Pfp<sup>-/-</sup>) (Dunn et al., 2006). Chez l'homme, pour preuve de cette immuno-surveillance, il a été démontré que le développement d'un cancer d'origine viral est plus fréquent chez des patients immuno-déprimés (receveurs d'organes) ou immuno-déficients (SIDA). Dans le cadre de cancers autologues, des réponses immunes spontanées impliquant des LBs et LTs spécifiques de certains TAAs ont aussi été observées (Vesely et al., 2011). Ce processus peut lui-même être découpé en différentes phases (Figure 11) (Dunn et al., 2002 ; Kim et al., 2007).

### 2.1.1. Recrutement des cellules de l'immunité innée

Lorsqu'une tumeur solide atteint la taille de 2 à 3 mm de diamètre, elle remodèle son stroma et entraîne la formation de nouveaux vaisseaux sanguins afin de favoriser sa progression. Ce phénomène induit la libération de signaux pro-inflammatoires par les tissus environnants, conduisant au recrutement de cellules de l'immunité innée (NK, NKT, LTγδ, macrophages et DCs) dans la tumeur. Les molécules DAMPs (*danger-associated molecular patterns*), [dont la libération d'ATP, l'expression d'HMGB1 (*high mobility group box 1*), des protéines de chocs thermiques (HSPs) et de calréticuline], générées soit par les cellules tumorales mourantes ou par les tissus environnants endommagés contribuent aussi au recrutement des cellules immunitaires dans la tumeur (Kroemer et al., 2013 ; Schreiber et al., 2011).

#### 2.1.1.1. Les cellules NK

Les **cellules tueuses naturelles (NK)** sont une sous-population de lymphocytes cytotoxiques connus pour leur capacité à tuer les cellules tumorales. L'activation des cellules NK dépend d'une balance entre la présence de signaux activateurs (ligands NKR reconnus par des KARs) et des signaux inhibiteurs (présence de CMH I interagissant avec les KIRs et inhibant les NK) à la surface des cellules (Vivier et al., 2012). En effet, suite au stress de leur transformation, les cellules tumorales diminuent leur expression de CMH I et expriment des molécules de

stress dont les ligands NKG2D qui seront reconnus principalement par les NK mais aussi par les cellules effectrices  $CD8^+ \alpha\beta, \gamma\delta$ . Les ligands NKG2D reconnus chez l'homme sont les molécules MICA/B (*MHC class I chain-related*) et les protéines de liaisons UL16 (ULBP) ; et chez la souris Rae-1 (*Retinoic acid early inducible-1*), H60 et Mult1 (*UL16-binding protein-like transcript 1*) (Waldhauer and Steinle, 2008). Les NK éliminent directement les cellules tumorales par relargage de perforine (pfp) et de granzymes (GrA, GrB, GrH, GrK et GrM), par l'expression de FasL, TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  et à travers l'expression du CD16 (récepteur Fc, FcR) pour le mécanisme de cytotoxicité dépendant des anticorps (ADCC). Elles peuvent aussi agir indirectement comme régulateur en interagissant avec les DCs, les macrophages et les LTs (Cheng et al., 2013).

#### **2.1.1.2. Les cellules NKT**

Les **cellules invariantes NKT (iNKT)** constituent une sous-population de lymphocytes possédant aussi certains marqueurs des cellules NK. Elles reconnaissent, par leur récepteur T (TCR)  $\alpha\beta$ , des antigènes lipidiques et glycolipidiques exprimés par les cellules tumorales et présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) via les molécules CD1d (similaire au CMH). Les NKT activées sécrètent de l'IFN- $\gamma$  qui stimule l'activation des NK et des CTLs et agissent sur la maturation et la sécrétion d'IL-12 des DCs impliquant un rétrocontrôle de leur activité (Swann et al., 2004 ; Vivier et al., 2012).

#### **2.1.1.3. Les LT $\gamma\delta$**

Les **LT $\gamma\delta$**  se situent à l'interface entre l'immunité innée et adaptative par l'expression d'un TCR $\gamma\delta$  reconnaissant spécifiquement les antigènes de tumeurs sans restriction par le CMH, contrairement aux LT $\alpha\beta$  conventionnels ; et par l'expression de récepteurs NKG2D reconnaissant les mêmes ligands que les cellules NK (MICA/B, ULBP). Leur activité cytotoxique se manifeste de la même manière que celle des cellules NK (FasL, TRAIL, perforine, granzymes, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ). Ils peuvent aussi aider les LB dans la synthèse d'anticorps et être impliqués dans la maturation des DCs et le recrutement des macrophages (Wu et al., 2014). Par ailleurs, à travers l'interaction de leur FcR et de cibles opsonisées, ils possèdent aussi la capacité de présenter des antigènes aux LT $\alpha\beta$  naïfs (CD8 et CD4) (Anderson et al., 2012).

#### 2.1.1.4. Les macrophages associés aux tumeurs

Les **macrophages** généralement considérés dérivés des monocytes circulants constituent une population hétérogène de phagocytes avec des fonctions dépendantes de leur localisation tissulaire. Les macrophages grâce à leur capacité de phagocytose et à l'expression du CMH de classe II ont un rôle de cellules présentatrices de l'antigène (CPAs). De plus, comme tous les phagocytes, ils expriment les récepteurs spécifiques de l'immunité innée à l'origine de leurs caractéristiques phénotypiques spécifiques dont l'expression des PRRs (*pattern-recognition receptors*) (Gordon and Taylor, 2005). Ces récepteurs incluent les récepteurs de type Toll (TLRs, *Toll-like receptors*) qui sont capables de reconnaître aussi bien les molécules PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) que les DAMPs (Kono and Rock, 2008 ; Zitvogel et al., 2010).

Suite à cette reconnaissance, les TLRs activent l'expression des gènes de cytokines pro-inflammatoires et des gènes sensibles à l'IFN (ISGs). En réponse à ce contexte inflammatoire et à la stimulation de leurs TLRs, les macrophages recrutés au site tumoral peuvent adopter une polarisation M1. Les M1 produisent efficacement des molécules anti-tumorales effectrices dont des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), des intermédiaires azotés - tout comme les granulocytes - et des cytokines telles que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-12 (Mantovani, 2014). Les M1 participent aussi aux mécanismes de présentation antigénique en phagocytant les cellules tumorales mourantes et au mécanisme d'ADCC grâce à leur FcR.

#### 2.1.2. Capture et présentation antigénique par les DCs

Les **DCs** sont des sentinelles du système immunitaire et sont considérées comme les seules CPAs professionnelles par leur capacité à capter, à apprêter et à présenter différents types d'antigènes dont les antigènes tumoraux. Elles représentent le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Elles proviennent des cellules hématopoïétiques progénitrices de la moelle osseuse qui se différencient en DCs du sang (DCs conventionnelles, cDCs ; DCs plasmacytoïdes, pDCs) et en DCs tissulaires (DCs des muqueuses ; cellules de Langerhans, LCs ; DCs dermales, dDCs ; DCs folliculaires). Dans des conditions inflammatoires et sous l'influence d'IL-4 et du facteur de stimulation des granulocytes-macrophages (GM-CSF), les monocytes possèdent aussi la capacité de se différencier en DC immatures (Merad et al., 2013). Les DCs possèdent de nombreux récepteurs incluant des récepteurs de phagocytose ou

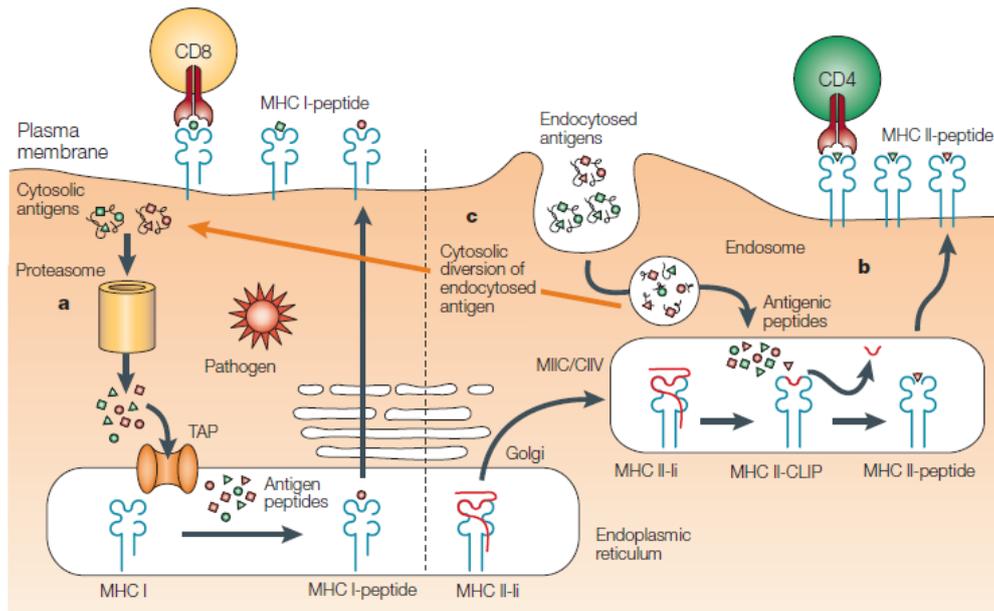
« éboueurs » (*scavenger*) tels que le CD91, les intégrines, le CD36 ; des PRRs dont les TLRs et les récepteurs de type NOD (NLRs, *NOD-like receptors*).

Dans des conditions classiques, les DCs existent à un état immature ou semi-mature avec pour activité principale la phagocytose (niveau de CMH et de molécules de co-stimulation faible) et le maintien de la tolérance immunitaire. Dans un contexte tumoral, les antigènes ou débris libérés par les cellules tumorales mourantes sous l'effet de l'immunité innée sont captés par les DCs immatures. En présence des DAMPs et des cytokines IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ , les DCs mûrissent, expriment des récepteurs de chimiokines (CCR7) et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires (ganglions drainant la tumeur, TDLN). Les DCs augmentent l'expression de leurs CMHs II et de leurs molécules de co-stimulation (CD80, CD83, CD86) au détriment de leur fonction de phagocytose et produisent de l'IL-12 (Dudek et al., 2013 ; Ma et al., 2013). Parallèlement à ces changements, les DCs vont activer leurs processus d'apprêtement antigénique selon l'origine de ce dernier (endogène ou exogène, Figure 7).

Classiquement, les antigènes provenant de sources intracellulaires proviennent de la voie de dégradation du protéasome. Les peptides (8-10 AA) sont transportés dans le réticulum endoplasmique à travers le transporteur TAP (*Transporter of Antigen-Processing*) pour être chargés sur les CMH de classe I et reconnus par les LTs CD8. Au contraire, les antigènes endocytés vont être clivés dans l'endosome pour obtenir des peptides (9-20 AA) qui seront chargés sur les CMH de classe II après dégradation de la chaîne invariante (CLIP) et qui seront exposés à la reconnaissance de LTs CD4. Cependant, les antigènes extracellulaires peuvent aussi être présentés par les CMH de classe I grâce aux mécanismes de présentation croisée (Heath and Carbone, 2001).

Au sein du TDLN, les DCs mûries présentant les complexes CMH-peptide vont activer le profil effecteur des LTs avec lesquels elles interagissent et, par conséquent les polariser pour l'élimination spécifique des antigènes tumoraux (Dudek et al., 2013).

Des études récentes ont aussi démontré l'existence d'une sous-population de DCs tueuses impliquée dans la phase d'élimination, les IKDCs hautement sécrétrices d'IFN- $\gamma$ , de TRAIL et de perforine (Taieb et al., 2006 ; Zitvogel et al., 2006b).



**Figure 7 : Voies de présentation antigénique pour les CMH classe I et II**

- a) Voie classique des antigènes intracellulaires pour apprêtement sur les molécules de CMH I.
  - b) Voie classique des antigènes exogènes pour apprêtement sur les molécules de CMH II.
  - c) Voie de présentation croisée des antigènes exogènes qui seront chargés sur le CMH I au lieu du CMH II.
- Tirée de Heath and Carbone (2001).

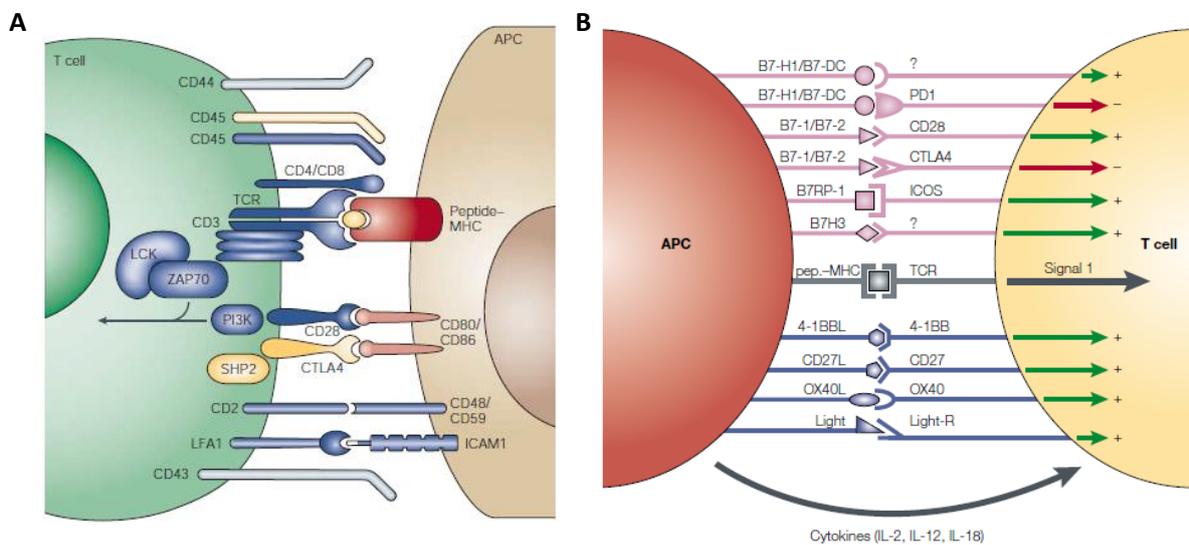
### 2.1.3. Lymphocytes T spécifiques des tumeurs

#### 2.1.3.1. Synapse immunologique et activation des lymphocytes

L'activation des LTs est régie par une interaction stable avec la DC formant une synapse immunologique (Figure 8 A et B).

Le premier signal nécessaire à cette activation est l'engagement du TCR $\alpha\beta$  (associé aux chaînes CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  et CD3 $\zeta$ ) avec le complexe CMH/peptide conférant une spécificité car seuls les lymphocytes avec un TCR donné seront activés. Lors de cette activation, une réorganisation du cytosquelette permet la formation de la synapse et l'interaction entre les molécules d'adhésion CD2, LFA-1 (*Leukocyte function-associated antigen 1*) sur la DCs et leur ligand respectif CD48/CD59 et ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) ou CD54. La molécule ICAM-1 permet d'augmenter l'intensité et la durée de ce premier signal. Les co-récepteurs CD4 ou CD8 stabilisent le complexe TCR/CMH/peptide et leur tyrosine kinase Lck phosphoryle les motifs d'activation (ITAMs) du CD3. La cascade induite par cette phosphorylation (recrutement de ZAP-70) sera responsable de la production de cytokine et de facteurs de croissance majeurs pour les LTs (Huppa and Davis, 2003).

Un signal de co-stimulation est nécessaire pour poursuivre cette activation. Les molécules de co-stimulation CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) présentes sur les DCs s'associent au CD28 des lymphocytes. De plus, l'association du CD40-ligand des LTs au CD40 des DCs renforce ce signal et permet une forte prolifération des LTs. Néanmoins, un rétrocontrôle de cette boucle est assuré par l'expression de CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen*, CD152) sur les LTs et de son association avec CD80/CD86. Après CTLA-4, les LTs exprimeront aussi la molécule inhibitrice PD1. Les DCs sécrètent aussi des cytokines qui, selon le CMH engagé, vont orienter la polarisation des LTs (Pardoll, 2002). Ces deux molécules auront un rôle important dans l'étape d'immuno-subversion, dernière étape du processus d'immuno-édition.



**Figure 8 : Synapse immunologique et molécules de co-stimulation**

A) Synapse immunologique montrant les ligands-récepteurs et molécules de signalisation clés impliquées dans la reconnaissance et l'activation des LTs. Les molécules de stimulation liées au CMH/peptide sont représentées en rouge. Les molécules activatrices (TCR/co-récepteurs ; CD28) et les molécules d'adhésion favorisant la durée du signal sont en bleu. Les molécules inhibitrices en jaune et celles qui ne contribuent pas à la signalisation sont en gris. Adaptée de Huppa and Davis (2003) ; Pardoll (2002).

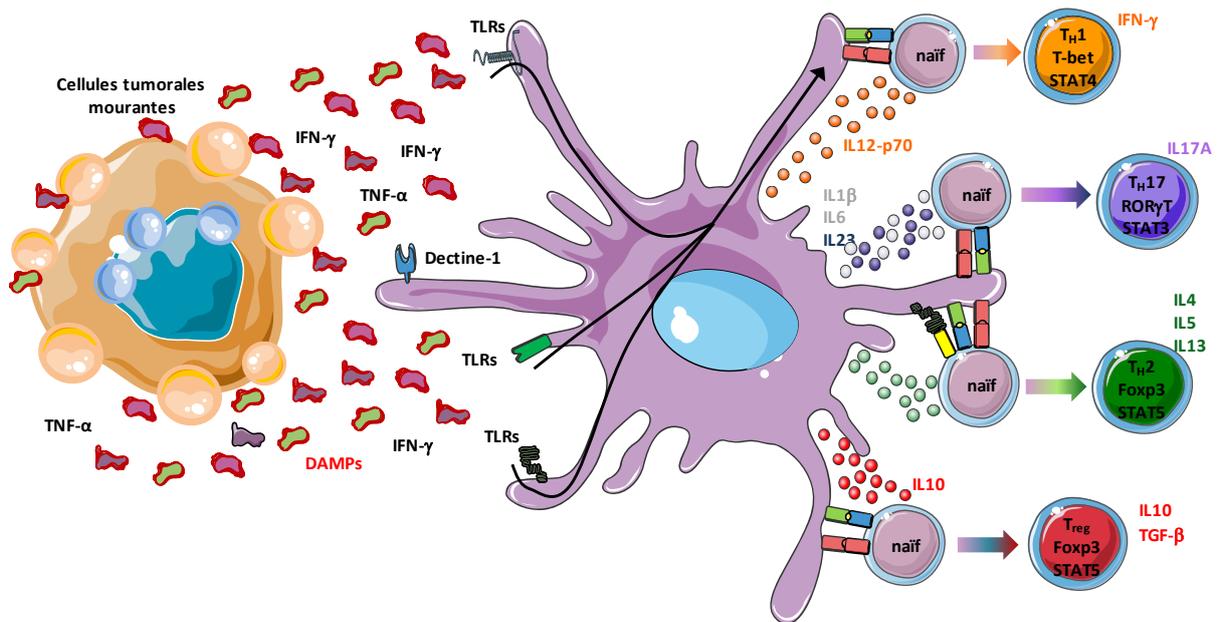
B) Il existe différentes catégories de molécules de co-stimulation sur la CPA : la famille B7, la famille TNF et les cytokines. La famille B7 comprend le CD80 (B7-1), le CD86 (B7-2) : lie CD28 ou CTLA-4 ; le PDL1 (B7-H1), le PDL2 (B7-DC) : lie PD1 ; le B7RP-1 lie ICOS ; et le B7-H3 dont le récepteur n'est pas identifié. Les ligands TNF sont le 4-1BBL, l'OX40L et le CD27L. Adaptée de Pardoll (2002).

Dans le TDLN, les DCs induisent et activent dans un premier temps des LTs CD4 spécifiques de l'antigène de tumeur. Ces derniers expriment de l'IFN- $\gamma$  et sont polarisés en LT de type Th1 afin de faciliter, dans un deuxième temps, l'induction des LTs CD8 spécifiques de l'antigène de tumeur (Dunn et al., 2004 ; Kim et al., 2007).

### 2.1.3.2. Lymphocytes T CD4

Selon les interactions et les cytokines sécrétées par les DCs lors de l'activation de LTs CD4, ces derniers présentent une hétérogénéité fonctionnelle, avec différents profils de sécrétion cytokinique (Figure 9). Les LTs CD4 peuvent être polarisés en différents types de LTs effecteurs dont les principaux sont les Th1, Th2, Th17 et iTreg (Luckheeram et al., 2012). Néanmoins, seuls les Th1 ont un rôle primordial durant l'immuno-surveillance.

- ✓ Les **Th1** sont induits par les DCs sécrétant de l'IL-12p70 avec la présence d'IFN- $\gamma$ . Ils sécrètent majoritairement de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2 par l'expression des facteurs de transcription T-bet et de STAT4 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). Les Th1 via leurs cytokines activent les fonctions cytotoxiques des macrophages et des NK et favorisent la différenciation des LTs CD8 en LT cytotoxiques (CTLs).
- ✓ Les **Th2** induits via l'interaction OX40-OX40L et par la présence d'IL-4, expriment les facteurs de transcription GATA3, STAT5 et STAT6. Ils sécrètent majoritairement de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 avec pour mission de favoriser la différenciation des LB pour la production d'anticorps IgG1 et IgE.
- ✓ L'IL-6, l'IL-21, l'IL-23 et le TGF $\beta$  induisent une polarisation **Th17** via l'expression de ROR $\gamma$ t (*Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor gamma-T*) et de STAT3. Ils sécrètent de l'IL-17 et de l'IL-22 conduisant à l'induction de cytokines pro-inflammatoires et sont principalement impliqués dans les réponses fongiques et dans les mécanismes d'auto-immunité.
- ✓ Sous l'influence de l'IL-10, de l'acide rétinoïque ou du TGF $\beta$ , les LTs CD4 se différencient en **LT régulateurs induits (iTreg)**, Tr1 (IL-10<sup>+</sup>) et Th3 (TGF $\beta$ <sup>+</sup>). Ils expriment le facteur de transcription Foxp3 (*Forkhead box P3*) comme les Tregs naturels du thymus et le CD25. Leur potentiel régulateur s'exerce à travers la sécrétion de cytokines immuno-modulatrices.



**Figure 9 : Différenciation et polarisation des LTs CD4**

En fonction des pathogènes ou des molécules reconnus via leurs récepteurs PRRs, les DCs vont phagocyter ces antigènes, les apprêter et les présenter aux LTs. L'environnement de la DC lors de sa rencontre avec l'antigène oriente la réponse T auxiliaire. Cet environnement est dépendant du tissu dans lequel les DCs résident ; lorsqu'elles sont recrutées au niveau d'une tumeur via la présence des DAMPs et des cytokines IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ , les DCs vont polariser les LTs effecteurs en type Th1. Adaptée de Pulendran and Ahmed (2011).

### 2.1.3.3. Lymphocytes T CD8

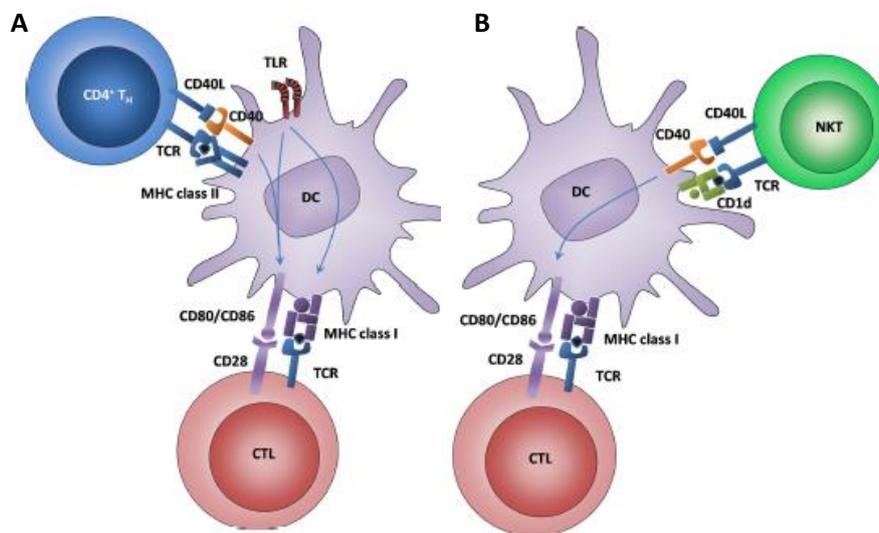
Il est essentiel que l'activation des CD8 soit finement régulée afin de minimiser la destruction de tissus non cancéreux du soi. Comme évoqué précédemment, malgré les voies de présentation croisée, l'induction des CTLs peut être favorisée par l'activation des LT CD4 Th1 dans le cas d'antigènes de tumeur intracellulaires.

En effet, des études ont démontré le rôle indispensable des LTs CD4 dans la génération de réponses CTLs primaires et mémoires à la fois contre des antigènes non-inflammatoires (e.g. antigènes de tumeur, antigènes de transplantation) et contre certains pathogènes infectieux (e.g. virus de la grippe, HSV) (Bos and Sherman, 2010 ; Dosset et al., 2012 ; Janssen et al., 2003 ; Riberdy et al., 2000 ; Sharma et al., 2013).

Ce concept d'« activation-autorisation » (*classical licensing*, Figure 10) implique la présentation du même antigène sur les CMH II et sur les CMH I de la DC ainsi que l'interaction CD40-CD40L. Cette interaction provoque l'induction d'IL-12 considérée comme le dernier signal pour l'activation des CTLs. Ce phénomène d'autorisation peut aussi être réalisé par les NKT (*alternative licensing*) (Behrens et al., 2004 ; Thaiss et al., 2011).

A l'inverse des sous-populations de LTs CD4 Th bien caractérisées et décrites dans la littérature, les sous-populations de LTs CD8 sont assez peu connues. Néanmoins, tout comme les LTs CD4 Th, les CD8 pourraient être catégorisés en deux types cellulaires basés sur leur profil cytokinique, nommés Tc1 et Tc2, tous deux cytotoxiques (Dobrzanski et al., 2004 ; Mosmann et al., 1997 ; Vukmanovic-Stejić et al., 2000).

- ✓ Les Tc1 peuvent être définis comme les CTLs prédominants, sécrétant de l'IFN- $\gamma$  en grande quantité, et pouvant sécréter de très faibles quantités d'IL-6 et d'IL-10.
- ✓ Les Tc2 sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6 et de l'IL-10 mais pas d'IFN- $\gamma$  et sont moins cytotoxiques que les Tc1.



**Figure 10 : Activation des LTs CD8 via un complexe DC-Th1 ou DC-NK**

Concept « d'autorisation » qui implique (A) la présentation du même antigène sur le CMH I et CMH II ou (B) la présentation d'un antigène lipidique sur le CD1d et d'un antigène différent sur le CMH I. Les deux types de *licensing* nécessitent l'interaction CD40-CD40L. Adaptée de Thaiss et al. (2011).

La finalité de ces phénomènes est que les effecteurs les plus puissants du système immunitaire, CD4 Th1 et CTLs spécifiques des antigènes de tumeurs migrent au site tumoral. Les CTLs détruisent les cellules tumorales présentant l'antigène via la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ , l'expression de TRAIL et de FasL et via la libération de perforine et de granzymes contenus dans leurs granules lytiques.

#### 2.1.4. Rôle crucial des cytokines dans l'immuno-surveillance

Les cytokines pro-inflammatoires et Th1 ont été démontrées essentielles dans le processus d'élimination des tumeurs (Vesely et al., 2011).

L'**IFN- $\gamma$**  sécrété principalement par les NK, NKT et les LTs a pour cible directe les cellules tumorales afin d'augmenter l'immunogénicité tumorale via des mécanismes antiprolifératifs, anti-angiogéniques et pro-apoptotiques. Il favorise non seulement l'activation des CTLs par les Th1 mais aussi l'augmentation des molécules de CMH de classe I à la surface des cellules tumorales et par conséquent une meilleure reconnaissance des tumeurs par ces derniers. Il est à l'origine des fonctions tumoricides des macrophages M1 et des NK (Dunn et al., 2006 ; Vesely et al., 2011).

L'**IL-12** sécrétée par les DCs favorise la différenciation des LTs CD4 naïfs en LTs Th1 et stimule les fonctions cytotoxiques des CTLs, NK et NKT. Produite aussi par les macrophages infiltrant la tumeur, elle augmente la sécrétion d'IFN- $\gamma$  des NK lui conférant un rôle indirect d'agent angiostatique (Trinchieri, 2003).

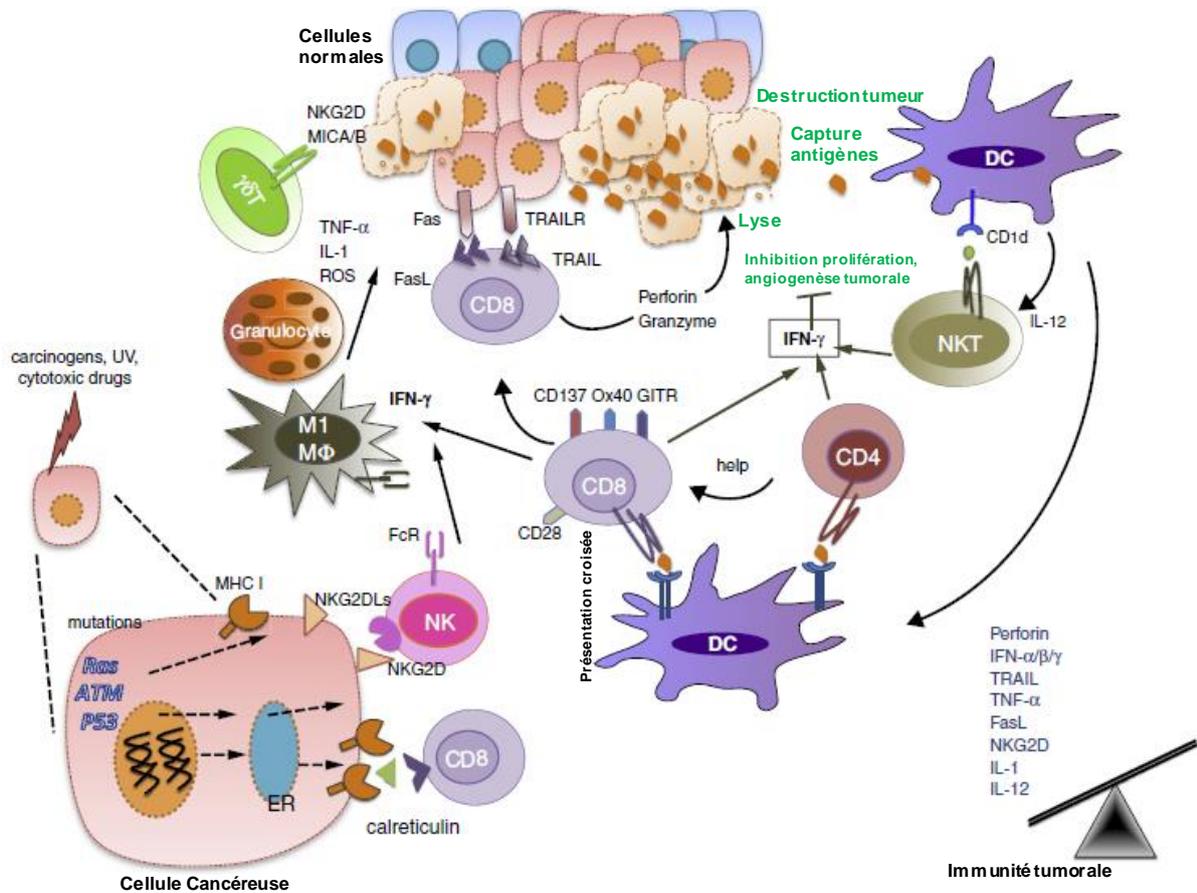
L'**IL-2** sécrétée par les CD4 activés induit une polarisation des CD4 de type Th1, la génération de CTLs, facilite la prolifération et la synthèse d'anticorps par les LBs et induit la génération et la persistance des NK. Néanmoins, l'IL-2 possède aussi un rôle crucial dans l'élimination des LTs autoréactifs et participe au maintien des Tregs périphériques (Waldmann, 2006).

Le **TNF- $\alpha$**  est produit par les phagocytes, les NK, les NKT et les LTs afin de contribuer à l'immunité anti-tumorale. Cependant, il est suggéré que le TNF- $\alpha$  promouvrait la survie des cellules tumorales à travers l'induction de gènes codant des molécules anti-apoptotiques dépendantes du NF- $\kappa$ B (Lin and Karin, 2007).

L'**IL-4**, bien qu'étant une cytokine à visée Th2, possède un rôle anti-angiogénique dans la clairance tumorale et induit l'infiltration de granulocytes dans la tumeur.

D'autres cytokines comme l'IL-10 (cytokine immuno-régulatrice), l'IL-13 (cytokine Th2) et l'IL-17 (cytokine Th17) possèdent à la fois des effets anti-tumoraux et pro-tumoraux dans un contexte précis (Ellyard et al., 2007 ; Khan, 2008 ; Lin and Karin, 2007).

## Synthèse de la phase d'élimination (immuno-surveillance)



**Figure 11 : Immuno-surveillance du cancer**

Les cellules tumorales expriment des molécules de stress (calréticuline, complexe CMH/antigène tumeur, NKG2DL) reconnues par les CD8 et les NK. Les DCs capturent et présentent des antigènes tumoraux aux LTs et glycolipides aux NK. Ces effecteurs libèrent de l'IFN- $\gamma$  qui inhibe la prolifération et l'angiogénèse tumorale. Les CTLs tuent les cellules tumorales via les récepteurs Fas et TRAIL, et la synthèse de granzymes et perforine. L'expression de CD28, CD137, OX40 et GITR sur les CD8 favorise leur prolifération. Les LT $\gamma\delta$  tuent les cellules tumorales via leur récepteur NKG2D qui reconnaît MICA/B. Les macrophages M1 et les granulocytes sécrètent du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1, de l'IL-12 et des ROS (dérivés réactifs de l'O $_2$ ) pour contribuer à l'immunité anti-tumorale. Adaptée de Mittal et al. (2014).

## 2.2. Equilibre

En dépit des mécanismes immunitaires déployés durant la phase d'élimination pour éradiquer la tumeur, certains variants cellulaires peuvent survivre et entrer en phase d'équilibre (concept de dormance) dans laquelle le système immunitaire adaptatif empêche la tumeur de croître et sculpte aussi l'immunogénicité des cellules tumorales (Schreiber et al., 2011).

Les mécanismes moléculaires qui déclenchent la dormance de la tumeur sont peu connus à cause des difficultés à reproduire cette phase dans des modèles murins, et ont été peu décrits chez l'Homme. Cependant, il a été démontré expérimentalement que des tumeurs formées (i.e. sarcome induit par le 3-méthylcholanthrene, MCA) chez des souris immuno-déficientes étaient plus immunogènes que celles formées dans des animaux immuno-compétents (Shankaran et al., 2001 ; Smyth et al., 2000). Une différence d'immunogénicité tumorale a aussi été observée entre des modèles déficients pour différentes molécules effectrices (modèle déficient pour la perforine ou l'IFN- $\gamma$ ) soulignant des degrés variables de pression sélective immunitaire (Street et al., 2002). Ceci suggère qu'une tumeur ayant subi la phase d'élimination est adaptée à croître avec l'immunité adaptative ce qui conduit à la sélection et à la croissance de variants non-immunogènes (Kim et al., 2007).

Par ailleurs, la phase d'équilibre est probablement la plus longue dans le processus d'immuno-édition pouvant durer de nombreuses années durant lesquelles le système immunitaire maintient la tumeur dans un état de dormance jusqu'à la réapparition d'une tumeur primaire ou de métastases (Aguirre-Ghiso, 2007).

Un scénario clinique illustrant bien la phase d'équilibre chez l'Homme est la transmission de cancer lors de transplantations donneur-receveur. Dans ces cas, l'organe à transplanter paraît normal et dénué de cancer au moment du prélèvement mais certains donneurs se révèlent plus tard atteints de cancer dans d'autres sites anatomiques (donneurs sans aucun antécédent ou en rémission totale d'un précédent cancer). En effet, deux patients greffés, avec chacun un rein d'un même donneur traité d'un mélanome avec succès 16 ans auparavant, ont tous les deux développé un mélanome métastatique deux ans après la greffe (MacKie et al., 2003).

## 2.3. Echappement

L'échappement, cité dans la partie I.2.2 comme propriété intrinsèque (*hallmarks*) des cellules tumorales, représente la mise en place par la tumeur de mécanismes lui permettant de contourner les actions du système immunitaire, de lui échapper et de devenir cliniquement détectable (Figure 12).

### 2.3.1. Résistance associée aux cellules tumorales

#### 2.3.1.1. Molécules exprimées par les cellules tumorales

Afin de faciliter l'évasion de la reconnaissance immune adaptative, en particulier celles des CTLs, les cellules tumorales peuvent altérer les mécanismes d'apprêtement et de présentation de leurs antigènes (Campoli and Ferrone, 2008 ; Leone et al., 2013). Ces altérations sur les gènes APM (*Antigen Presentation Machinery*) entraînent la diminution ou la perte d'expression des CMH de classe I, des molécules  $\beta 2m$ , TAP1 et tapsine, des sous-unités LMP2 et LMP7 de l'immunoprotéasome. Les cellules tumorales ont aussi la capacité de perdre les ligands NKG2D (Groh et al., 2002) ou d'impacter la maturation des DCs à travers la suppression de production des DAMPs pro-inflammatoires, évitant ainsi une reconnaissance à la fois des cellules immunitaires adaptatives et innées (Vesely et al., 2011).

Les cellules tumorales peuvent aussi développer une insensibilité à l'IFN- $\alpha/\beta$  et à l'IFN- $\gamma$  en mutant les gènes codant leur signalisation (récepteurs IFNGR1/2, JAK1/2, STAT1) (Dunn et al., 2005).

Afin d'éviter la destruction médiée via le système immunitaire, les cellules tumorales peuvent sur-exprimer des molécules inhibitrices (inhibiteur de sérine-protéase PI9) bloquant la lyse via la voie du granzyme B (GrB)-perforine, des molécules anti-apoptotiques (FLIP et BCL-XL) ou exprimer des formes inactives des récepteurs de mort TRAIL et FAS (Shin et al., 2001 ; Zitvogel et al., 2006b). De la même façon, elles expriment aussi des ligands inhibiteurs ou tolérogènes tels le PDL-1 (B7-H1) ou les molécules de CMH non classiques HLA-G (Dong et al., 2002 ; Tripathi and Agrawal, 2006). Afin, d'échapper aux mécanismes de cytotoxicité liée au complément (CDC), les cellules tumorales surexpriment aussi des facteurs de restriction au complément tels que le CD46, co-facteur membranaire inhibiteur, le CD35,

le CD55 et le CD59, autres protéines régulatrices du complément (Guillerme et al., 2013 ; Murray et al., 2000 ; Ravindranath and Shuler, 2006).

### **2.3.1.2. Facteurs immunosuppresseurs libérés par les cellules tumorales**

De nombreux facteurs sont sécrétés par les cellules tumorales afin d'inhiber directement l'immunité anti-tumorale, de recruter des cellules régulatrices et de créer un microenvironnement immunosuppresseur.

Des **stéroïdes** sécrétés par les cellules tumorales ont la capacité de supprimer l'expression de CCR7 sur la DC, empêchant donc sa migration au TDLN et l'activation des LTs (Vesely et al., 2011). La sécrétion de **VEGF** inhibe la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B et empêche elle aussi, la maturation et la différenciation des DCs. Cette sécrétion est corrélée à un mauvais pronostic incluant le recrutement de cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) et ses propriétés angiogéniques (Kim et al., 2007).

Les cellules tumorales peuvent agir sur différentes étapes de l'immunité anti-tumorale, par exemple, la sécrétion de **TGF- $\beta$**  conduit à l'inhibition des CTLs et des NK et par conséquent à la non production d'IFN- $\gamma$ , de granzymes et de perforine (Wrzesinski et al., 2007). Le TGF- $\beta$  favorise aussi le développement de Tregs, de Th17 et polarise les macrophages M1 en M2. Similairement, l'**IL-10** durant l'échappement inhibe la réponse Th1 et l'oriente vers un type Treg (Luckheeram et al., 2012).

Certains facteurs inhibent des composants précis du système immunitaire, tels que la **galectine** qui supprime l'activité des LTs ; l'indoleamine 2,3-dioxygénase (**IDO**) métabolisant le tryptophane (acide aminé essentiel pour les LTs). L'IDO génère des kynurenines toxiques dont le but est d'inhiber la prolifération des CTLs et d'entraîner l'apoptose des LTs CD4 (Vesely et al., 2011 ; Zitvogel et al., 2006b). L'expression d'**arginase-1** et d'**INOS** (*inductible nitric oxide synthetase*) par les MDSCs et macrophages M2 détruit l'arginine (aa essentiel pour les LT) et enrichit l'environnement en oxyde nitrique favorisant l'angiogenèse et les métastases (Mittal et al., 2014). D'autres facteurs comme le GM-CSF, l'IL-1 $\beta$  et la prostaglandine E2 (PGE2) permettent eux aussi le recrutement et l'expansion des MDSCs (Vesely et al., 2011).

### 2.3.2. Immunosuppression induite par le SI

Les cellules régulatrices suppressives (MDSCs, macrophages M2 et Tregs) de l'immunité anti-tumorale créent un environnement adapté à la progression tumorale.

Les **MDSCs** sont une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures induites par des facteurs sécrétés par la tumeur et sont capables de supprimer des réponses immunitaires.

Les MDSCs activées produisent l'arginase-1, INOS, IDO, l'oxydase NAPDH et des cytokines immunosuppressives qui inhibent les CTLs, les DCs et les NK et qui permettent l'expansion des CD4 Tregs (Wesolowski et al., 2013).

Les **macrophages** sont polarisés en type **M2** par la présence d'IL-4, d'IL-10, d'IL-13, de TGF- $\beta$  et de M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*). Ils représentent souvent un marqueur de mauvais pronostic puisqu'ils produisent en haute quantité des cytokines immunosuppressives et le facteur d'angiogenèse VEGF favorisant l'intravasation et les métastases (Ramanathan and Jagannathan, 2014).

Les **CD4 Tregs** par le biais de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  altèrent la réponse CTLs et NK. Ils peuvent détruire les CPAs par leur fonction cytotoxique via la libération de granzyme et de perforine. Ils expriment le CTLA-4 qui se lie aux molécules de co-stimulation CD80/CD86 pour produire un signal inhibiteur induisant la diminution de ces mêmes molécules. Cette interaction peut aussi déclencher la synthèse d'IDO par les DCs (Mougiakakos et al., 2010).

# Synthèse de la phase d'échappement (immuno-sélection)

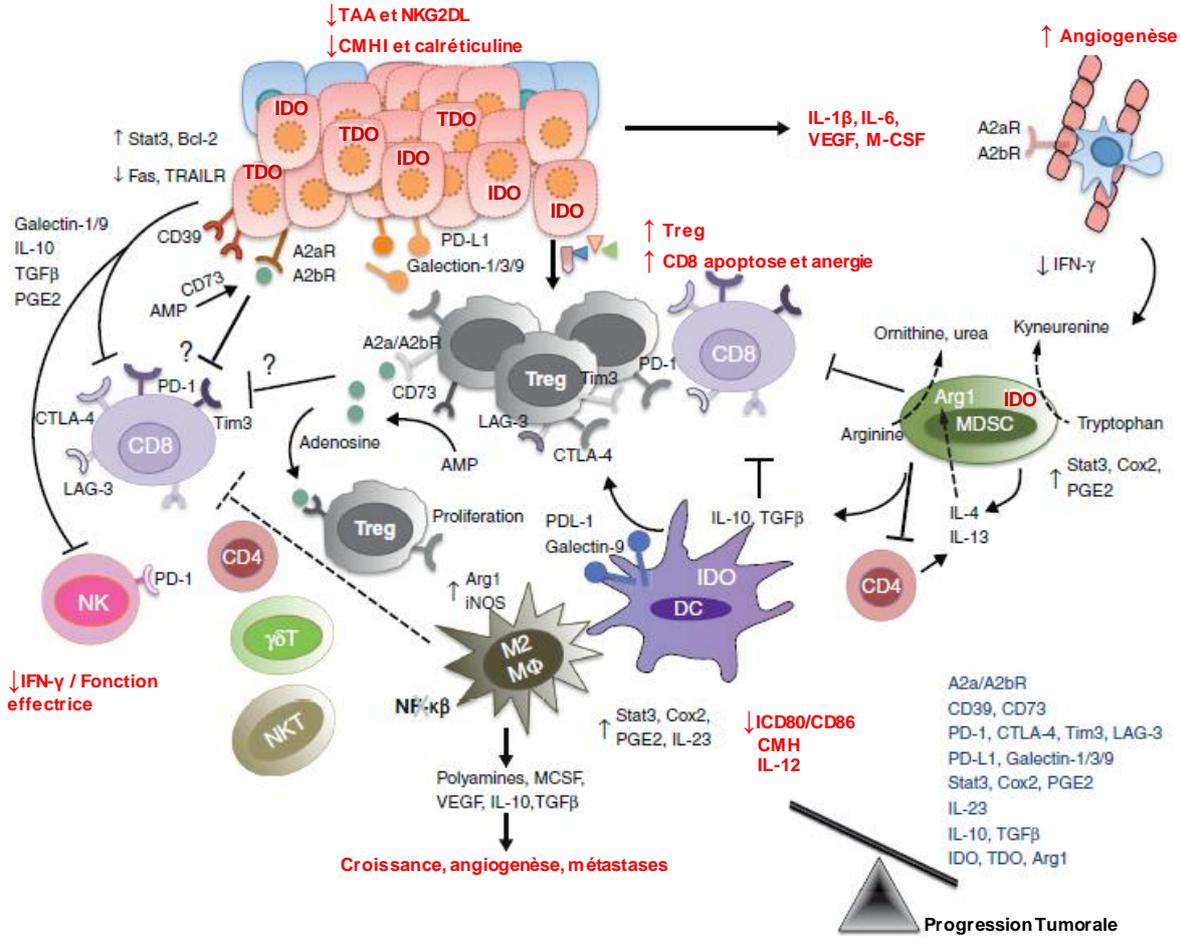


Figure 12 : Immuno-subversion du cancer

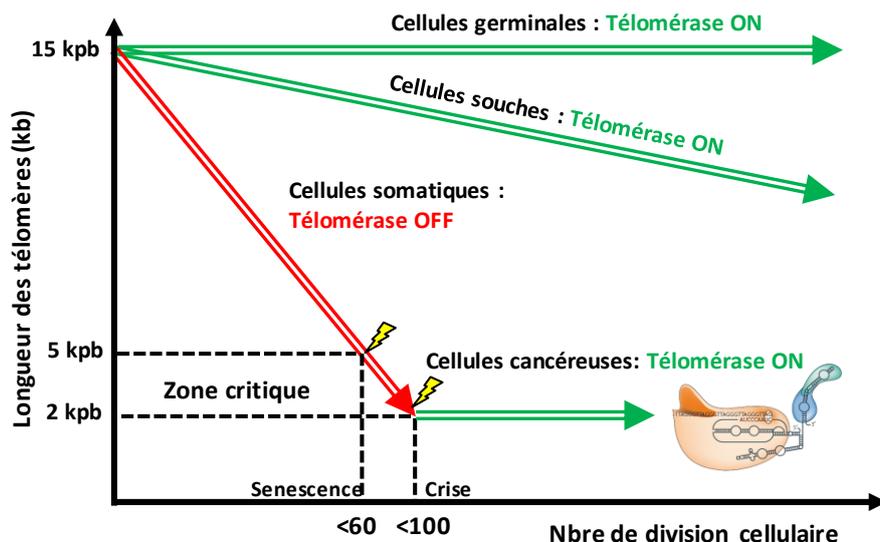
Les cellules tumorales échappent à la reconnaissance immunitaire (défaut de l'APM et perte des molécules de co-stimulation), expriment des molécules de résistance (STAT-3), de survie (Bcl-2) et d'immunosuppression (IDO, TDO, PD-L1, galectine, CD39, CD73, récepteurs adénosine). Elles sécrètent aussi VEGF, IL-6, TGF-β, M-CSF pour augmenter l'angiogenèse. MDSCs, macrophages M2 et DCs expriment des molécules immuno-régulatrices (arginase, INOS, IDO), des cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF-β) induisant la génération de Treg et l'apoptose des CTLs. Les enzymes immuno-régulatrices, IDO, arginase et CD39 métabolisent respectivement le tryptophane en kynurenine, la L-arginine en ornithine et urée et l'ATP en AMP qui lui-même sera métabolisé en adénosine par CD73. L'adénosine en liant ses récepteurs A2aR et A2bR favorise l'angiogenèse et la prolifération. Les Tregs quant à eux, expriment de nombreux récepteurs inhibiteurs PD-1, CTLA-4, Tim-3 et LAG3 supprimant la réponse anti-tumorale. Adaptée de Mittal et al. (2014).

En considérant, tous les mécanismes impliqués dans le concept d'immuno-édition ainsi que l'hétérogénéité des antigènes tumoraux, les immunothérapies ciblant plusieurs cancers sont confrontées à des limites impactant leur développement. Premièrement, le choix de l'antigène à cibler devient primordial. Ainsi, une liste des critères et caractéristiques de l'antigène tumoral idéal a été proposée pour prioriser les antigènes à cibler en clinique (Cheever et al., 2009). Les critères majeurs de l'antigène idéal seraient : (1) fonction thérapeutique, (2) immunogénicité, (3) rôle important dans l'oncogenèse, (4) spécificité, (5) expression dans la majorité des cellules cancéreuses (6) y compris dans les cellules souches cancéreuses, (7) expression inexistante ou réduite dans les tissus normaux. Parmi les antigènes rassemblant la plupart de ces propriétés, notre regard s'est porté sur l'antigène télomérase (hTERT), cible pertinente décrite dans le paragraphe suivant.

### **3. La Télomérase Reverse Transcriptase humaine : TAA universel**

Les télomères constituent de courtes séquences nucléotidiques répétées (TTAGGG) non codantes, situés à l'extrémité des chromosomes. Dans un contexte classique, ils protègent le chromosome des phénomènes de dégradation et de recombinaison de l'ADN. Les télomères ont aussi un rôle clé dans la prolifération et la survie cellulaire. En effet, lors des divisions cellulaires, la réplication des extrémités 5' par l'ADN polymérase s'avère imparfaite et, approximativement 50 à 200 bp d'ADN télomérique sont perdues.

La plupart des cellules somatiques sont limitées à 50 divisions, phénomène connu sous le nom de la limite de Hayflick (Hayflick, 1980). Par conséquent, elles sont dans l'incapacité de maintenir constante la longueur des télomères qui finissent par atteindre une taille critique. Un raccourcissement de leur longueur provoque des anomalies cellulaires et tissulaires activant un programme de sénescence aboutissant à l'apoptose. Ce programme peut être neutralisé par l'inactivation des protéines suppressives de tumeur p53 et Rb. En dépit de ce programme, des divisions cellulaires supplémentaires surviennent et conduisent à une érosion critique des télomères, un état de crise. Afin d'éviter la sénescence et la crise, la télomérase, enzyme qui synthétise les télomères, est réactivée (Figure 13) (Artandi and DePinho, 2010).



**Figure 13 : Théorie de Hayflick ou horloge télomérique**

Relation de cause à effet entre le raccourcissement progressif des télomères et les divisions du cycle cellulaire. Lorsque les cellules somatiques surpassent la senescence, la télomérase réactivée conduit à l'immortalité cellulaire. Adaptée de Gomez et al. (2013).

### 3.1. Structure de la télomérase

La télomérase, qui est une enzyme bien conservée à travers les espèces, fut décrite pour la première fois chez le protozoaire *T. tetrahyema* en 1985 (Greider and Blackburn, 1985). La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique à activité reverse transcriptase qui a pour mission le maintien des télomères au cours des divisions par l'ajout de séquences TTAGGG aux extrémités des chromosomes (Morin, 1989). Elle est composée d'une sous-unité catalytique (hTERT, *human TElomerase Reverse Transcriptase*) et d'une matrice ARN (hTERC, *human TElomerase RNA Component*) (Figure 14).

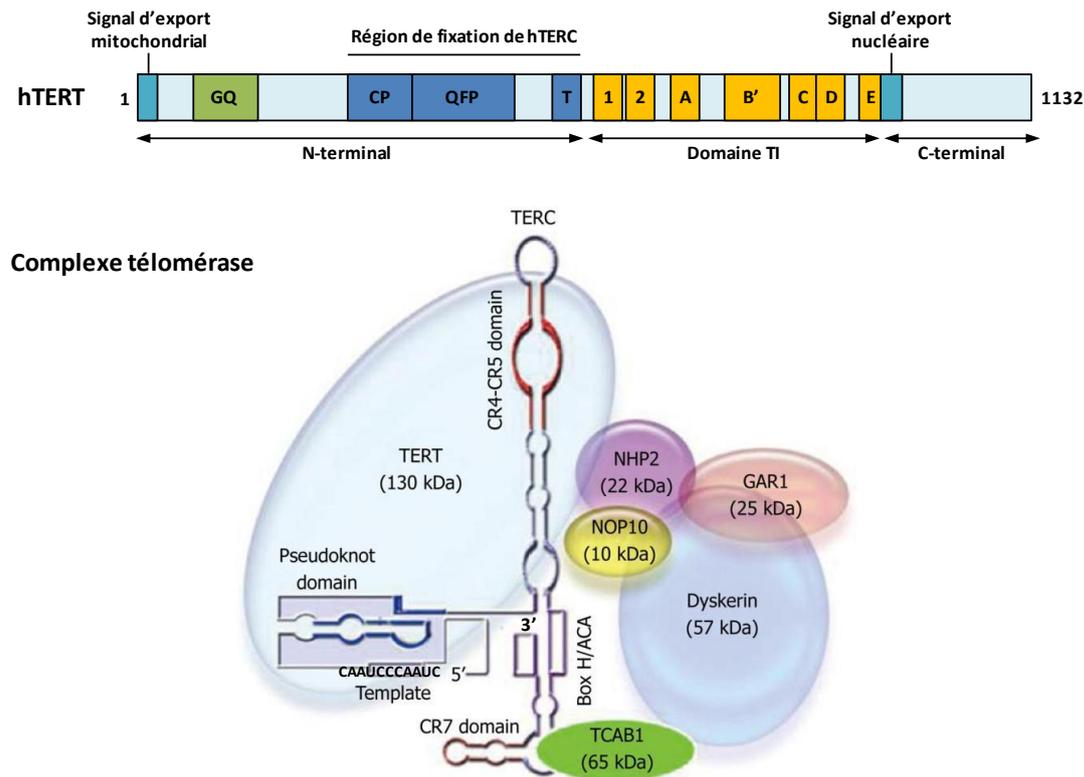
La sous-unité hTERT est une protéine de 1132 acides aminés (poids moléculaire exacte : 127 kDa, approximatif : 124,5 kDa) avec une localisation nucléaire afin d'exercer son activité (Chung et al., 2012 ; Yang et al., 2002). Cette protéine structurellement similaire aux transcriptases inverses rétrovirales et aux ARN polymérases virales peut être divisée en trois régions. Le domaine N-terminal (NTE) très conservé inclut des motifs de liaison de hTR (motifs CP, QFP et T ; (Weinrich et al., 1997) et des motifs de fonction (signal d'export et motif GQ). Le domaine central est caractérisé par les sept motifs de transcriptases inverses (TI : 1, 2, A, B', C, D, et E) essentiels à l'activité de l'enzyme (Lingner et al., 1997).

L'extension C-terminal (CTE) contient elle aussi des motifs spécifiques importants pour l'activité catalytique de la télomérase et pour le maintien des télomères.

La sous-unité hTERC est transcrite par une ARN polymérase II et produit un transcrit mature de 451 nucléotides incluant une séquence matricielle 5'-CUAACCCUAAC-3' complémentaire à l'extrémité 3' des télomères et qui sera transcrite pour générer les répétitions télomériques. La structure secondaire de hTERC contient quatre régions fonctionnelles bien conservées entre les espèces incluant un domaine matrice/pseudonœud (CR2/CR3), une région conservée CR4/CR5 impliquée dans la liaison à hTERT, une boîte H/ACA (CR6/CR8) (Marie-Egyptienne and Autexier, 2006).

L'assemblage et la maturation de la télomérase humaine afin d'obtenir une télomérase active se déroule dans les corps de Cajal (Zhu et al., 2004). La sous-unité hTERT est généralement le facteur limitant dans l'assemblage de la télomérase tandis que la hTERC est transcrite dans la plupart des cellules. La boîte H/ACA et la région CAB (*Cajal Body Box*) incluses dans le domaine CR7 (extrémité 3') apparaissent essentielles pour l'accumulation d'hTR et pour la stabilité du complexe (Cong et al., 2002). En effet, la protéine TCAB1 (*Telomerase Cajal Box protein 1*) se lie à la région CAB de hTERC et interagit aussi avec la dyskérine associée à la boîte H/ACA afin de favoriser l'association du complexe dans les corps de Cajal (Venteicher et al., 2009). Le motif de la boîte H/ACA guide la maturation post-transcriptionnelle d'ARNs non-codants et son interaction avec la dyskérine complexée aux protéines NHP2, NOP1 et GAR1 conduit à la stabilité du complexe.

Par ailleurs, l'activité télomérase au niveau des télomères est régulée par plusieurs protéines associées aux télomères formant le complexe « *shelterin* ». Il inclut des facteurs de liaison de l'ADN télomérique 1 et 2 (TRF1 et TRF2) responsables de la longueur des télomères, une protéine protectrice des télomères (POT1), deux protéines interconnectées (TIN2 et TPP1) qui recrutent la télomérase auprès du chromosome et une troisième (RAP1) démontrée comme régulateur négatif dans le maintien des télomères (Moon and Jarstfer, 2007).



**Figure 14 : Représentation linéaire de hTERT et du complexe télomérase**

Séquence protéique de hTERT contenant dans le domaine N-terminal un signal d'export mitochondrial et une région de liaison à hTERC ; des motifs reverse transcriptase et un domaine C-terminal incluant le signal d'export nucléaire. Le complexe télomérase avec ses deux sous-unités et l'ensemble des protéines associées nécessaires au fonctionnement, à la localisation et à la stabilité de ce dernier. Adaptée de Ly (2011).

### 3.2. Rôle de la télomérase dans la cancérogenèse

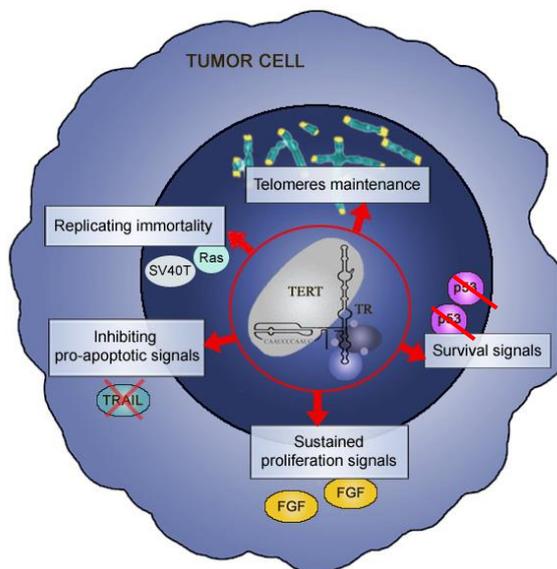
La télomérase, outre son rôle dans l'élongation et le maintien des télomères pour garantir une certaine stabilité génétique, est une enzyme avec des composants primordiaux régulant certains *hallmarks* de la cancérogenèse (Figure 15) (Low and Tergaonkar, 2013).

Les premières évidences de l'implication de la télomérase dans le développement des tumeurs proviennent d'études sur la souris. Bien que les télomères de souris soient plus longs que ceux de l'homme et que la télomérase murine a une expression plus ubiquitaire dans les tissus somatiques adultes, une surexpression de la sous-unité TERT a été trouvée dans des souris porteuses de cancers mammaires et de peau (Broccoli et al., 1996). De plus, une induction conditionnelle de la TERT chez la souris induit le développement de tumeurs dans un tissu cible (Artandi et al., 2002 ; González-Suárez et al., 2001). Ce phénomène a aussi été observé dans des cellules humaines utilisant une voie alternative de maintien des télomères (ALT,

*alternative lengthening of telomeres*) démontrant que la télomérase et principalement ses composants n'interviennent pas uniquement dans l'élongation des télomères mais contribuent aussi à l'**immortalisation cellulaire** (Stewart et al., 2002). Il a aussi été observé que la TERT active les promoteurs des gènes cible de Wnt/ $\beta$ -caténine tels que Myc et cycline D1 impliqués dans le cycle cellulaire (Park et al., 2009) et qu'elle entraîne la sécrétion d'épîréguline (facteur de croissance épidermal, EGF) stimulant la division cellulaire dans des fibroblastes immortalisés (Smith et al., 2003).

La TERT confère aussi aux cellules tumorales la **capacité de résister à l'apoptose**. En effet, plusieurs études ont démontré que la TERT régule directement l'expression des gènes dépendants du NF- $\kappa$ B qui est lui-même tumorigène (Ghosh et al., 2012). De plus, la TERT a aussi la capacité d'inhiber l'apoptose induite par les caspases (Bermudez et al., 2006), d'empêcher celle induite par TRAIL (Dudognon et al., 2004) et de supprimer la fonction de p53 par la production d'un facteur de croissance bFGF (Jin et al., 2010).

Des études suggèrent aussi que la présence de TERT favoriserait l'angiogenèse par la production de ce même facteur et du VEGF et qu'elle aurait un impact sur le métabolisme énergétique (Low and Tergaonkar, 2013). Cependant, l'expression ectopique de TERT ne suffit pas à elle seule pour transformer des cellules normales en cellules malignes. Cette transformation doit faire intervenir l'expression d'un oncogène et/ou la perte d'un gène répresseur de tumeur, par exemple l'oncoprotéine T SV40 et la protéine Ras (Hahn et al., 1999 ; Moon and Jarstfer, 2007).



**Figure 15 : Rôle de la TERT dans la cancérogenèse**

La télomérase veille en premier lieu à maintenir l'intégrité génomique afin d'empêcher la mort cellulaire.

Outre cette fonction, son composant catalytique, la hTERT possède un rôle pivot dans l'apparition de certains « hallmarks » du cancer décrits par Hanahan (partie I.2.2).

### 3.3. Expression de la télomérase dans le cancer

La plupart des cellules somatiques n'expriment pas l'ARNm de hTERT et ne présentent donc pas d'activité télomérase, contrairement aux cellules embryonnaires, aux cellules germinales, aux cellules souches et aux LTs activés. Néanmoins, leur expression est relativement modérée en comparaison des cellules cancéreuses. La hTERT est fortement exprimée par environ 80 à 90% des cellules cancéreuses (Tableau 3) indépendamment de leurs origines tissulaires (Hiyama and Hiyama, 2002 ; Shay and Bacchetti, 1997).

Type de cancer	Echantillon	Télomérase / hTERT (%)
<b>Poumon</b>	Biopsie	76,2 / 80,8
	BAL	65,4 / 80,1
<b>Sein</b>	FNA	79,2 / 84,7
<b>Prostate</b>	Biopsie	76,9 / 83,3
	Urine (lavage)	58 / 72,2
<b>Estomac</b>	Biopsie	79,3 / 88,3
<b>Côlon</b>	Biopsie	87,3 / 100
	Lavage	58,8 / 74,1
<b>Foie</b>	Biopsie	61,6 / 91,3
<b>Utérus</b>	Biopsie	96,6 / 98,6
	Frottis	34,5 / 46,2
<b>Tête et cou</b>	Biopsie	96 / 81
	Lavages	56,4 / 80,8

**Tableau 3 : Exemple d'expression de l'activité télomérase et de la hTERT ARNm dans différents cancers chez l'Homme**

Les données proviennent de différentes études regroupées dans Hiyama and Hiyama (2002) ; Hiyama and Hiyama (2003). BAL, lavage bronchoalvéolaire ; FNA, cytoponction.

Cette caractéristique comporte un intérêt clinique diagnostique et thérapeutique en rejoignant les critères de l'antigène idéal énoncé par Cheever et al. (2009). De plus, un niveau élevé de hTERT est souvent associé à un mauvais pronostic clinique et à une agressivité tumorale observée dans différents types de cancer : cancer du poumon non-à petites cellules (Zhu et al., 2006), cancer du sein (Elkak et al., 2006), cancer de la prostate (March-Villalba et al., 2012), cancer gastrique (Lü et al., 2012), cancer du foie (Hiyama et al., 2004).

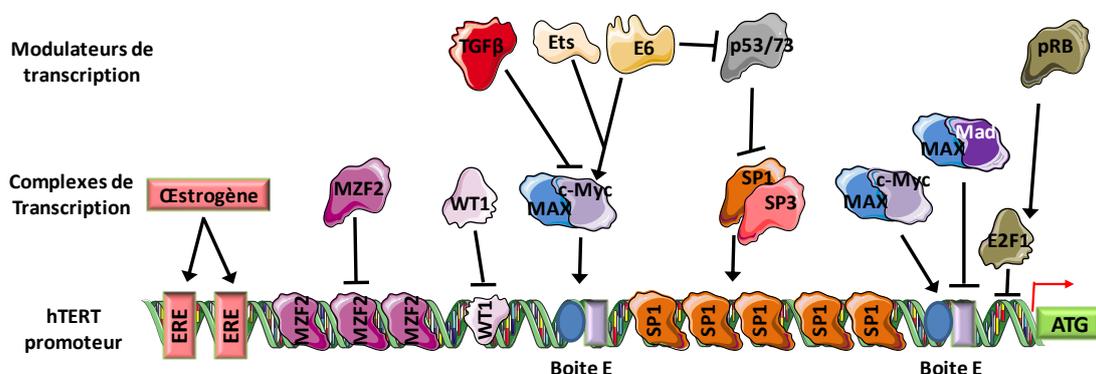
L'expression de la télomérase est soumise en amont à des systèmes de régulation (Figure 16). La régulation transcriptionnelle de hTERT est considérée comme le mécanisme régulant la télomérase chez l'Homme. Le promoteur du gène hTERT ne contient pas de boîte TATA ou CAAT mais contient des régions riches en CpG, de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription (c-Myc/Mad/Max, Sp1, USF, AP2, AP4, and NF1) et de méthylation.

Il contient aussi des éléments de réponse aux hormones et deux boîtes-E (Gladych et al., 2011).

La TERT peut ainsi être activée directement ou indirectement par différents facteurs. Par exemple pour activer l'expression du gène hTERT, l'oncogène c-Myc s'associe avec Max et se fixe sur les boîtes E ; Sp1 se lie aux motifs GC et interagit avec des protéines de liaison de boîte TATA (TBP) pour aider l'initiation de la transcription des promoteurs sans boîte TATA (Park et al., 2001). La transcription du gène hTERT peut aussi être initiée par le NF- $\kappa$ B (implication de c-Myc), par des facteurs de transcription Ets (*erythroblast transformation specific domain*) qui régulent la transcription via les proto-oncogènes c-Myc, Her2/Neu, Ras (Dwyer et al., 2007).

L'implication de protéines virales telles E6 du HPV indépendamment de la perte de p53 ou l'induction de c-Myc ; ou des hormones œstrogènes ou androgènes dans la transcription de hTERT a aussi été démontrée dans les cancers de l'utérus, du sein et de la prostate (Cong et al., 2002).

En comparaison des cellules cancéreuses, il est proposé que la TERT soit réprimée dans les cellules somatiques par des régulateurs négatifs de la transcription. Le complexe Mad/Max (effet antagoniste à c-Myc/Max) ; les gènes suppresseurs de tumeur p53/p73, pRB (rétinoblastome) et E2F1, BRCA1 (*Breast Cancer 1*), WT-1 (*Wilms' tumor 1*) ont été mis en évidence dans cette inhibition de hTERT (Gladych et al., 2011). Des molécules telles que MZF-2 (*Myeloid cell-specific Zinc finger protein 2*), l'IFN- $\gamma$ , le TGF- $\beta$  et la vitamine D3 ont aussi un rôle dans la répression de hTERT (Cong et al., 2002).



**Figure 16 : Régulation transcriptionnelle de hTERT**

Adaptée de Biocarta ([http://www.biocarta.com/pathfiles/h\\_tertpathway.asp](http://www.biocarta.com/pathfiles/h_tertpathway.asp))

La régulation transcriptionnelle de hTERT est aussi complétée par des modifications post-transcriptionnelles qui impliquent des phénomènes d'épissages alternatifs de l'ARNm de TERT. Phénomènes qui seraient un moyen pour la cellule de réguler l'activité télomérase en changeant les profils d'expression de ses variants TERT.

### **3.4. A la fois cible naturelle et thérapeutique**

Au vu de l'ensemble de ses propriétés, de son expression spécifique dans les cellules tumorales, de son implication dans le processus d'oncogenèse, la TERT représente un TAA universel (Beatty and Vonderheide, 2008). De plus, il a aussi été observé que des patients atteints de cancer développaient une réponse anti-hTERT naturelle et que des individus sains possédaient un répertoire immunitaire anti-hTERT pré-existant ayant survécu aux mécanismes de sélection thymique. Ces observations suggèrent ainsi que dans un contexte de surexpression de hTERT, une rupture de la tolérance pourrait être observée (Karanikas et al., 2010 ; Zanetti et al., 2005).

Par conséquent, la hTERT est une cible idéale et pertinente comme le confirment les différents essais cliniques déjà effectués et ceux en cours la ciblant (Tableau 4 et Tableau 5). Ces essais font appel à différentes sortes d'immunothérapie anti-tumorale qui seront explicitées dans la dernière partie de cette introduction.

	Trial design	Cancer Type	Phase	Patients	Immune response	Clinical outcomes	Reference
Peptide-based vaccines	Vx-001 native cryptic hTERT p572 + optimized cryptic hTERT pY572 peptide + Montanide ISA51	Multiple	I	19	90% <sup>a, h</sup>	SD of 10.5 months for 4 patients correlates with immune response	(Mavroudis et al., 2006)
		NSCLC	I	22	76.2% <sup>a, f, i</sup> 90.9% <sup>a, g, i</sup>	OS in correlation with immune response. Median SD of 11.2 months. OS of 30 months for responders.	(Bolonaki et al., 2007)
		Advanced multiple solid tumors	II	55	55% <sup>a, f, i</sup> 70% <sup>a, g, i</sup>	Clinical improvement correlates with immune response. OS of 20 months.	(Kotsakis et al., 2012)
	Vaxon Biotech	NSCLC	II	27+19	66% <sup>a, i</sup>	PFS and OS in correlation with immune response. Median progression-free survival (PFS) of 3.8 months. OS of 19.8 months.	(Kotsakis et al., 2014)
	hTERT p540 (ILAKFLHWL) + GM-CSF + Montanide ISA51	Breast	I	19	68% <sup>a, h</sup>	50% of patients with SD. OS in correlation with high immune response. Median OS of 30 months for responders.	(Domchek et al., 2007)
	hTERT p540 (ILAKFLHWL) + Montanide ISA51	Metastatic Cancer	II	14	53.8% <sup>a, h</sup>	No objective clinical response to treatment.	(Parkhurst et al., 2004); NCT00021164
	HR2822 (hTERT p540) + GV1001 (hTERT 611-626) + GM-CSF	NSCLC	I/II	26	46% ag. GV1001 <sup>a, c, h</sup> 8% ag. p540 <sup>a, f</sup>	SD of 28%. Median OS of 8.5 months. Regression for 2 patients after 108 and 93 months.	(Brunsvig et al., 2006)
	GV1001 + GM-CSF	Pancreas	I/II	48	63% <sup>b, j</sup>	OS in correlation with immune response. Median OS of 7.2 months for responders.	(Bernhardt et al., 2006)
GV1001 + Temozolomide	Melanoma	I/II	25	78% <sup>b, d, e, j</sup>	Partial regression (n=5) and SD (n=6). Median OS of 10.4 months for responders.	(Kyte et al., 2011)	
GV1001 + GM-CSF	NSCLC	II	23	80% <sup>b, e, j</sup>	No major toxicity. Median PFS of 11.7 months.	(Brunsvig et al., 2011)	
APC-based vaccines	Autologous DC loaded with p540-KLH	Breast, prostate carcinoma	I	7	57% <sup>a, c, h, i, j</sup>	No significant toxicity	(Vonderheide et al., 2004)
	DC transfected with LAMP-hTERT mRNA	Prostate	I	20	95% <sup>a, b, c, d, j</sup> (19/20 pat.)	No major toxicity. No objective clinical response. 4/9 patients have elevated PSA post vaccination.	(Su et al., 2005)
	DC loaded hTERT HLA-A2 + KLH	Renal	I/II	10	40% <sup>a, c, d, h, j</sup>	Treatment well-tolerated. 2 patients with mixed response. 1 with SD.	(Marten et al., 2006)
	DC loaded with Survinin + hTERT + p53 peptide + KLH	Melanoma	II	28	<sup>a, i</sup> 66.6% ag. hTERT 22.2% ag. surviving 28.5% ag. p53	Treatment well-tolerated. No correlation of OS with immune response. No objective clinical response. 17 patients with SD and median OS of 10.5 months.	(Ellebaek et al., 2012)
	B lymphocytes transduced with hTERT	Prostate	I	9	<sup>a, h</sup> Cohort 1: 33.3% (1/3) Cohort 2: 100% (3/3)	No major toxicity. No PSA responses.	(Millard et al., 2004)

**Tableau 4 : Liste des essais cliniques clôturés ciblant hTERT**

SD, Stabilisation disease ; OS, Overall survival ; PFS, Progression-free-survival ; PSA, prostate-specific antigen

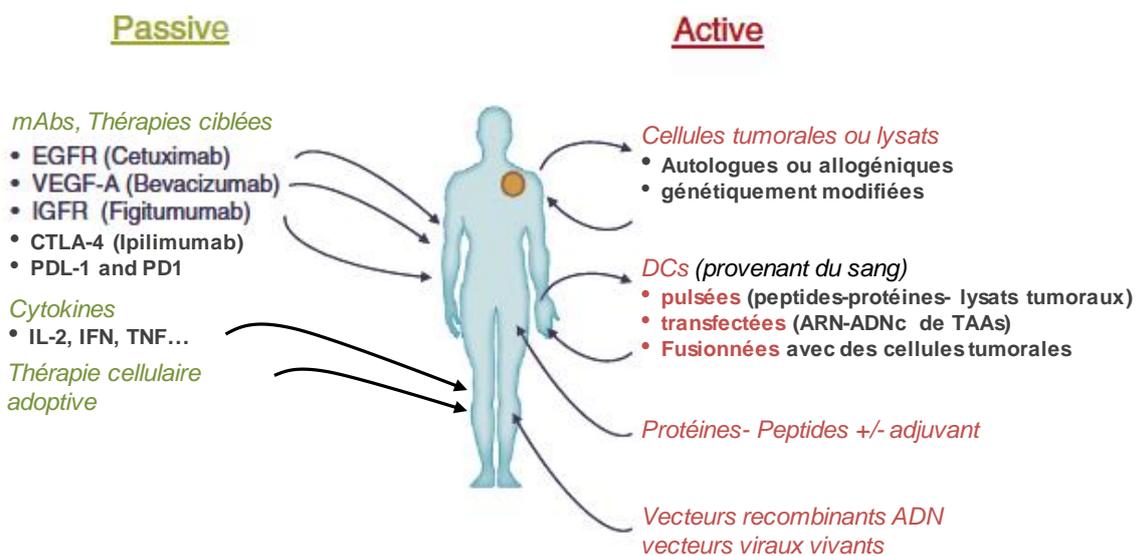
<sup>a</sup> LT CD8 spécifiques de hTERT ; <sup>b</sup> LT CD4 spécifiques de hTERT ; <sup>c</sup> LT cytotoxiques ; <sup>d</sup> profil majoritaire Th1 ; <sup>e</sup> réponses LT mémoires ; <sup>f</sup> deux vaccinations ; <sup>g</sup> six vaccinations ; <sup>h</sup> tétramère/pentamère hTERT spécifique ; <sup>i</sup> ELISpot IFN- $\gamma$  ; <sup>j</sup> essais de prolifération.

	Trial design	Cancer Type	Phase	Patients	Immune response Clinical outcomes	Reference
Peptide-based vaccines	<b>Primovax</b> GV1001 + Gemcitabine	Pancreas Advanced Un-Resectable	III Pharmexa	360	On going	NCT00358566
	<b>GX301</b> 4 hTERT peptides + Montanide ISA51	Prostate	II Laurquin Mediolanum	120	On going	NCT02293707
	<b>UV1</b> + GM-CSF + Ipilimumab	Melanoma	I/II Ultimovac	20	On going	NCT02275416
APC-based vaccines	DC loaded with mRNA from Primary Prostate Cancer Tissue, hTERT and Survivin	Prostate	I/II	30	On going	NCT01197625
	<b>GRNVAC1</b> DC transfected with hTERT mRNA	AML	II Asterias Biother.	21	Completed Study	NCT00510133
DNA-based vaccines	<b>INVAC-1</b> modified hTERT DNA + EP	<b>Solid tumors</b>	<b>I</b> <b>Invectys</b>	<b>18</b>	<b>On going</b>	<b>NCT02301754</b>
	<b>INO-1400</b> modified hTERT DNA ± IL-12 DNA +EP	Breast, Lung, Pancreatic	I Inovio	54	Ongoing	NCT02327468

**Tableau 5 : Liste des essais cliniques en cours ciblant hTERT**

### III. Immunothérapie anti-tumorale

L'immunothérapie anti-tumorale est à l'heure actuelle acceptée comme composante clé des stratégies préventives ou thérapeutiques dans le traitement des cancers (Bluestone and Small, 2012 ; Eggermont et al., 2013). Elle consiste à stimuler le système immunitaire en lui apportant ses propres composants ou en le manipulant dans le but de favoriser l'immunité anti-tumorale et/ou d'empêcher les cellules tumorales de contourner cette dernière (Figure 17) (Dillman, 2011).



**Figure 17 : Schéma général des approches d'immunothérapies**

L'immunothérapie passive présente une action rapide sur des tumeurs volumineuses mais n'est pas durable dans le temps. L'immunothérapie active peut être rapide et induit une réponse mémoire, elle s'avère peu efficace sur des tumeurs de grand volume. Adaptée de De Pas et al. (2012) ; Gerard and Debruyne (2009).

## 1. Immunothérapie passive

L'immunothérapie passive décrit la génération *ex vivo* de molécules effectrices (i.e., anticorps) ou de cellules effectrices (i.e., CTLs) impliquées dans l'immunité anti-tumorale qui sont administrées à un patient.

### 1.1. Anticorps monoclonaux

Pendant près de dix ans, les anticorps monoclonaux (mAbs) ont représenté une grande partie des traitements contre les lymphomes et les tumeurs solides. Environ vingt anticorps monoclonaux ont été approuvés par la FDA dont plus d'une dizaine en oncologie (Gerber, 2008 ; Vacchelli et al., 2014).

Les premiers anticorps générés et commercialisés ont été dirigés contre le CD20 (Rituximab), cluster de différenciation présent sur les LB et indiqués pour le traitement des lymphomes non-Hodgkiniens et des maladies auto-immunes (Kosits and Callaghan, 2000 ; Scott, 1998). D'autres anticorps ont été générés tels les anticorps dirigés contre le CD33 (Gentuzumab ozogamicin, Mylotarg) et le CD52 (Alemtuzumab, Campath), clusters de différenciation présents dans les lymphomes et les leucémies (McGraw et al., 1994 ; Osterborg et al., 1997).

Contrairement aux premiers mAbs développés (murins), les anticorps développés de nos jours pour limiter des effets indésirables sont généralement chimériques (65% de composés humains ; -ximab), humanisés (95% ; -zumab) et humains (100% ; -mumab).

Certains mAbs exercent (Tableau 6 : mAbs ciblant les tumeurs approuvés par la FDA Tableau 6) leurs effets anti-tumoraux par ciblage des cellules tumorales (Adams and Weiner, 2005).

(1) Blocage des signaux de transduction (facteurs essentiels à la survie ou à la prolifération ou leurs récepteurs), cetuximab ou panitumumab pour l'EGFR (Weiner et al., 2008) ;

(2) Induction des mécanismes de cytotoxicité ou de phagocytose médiés par les anticorps (ADCC, ADCP) via les récepteur Fc $\gamma$ R (CD64, CD32, CD16) ou par le complément (CDC) en lien avec le rituximab (CD20) ;

- (3) Liaison à deux antigènes distincts (bispécifique), généralement un TAA et un marqueur des LTs, tout en préservant leur fonctionnalité par le fragment Fc, catumaxomab pour le CD3 et une molécule d'adhésion épithéliale (EPCAM) (Seimetz, 2011) ;
- (4) Couplage à des radio-isotopes, toxines, cytokines ou enzymes, dont le ibritumomab tiuxetan et le tositumomab/<sup>131</sup>I-tositumomab qui ciblent le CD20, seules radio-immunothérapies autorisées par la FDA pour les lymphomes non-Hodgkiniens (Gordon et al., 2004) ;
- (5) Activation des récepteurs cytotoxiques exprimés par les cellules tumorales par des agonistes aux récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2, le mapatumumab (HSG-ETR1) ou le conatumumab (IgG1 spécifique TRAIL-R2) qui induisent l'apoptose (Kaplan-Lefko et al., 2010 ; Pukac et al., 2005) ;
- (6) Ciblage du microenvironnement via des composés différents ou non de ceux trouvés dans les tissus normaux, le sibrotuzumab correspond au mAb humanisé anti-FAP (protéine d'activation des fibroblastes) (Scott et al., 2003), le bevacizumab bloquant la liaison du VEGF à son récepteur (Michielsen et al., 2012) ;

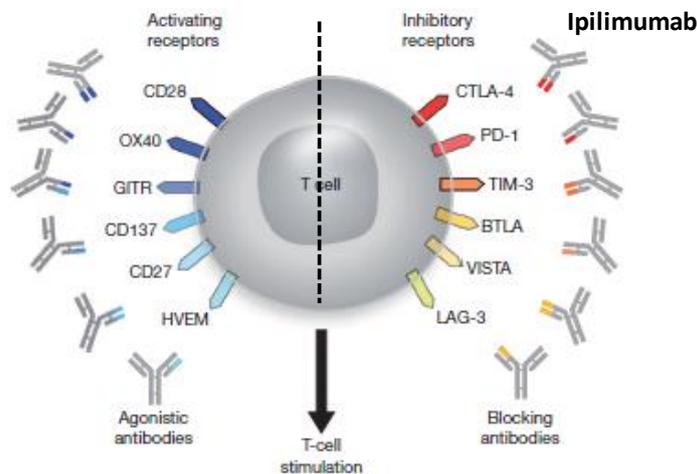
D'autres mAbs (Figure 18) pourront moduler et réactiver l'immunité anti-tumorale par leur liaison avec les molécules de co-stimulation ou de co-inhibition présentes sur les LTs (Riether et al., 2013) : l'ipilimumab cible par exemple le CTLA-4 pour empêcher l'inhibition du LTs (Delyon et al., 2013 ; Mellman et al., 2011), le nivolumab (Opdivo) et le pembrolizumab ciblent le PD-1 et ont été approuvés par la FDA en 2014 (Brahmer et al., 2010). De plus, des mAbs agonistes des molécules de co-stimulation comme le CD28 et les membres de la famille des récepteurs TNF (CD137, OX40, GITR and CD27) pourraient aussi permettre d'activer les réponses LTs anti-tumorales.

Ces mAbs sont importants pour contrer les mécanismes d'échappement mis en place par la tumeur et sont souvent utilisés en combinaisons avec d'autres immunothérapies.

mAb	Target	Approved	Type	Indication(s)
Alemtuzumab	CD52	2001	Hzed IgG1	Chronic lymphocytic leukemia
Bevacizumab	VEGF	2004	Hzed IgG1	Glioblastoma multiforme, colorectal, renal and lung cancer
Brentuximab vedotin	CD30	2011	C IgG1	Hodgkin's and anaplastic large cell lymphoma (coupled to MMAE)
Catumaxomab	CD3 EPCAM	2009	M-R hybrid	Malignant ascites in patients with EPCAM <sup>+</sup> cancer
Cetuximab	EGFR	2004	C IgG1	HNC and colorectal carcinoma
Denosumab	RANKL	2011	H IgG2	Breast cancer, prostate carcinoma and giant cell tumors of the bone
Gemtuzumab ozogamicin	CD33	2000	Hzed IgG4	Acute myeloid leukemia (coupled with calicheamicin)
Ibritumomab tiuxetan	CD20	2002	M IgG1	Non-Hodgkin lymphoma (coupled with <sup>90</sup> Y or <sup>111</sup> In)
Panitumumab	EGFR	2006	H IgG2	Colorectal carcinoma
Pertuzumab	HER2	2012	Hzed IgG1	Breast carcinoma
Ofatumumab	CD20	2009	H IgG1	Chronic lymphocytic leukemia
Rituximab	CD20	1997	C IgG1	Chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma
Tositumomab	CD20	2003	H IgG1	Non-Hodgkin lymphoma (naked or coupled with <sup>131</sup> I)
Trastuzumab (emtansine)	HER2	1998	Hzed IgG1	Breast carcinoma (naked or coupled to mertansine) and gastric or gastroesophageal junction cancer

**Tableau 6 : mAbs ciblant les tumeurs approuvés par la FDA**

C, Chimérique ; EGFR, récepteur au facteur de croissance épidermique. EPCAM, molécule d'adhésion cellulaire épithéliale ; H, human ; HNC, Cancer tête et cou ; Hzed, humanisé ; M, murin ; mAb, anticorps monoclonal ; MMAE, auristatine monométhyl E ; R, rat ; RANKL, récepteur activateur du ligand NF-κB ; VEGF, facteur de croissance vasculaire endothéliale. Tirée de Vacchelli et al. (2014).



**Figure 18 : Exemples de molécules de co-stimulation and co-inhibition sur les LTs**

Molécules adaptées pour être ciblées avec des agonistes (à gauche) ou des anticorps bloquants (à droite). Adaptée de Mellman et al. (2011).

## 1.2. Thérapie cellulaire adoptive

Le transfert adoptif de cellule (ACT) implique l'isolation de lymphocytes (principalement des CD8 mais aussi des CD4, NKs, NKTs, LTγδ ou LBs) autologues ou allogéniques, leur

sélection/expansion/activation *ex vivo* et leur ré-introduction chez un patient (Aranda et al., 2014). La source des cellules spécifiques de la tumeur est soit des LTs autologues naturellement induits circulant dans le sang ou ayant infiltré la tumeur ; soit des LTs génétiquement modifiés afin d'exprimer un TCR spécifique de haute affinité, une nouvelle réactivité, des molécules de co-stimulation ou pouvant sécréter des cytokines immunostimulatrices (IL-2). Cependant, la courte demi-vie des clones LTs générés, une fois réinjectés chez le patient et le besoin d'un développement individualisé due à la restriction HLA est une contrainte majeure dans le développement clinique de l'ACT (Riether et al., 2013).

Certains obstacles peuvent être contournés par une lymphodéplétion préparative induite par chimiothérapie ou par de nouvelles modifications génétiques des LTs sur leur TCRs (Aranda et al., 2014). En effet, des LTs identifiés à partir d'un patient ayant une réponse anti-tumorale efficace peuvent avoir leurs TCRs clonés et exprimés par les LTs autologues d'un autre patient compatible HLA à traiter. Un autre moyen est d'isoler des TCRs de souris humanisées qui ont été activés à reconnaître les antigènes de tumeurs et de les faire exprimer aux LTs autologues du patient. La dernière façon permet quant à elle de s'affranchir de la restriction HLA par la création de récepteurs antigènes chimériques (CARs) en fusionnant la région variable d'anticorps spécifiques avec les domaines intracellulaires des TCRs et de les faire exprimer aux LTs (Restifo et al., 2012).

Les immunothérapies basées sur l'ACT de TILs sont aujourd'hui le meilleur traitement disponible pour les mélanomes métastatiques. En effet, les TILs extraits des mélanomes sont une source riche de LTs CD4 et CD8 spécifiques de la tumeur comparativement à d'autres types de cancer (Topalian et al., 2011). Une étude sur 93 patients avec un mélanome de stade IV a démontré des régressions tumorales plus ou moins complètes pour 39 patients (Rosenberg et al., 2011). Cependant, malgré ce succès, l'efficacité des TILs naturellement induits apparaît restreinte aux mélanomes. De plus, ces approches présentent une spécificité monoclonale qui pourrait faciliter la sélection de variants tumoraux n'exprimant pas l'antigène ciblé et pourraient potentiellement entraîner le développement de toxicités inattendues dû à un mimétisme antigénique ou une réaction croisée des structures modifiées (e.g. TCR mésapariés) (Restifo et al., 2012).

En conclusion, l'immunothérapie passive implique une réaction immédiate du système immunitaire par le transfert d'anticorps monoclonaux ou de cellules T allogéniques ou

autologues. Cette réponse démontrée efficace pour divers types de tumeurs hématologiques et solides n'est cependant pas durable dans le temps. Au contraire, l'immunothérapie active induit une stimulation du système immunitaire spécifique et durable.

## 2. Immunothérapie active

L'immunothérapie active est basée sur deux stratégies principales visant à stimuler le système immunitaire lui-même. Ces deux stratégies consistent en une stimulation non spécifique sans spécificité d'antigènes et/ou en l'induction de réponses immunitaires spécifiques ciblant les antigènes exprimés par les cellules tumorales.

### 2.1. Non spécifique

De nombreux produits naturels ou synthétiques sont connus pour induire des réponses immunitaires et inflammatoires non spécifiques affectant les cellules cancéreuses dont les bactéries et les cytokines (Dillman, 2011).

#### 2.1.1. Bactéries/TLR adjuvants

Depuis les observations de William Coley (Coley, 1991) avec le *Streptococcus pyogenes* (rémission spontanée des sarcomes chez des patients ayant un érysipèle), on peut compter parmi les immuno-stimulateurs non-spécifiques, les glycoprotéines et lipides bactériens. Ces composants sont reconnus par les TLRs (agonistes TLRs) permettant ainsi l'induction de réponses immunitaires adaptatives et peut-être utilisés en tant qu'adjuvant TLRs. De nos jours, seuls trois agonistes TLRs sont approuvés par la FDA pour une utilisation anti-cancer (Vacchelli et al., 2013a) :

- (1) le bacille Calmette–Guérin (BCG, agoniste TLR2/TLR4, souche atténuée de *Mycobacterium bovis*) dans le traitement des carcinomes de la vessie *in situ* et de stade I ;
- (2) monophosphoryl lipid A (MPL, agoniste TLR2/TLR4, dérivé du LPS de *Salmonella minnesota*) licencié dans Cervarix<sup>®</sup>, traitement des lésions génitales précancéreuses (du col de l'utérus, de la vulve et du vagin) et du cancer du col de l'utérus induit par HPV16 et 18 ;
- (3) imiquimod (dérivé synthétique de l'imidazoquinoline, agoniste TLR7) pour la kératose actinique et le carcinome basocellulaire superficiel.

### 2.1.2. Cytokines

Les immuno-stimulateurs comprennent aussi les cytokines dont les effets anti-tumoraux sont généralement médiés par les récepteurs membranaires présents sur les cellules immunitaires et les cellules tumorales (Dillman, 2011). Les cytokines sont pléiotropes dans le sens où elles peuvent induire la prolifération, la chimiotaxie, la différenciation, l'inflammation, l'élimination de pathogènes et la mort cellulaire. Elles peuvent aussi stimuler la production et la libération d'autres cytokines et présentent l'avantage de pouvoir s'associer à de multiples récepteurs avec une affinité différente (Vacchelli et al., 2012a). Seules trois cytokines sont approuvées par les agences réglementaires pour des indications cancer, **(1 et 2)** les IFNs interféron- $\alpha$ 2a (Intron A<sup>®</sup>) et interféron- $\alpha$ 2b (Roféron<sup>®</sup>) dans les leucémies myéloïdes chroniques, les mélanomes (métastatiques), les cancers du rein (RCC), les lymphomes folliculaires ainsi que **(3)** l'IL-2 dans les mélanomes et les RCC (Dillman, 2011).

### 2.2. Spécifique (vaccins thérapeutiques)

L'intérêt grandissant des vaccins anti-cancer provient du succès considérable des vaccins prophylactiques dans le cadre des maladies infectieuses et est basé sur un fondement de l'immunologie portant sur la capacité des LTs à reconnaître des complexes peptides/CMH (Topalian et al., 2011).

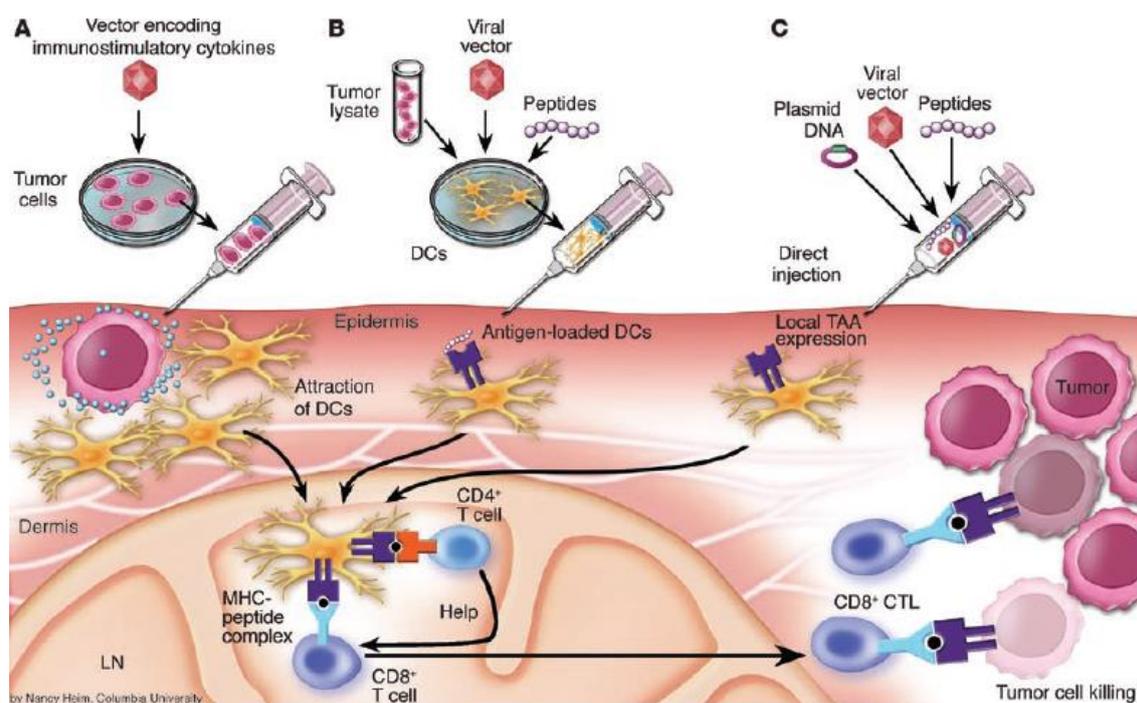
Des vaccins prophylactiques approuvés par la FDA et l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) ont été utilisés avec un succès considérable pour la prévention des cancers d'origine virale tels que le HBV (Genhevac B<sup>®</sup> et Engerix B<sup>®</sup>) et le HPV (Cervarix<sup>®</sup> et Gardasil<sup>®</sup>) (Mellman et al., 2011).

Contrairement aux vaccins prophylactiques administrés à des patients sains, le développement de vaccins thérapeutiques pour traiter des maladies existantes se montre plus complexe. En effet, la faible immunogénicité des antigènes tumoraux, la faible efficacité des vaccins sur les tumeurs établies et la capacité du cancer à développer des mécanismes d'immunosuppression sont des freins non négligeables à prendre en compte dans le développement des vaccins.

Le premier vaccin thérapeutique anti-cancer, sipuleucel-T (Provenge®) [vaccin basé sur des DCs autologues], a été approuvé par la FDA en 2010 pour traiter des patients présentant des cancers de la prostate avancés hormono-indépendants (Cheever and Higano, 2011 ; Kantoff et al., 2010a).

Les vaccins anti-cancer thérapeutiques ont pour dessein l'initiation de réponses immunitaires ciblant spécifiquement les antigènes exprimés par les cellules tumorales par l'induction de CD4, de CD8 et de LBs spécifiques des antigènes de tumeurs. L'avantage de ces vaccins et qui constitue aussi leur but final est surtout l'induction de réponses mémoires spécifiques des antigènes de tumeurs (Pulendran and Ahmed, 2011).

Différentes stratégies de vaccination (Figure 19) sont à l'heure actuelle en développement ou sont d'ores et déjà évaluées dans des essais cliniques et peuvent être classées en catégories selon leur type (Gerard and Debruyne, 2009 ; Guo et al., 2013).



**Figure 19 : Approches de vaccination anti-tumorale**

(A) Cellules tumorales autologues irradiées ou allogéniques transduites avec un vecteur viral de transfert de gènes encodant des cytokines telles que le GM-CSF. Les CPA (DCs) sont attirées, captent et présentent les TAAs des cellules tumorales sur leurs CMHs. (B) Les DCs peuvent être chargées directement par incubation avec des lysats protéiques tumoraux, des peptides dont la séquence est basée sur des TAAs exprimés ou des vecteurs viraux exprimant des TAAs. Elles seront ensuite réinjectées au patient duquel elles sont issues. (C) Les TAAs peuvent être localement exprimés par les DCs par l'injection de peptides, de vecteurs plasmidiques ADN ou ARN nu ou de vecteurs viraux codant des TAAs.

Les DCs migrent aux ganglions lymphatiques où elles vont présenter les antigènes aux LTs afin de générer des réponses cytotoxiques anti-tumorales. Adaptée de Berzofsky et al. (2004).

### 2.2.1. Vaccins basés sur les cellules tumorales

Ces vaccins permettent de présenter le spectre entier de TAAs au système immunitaire du patient, la tumeur étant elle-même la source la plus riche d'antigènes (Berzofsky et al., 2004). Ils consistent en l'administration au patient de ses propres cellules tumorales qui ont été irradiées et combinées avec un adjuvant (e.g. BCG, KLH, virus) (Berger et al., 2007 ; Harris et al., 2000).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Testés dans de nombreux cancers</li> <li>✓ Pas besoin d'un antigène défini, présentation de tous les TAAs</li> <li>✓ Possibilité d'augmenter la présentation antigénique (e.g. cellules irradiées ou lysats)</li> <li>✓ Possibilité de les administrer avec adjuvants</li> <li>✓ Innocuité des cellules tumorales autologues modifiées</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Requier la disponibilité de cellules tumorales autologues ou allogéniques présentant les mêmes TAAs</li> <li>✗ Durée de production longue, coûteuse et très technique</li> <li>✗ Nécessite de la culture cellulaire ex vivo</li> <li>✗ Réponse positive mais faible bénéfice</li> </ul>

**Tableau 7 : Caractéristiques des vaccins basés sur des cellules tumorales autologues**

Les vaccins basés sur les cellules tumorales allogéniques consistent en l'utilisation de lignées tumorales humaines établies (Canvaxin™). Ils incluent une source illimitée d'antigènes, une production standardisée et de grande échelle contrairement aux cellules autologues pour lesquelles les prélèvements ne sont pas toujours disponibles et la quantité cellulaire peut s'avérer faible (Guo et al., 2013).

Les cellules tumorales peuvent aussi être modifiées génétiquement avant d'être injectées aux patients afin d'exprimer des molécules immuno-stimulatrices telles que l'IL-12, le GM-CSF (GVAX) ou la molécule de co-stimulation B7-1 (Guo et al., 2013). Ces approches ont été utilisées avec plus ou moins de résultats dans de nombreux cancers : cancer du poumon, cancer colorectal, cancer de la prostate, cancer du sein.

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Testés dans de nombreux cancers</li> <li>✓ Pas besoin d'un antigène défini, présentation de tous les TAAs</li> <li>✓ Possibilité de modifier pour exprimer des caractéristiques immuno-stimulatrices</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Requier la disponibilité de cellules tumorales autologues ou allogéniques présentant les mêmes TAAs</li> <li>✗ Faible présentation antigénique par la plupart des lignées</li> <li>✗ Durée de production longue, coûteuse et très technique</li> <li>✗ Nécessite de la culture cellulaire ex vivo</li> </ul>

**Tableau 8 : Caractéristiques des vaccins basés sur des cellules tumorales génétiquement modifiées**

### 2.2.2. Vaccins basés sur les DCs

Les DCs sont connues comme les plus puissants stimulateurs des LTs naïfs par leur rôle de CPAs (Banchereau and Steinman, 1998). De plus, étant donné leur rôle crucial à l'interface des réponses innées et adaptatives, il n'est pas surprenant que les DCs constituent une approche thérapeutique anti-cancer majeure. Les vaccins basés sur les DCs sont constitués de (1) réinjection de DCs non chargées, (2) de DCs chargées *ex vivo* avec des TAAs (co-incubation, transfection, manipulations génétiques ou fusion avec cellules tumorales) (3) de DCs chargées *in vivo* avec des TAAs (couplage sur mAb ou vecteur ciblant DC) et (4) de DCs dérivées d'exosomes (Galluzzi et al., 2012 ; Vacchelli et al., 2013b).

Cependant, malgré le développement de procédés pour obtenir des quantités adaptées de DCs en clinique, l'inconvénient majeur de ces vaccins reste la limite du nombre de vaccination avec les DCs issus d'un patient (Guo et al., 2013).

Avantages	Inconvénients
✓ Puissantes CPAs	✗ Nécessite de la culture cellulaire <i>ex vivo</i>
✓ Disponibilité de techniques pour générer de grande quantité en clinique	✗ Durée de production longue, coûteuse et très technique
✓ Possibilité de cibler un TAA défini ou non	✗ Limite du nombre de vaccination suite à la leucaphérèse
	✗ Absence de critères de standardisation du produit final

**Tableau 9 : Caractéristiques des vaccins basés sur les DCs**

Comme cité précédemment, le sipuleucel-T (Provenge®) consiste en l'administration de CPAs issus de PBMCs incubées avec le PA2024 antigène de la prostate fusionné avec du GM-CSF (Cheever and Higano, 2011 ; Kantoff et al., 2010a). Cependant, une efficacité anti-tumorale modeste a été observée (amélioration de 4,1 mois sur la médiane de survie) par ce traitement.

Ainsi, les vaccins basés sur les DCs nécessitent de nouvelles optimisations, e. g. augmentation du niveau d'expression des molécules de co-stimulation (Guo et al., 2013) ou l'expression multiple d'antigènes (e.g. en utilisant différents peptides, lysats, transfection ARN, vecteurs viraux). En effet, un essai de phase II mené sur des patients atteints de mélanomes métastatiques a été associé à une prolongation significative de la survie suite à l'injection de DCs pulsées avec la KLH et un cocktail de cinq peptides associés au mélanome restreints

HLA-A\*0201 ou HLA-A\*2402 (gp100, tyrosinase, MAGE-A2, MAGE-A3 et MART-1 ou MAGE-A1) (Oshita et al., 2012).

### 2.2.3. Vaccins basés sur les peptides ou protéines

En comparaison des deux types de vaccins cités ci-dessus, les vaccins recombinants basés sur des peptides provenant de TAAs définis présentent un réel avantage. En effet, ils ne nécessitent pas de procédures complexes de préparation et d'optimisation et sont illimités quant à leur disponibilité (Guo et al., 2013). Les peptides synthétiques ou protéines recombinantes de TAAs dans ces vaccins sont captés ou liés directement par les CPAs pour être présentés sur les molécules de CMH afin d'induire une réponse anti-tumorale spécifique (Vacchelli et al., 2012b).

Les peptides et les protéines recombinantes ont l'avantage d'être peu onéreux, faciles à produire et à manipuler, sont bien définis et le fait d'être synthétiques évite les problèmes de lots. Cependant, ils sont peu immunogènes et nécessitent des modifications de séquences permettant par exemple d'augmenter leur affinité au CMH ou l'enclenchement du TCR ou d'être co-injectés avec des adjuvants (e.g. adjuvants TLRs). Ils ont aussi le désavantage d'avoir une immunogénicité restreinte à un nombre limité de CMH (Berzofsky et al., 2004).

Avantages	Inconvénients
✓ Possibilité de limiter la réponse immunitaire à des épitopes précis (cas des peptides)	✗ Requier la connaissance de l'épitope (cas des peptides)
✓ Possibilité d'augmenter la présentation antigénique	✗ Immunogénicité restreinte à un nombre limité de CMH (cas des peptides)
✓ Facile à produire et stable	✗ Requier l'ajout d'un adjuvant pour augmenter l'immunogénicité
✓ Possibilité de combinaison en cocktail	✗ Voie exogène de présentation antigénique

**Tableau 10 : Caractéristiques des vaccins basés sur les peptides ou protéines recombinantes**

Plusieurs vaccins peptidiques sont actuellement en essais cliniques de phase I et II et incluent le peptide HER-2/neu (cancer du sein, poumon), Mucine-1 (MUC-1; cancer du sein, côlon), CEA (*carcinoembryogenic antigen*; cancer colorectal, gastrique, sein, pancréas, poumon), PSA (*Prostate-specific antigen*) et le GV1001 (peptide CMH II de hTERT) qui est aussi en phase III (Rosenberg et al., 2004 ; Thundimadathil, 2012).

On dénombre depuis 2013, environ 20 nouveaux essais cliniques afin d'étudier la sécurité et de mieux caractériser le potentiel thérapeutique des vaccins peptidiques (Aranda et al., 2013).

En effet, certains vaccins polypeptides tels que le Stimuvax<sup>®</sup> (vaccin MUC-1 dans le NSCLC, Oncothyreon) démontrant des bénéfices cliniques en phase II (50% des patients étaient en vie trois ans après le traitement), n'a cependant pas atteint le critère principal d'amélioration de la survie globale en phase III (<http://www.merckgroup.com>) et a donc été abandonné.

Parmi les vaccins protéiques, un constat similaire a été annoncé pour l'essai clinique de phase III de MAGRIT (vaccin recMAGE-A3 + AS15) n'ayant pas démontré d'extension significative de la survie (<http://us.gsk.com>) (Holt et al., 2011).

Néanmoins, parmi les essais cliniques basés sur des protéines recombinantes, celui impliquant NY-ESO-1 administrée avec Montanide et CpG démontre des résultats encourageants par l'induction d'une réponse CTL spécifique et la réduction de la réactivité tumorale (Bioley et al., 2009).

#### 2.2.4. Vaccins génétiques

Une autre stratégie pour délivrer des TAAs *in vivo* est l'utilisation de **vecteurs plasmidiques ARN**, **ADN** portant une cassette d'expression ou de **vecteurs viraux** modifiés pour exprimer des TAAs. Après leur administration, ils transfectent ou infectent des cellules somatiques (muscle ou peau) ou des DCs, résultant à une présentation directe ou indirecte des antigènes codés par les vecteurs. L'avantage majeur de ces vaccins comparés aux autres approches est la facilité à délivrer des antigènes multiples en une seule injection, d'activer de nombreux mécanismes d'immunité et de pouvoir combiner différents vaccins génétiques dans des stratégies de vaccination hétérologue (Auricchio and Ciliberto, 2012).

L'administration d'**ARN** comme vaccin peut générer des réponses immunitaires contre de nombreux antigènes de tumeur pouvant ainsi réduire la possibilité d'échappement tumoral. Cependant, l'ARN n'est pas stable et peut causer des effets secondaires dus à sa dégradation rapide. Il est donc préférable de les vectoriser par exemple dans des liposomes (Fotin-Mleczek et al., 2012). Malgré leur avantage indéniable qui est l'absence de possibles mutations, ils n'ont été testés cliniquement (phase I/II) que dans le mélanome ou le cancer rénal avec peu d'effet thérapeutique (Weide et al., 2009).

Les **vaccins ADN** sont des plasmides bactériens construits pour délivrer et faire exprimer un ou plusieurs TAAs, et/ou des molécules immuno-stimulatrices par les cellules du patient elles-mêmes afin d'activer l'immunité cellulaire et humorale. Ils permettent l'introduction de

multiples gènes dans leur cassette d'expression avec la possibilité d'optimiser les séquences (optimisation de codons, réarrangements...) (Guo et al., 2013).

L'utilisation des vaccins basés sur les **vecteurs viraux** est due aux phénomènes observés lors d'une infection virale, qui permettent la présentation des antigènes sur les CMH I et II par les CPAs infectées. Ainsi, des vecteurs viraux ayant été atténués pour éviter d'être pathogènes et ayant vu leur immunogénicité intrinsèque diminuée ont été modifiés pour exprimer en plus de leurs protéines virales, des TAAs ou des TAAs combinés avec des molécules immuno-stimulatrices (Draper and Heeney, 2010).

Les vaccins basés sur les vecteurs plasmidiques ADN et vecteurs viraux dont le vecteur rougeole en particulier seront décrits dans les deux parties suivantes. Bien que chacun possède ses avantages et ses inconvénients, ils représentent de nos jours des stratégies prometteuses à la fois seules ou en combinaison. Ils constituent la stratégie développée par INVECTYS dans le cadre de son activité d'immunothérapie anti-cancer ciblant hTERT.

### **3. Vaccination ADN**

Depuis leur découverte il y a environ deux décennies, les vaccins ADN représentent un traitement majeur utilisé en clinique pour stimuler l'immunité protectrice contre de nombreuses maladies incluant le cancer (Fioretti et al., 2010 ; Kutzler and Weiner, 2008 ; Liu, 2003).

#### **3.1. Historique**

Historiquement, en 1990, Wolff et ses collègues (Jon et al., 1990) ont été les premiers à administrer un ADN recombinant dans le muscle d'une souris résultant en l'expression de la protéine encodée par le plasmide. Peu après, il a été démontré dans le cadre de vaccinations préventives contre influenza et HIV-1 que l'expression de certaines de leurs protéines codées par un plasmide transfecté induit une réponse humorale et cellulaire (Tang et al., 1992 ; Ulmer et al., 1993 ; Wang et al., 1993) spécifique de l'antigène codé. Ces réponses ont constitué les fondements du premier vaccin ADN testé en clinique pour l'infection du virus de

l'immuno-déficience humaine (HIV) (MacGregor et al., 1998). Elles ont aussi été à l'origine d'un nombre considérable d'essais cliniques de phase I-II contre les antigènes de tumeurs (Fioretti et al., 2010 ; Senovilla et al., 2013).

Les vaccins ADN sont de simples vecteurs permettant une transfection *in vivo* et la production d'un antigène. Ils sont composés d'un plasmide d'ADN qui peut coder pour un antigène d'intérêt entier ou partiel (e.g. hTERT), pour des cytokines ou des molécules de co-stimulation pouvant influencer la polarisation des réponses immunitaires (e.g. GM-CSF, IL-12, B7-1 ou B7-2) ou pour des protéines de fusion favorisant les mécanismes de présentation antigénique (e.g. l'ubiquitine) (Shedlock and Weiner, 2000). Ces séquences sont placées sous le contrôle d'un promoteur mammifère (i.e. CMV-intA, promoteur immédiat/précoce CMV et la séquence de son intron A adjacent) pour assurer une transcription efficace dans les cellules eucaryotes et peuvent facilement être produites dans des bactéries (Cui, 2005 ; Guo et al., 2013).

### **3.2. Mécanismes**

Les vaccins ADN sont injectés soit dans la peau en intradermique (ID), en sous-cutané (SC) ou dans le muscle par différentes méthodes de délivrance. Utilisant la machinerie cellulaire de l'hôte, les plasmides ADN rentrent dans le noyau de cellules transfectées localement telles que les myocytes, les kératinocytes et les CPAs résidentes (Fioretti et al., 2010). Selon le type des cellules qui prennent en charge le vaccin, différents mécanismes vont être impliqués (Howarth and Elliott, 2004 ; Kutzler and Weiner, 2008 ; Rice et al., 2008).

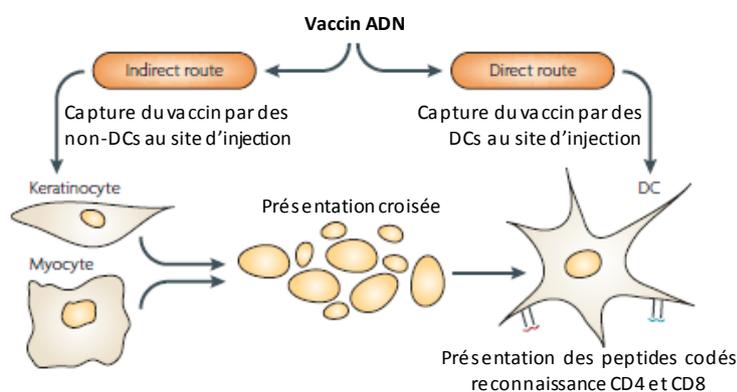
En effet, les CPAs (notamment lors d'une vaccination intradermique) peuvent être transfectées directement par le plasmide portant le gène d'intérêt. L'expression génique du plasmide (initiation transcription) suivie par la production de la protéine dans le cytoplasme permet par conséquent la génération des peptides qui seront chargés sur les molécules de CMH I (Rice et al., 2008).

Lorsque le plasmide est transfecté dans les cellules non immunitaires résidentes du tissu, ces dernières peuvent augmenter leurs molécules de CMH I et de co-stimulation afin de présenter l'antigène (Shirota et al., 2007).

Dans les deux cas (APCs ou cellules résidentes), la cellule apporte les modifications post-traductionnelles à l'antigène et prépare l'antigène d'une façon similaire à celle induite par les vecteurs vivants recombinants.

Il faut aussi prendre en compte que l'induction d'un haut niveau d'immunité et d'une activation efficace des LTs naïfs nécessite que les antigènes captés par les cellules non immunitaires soient transférés aux CPAs par présentation croisée (Figure 20) (Radcliffe et al., 2006) :

- Capture de vésicules apoptotiques des cellules résidentes impliquant l'apport endogène de l'antigène ; ceci permet aux CPAs de présenter des antigènes à la fois sur les CMH II et sur les CMH I (Shedlock and Weiner, 2000).
- Endocytose d'antigènes sécrétés conduisant à la formation d'un phagosome qui peut fusionner avec les vésicules dérivées du réticulum endoplasmique et permet l'accès de l'antigène exogène au compartiment où est chargé le CMH I (Guermonprez et al., 2003).



**Figure 20 : Voies de présentation des antigènes**

Les vaccins ADN sont transfectés soit dans les cellules non-immunitaires du tissu dans lequel ils sont injectés (peau ou muscle), soit par les CPAs résidentes dans ce tissu. Pour l'activation des LTs, les antigènes des cellules non-immunitaires sont transférés aux CPAs par transfert de matériel antigénique, nommé présentation croisée. Adaptée de Rice et al. (2008).

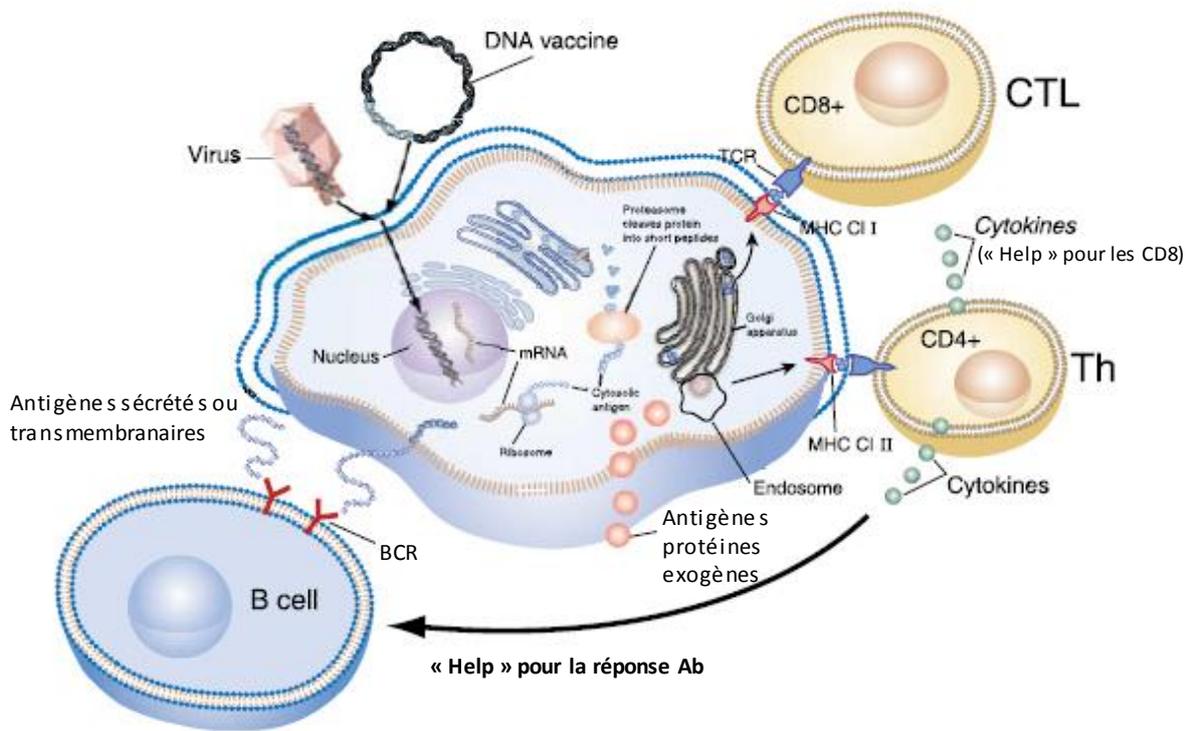
Un autre facteur clé dans l'immunogénicité des vaccins ADN est le plasmide ADN en lui-même qui agit comme un PAMPs (motifs CpG). En effet, les plasmides ADN dérivés des bactéries stimulent aussi l'immunité innée en interagissant avec le TRL9 présents sur les DCs (Liu and Ulmer, 2005).

Cette réponse non-spécifique augmente la réponse immunitaire spécifique de l'antigène lorsque la présentation directe et indirecte de l'antigène est impliquée (Klinman et al., 1997 ; Stevenson et al., 2010).

Ainsi, les CPAs ayant été activées par les CpG et présentant les antigènes migrent aux DLNs du site d'injection, où elles vont présenter ces antigènes aux LTs naïfs entraînant à la fois des réponses immunitaires cellulaires et humorales (Figure 21). En effet, les vaccins ADN permettent de générer des CTLs grâce à l'expression intracellulaire de l'antigène. Comme décrit plus haut, les voies de présentation croisée leur permettent aussi d'induire principalement des réponses CD4 de type Th1 et dans une moindre mesure des réponses de type Th2 et LB (Fioretti et al., 2010 ; Kutzler and Weiner, 2008).

De plus, l'induction de LTs CD4 de type Th1 est primordiale pour la maintenance et l'expansion des CTLs ainsi que pour la constitution du pool de LTs CD8 mémoires et sa réactivation en présence d'IL-2 (Rice et al., 2008). En effet, en l'absence des Th1, la réactivation des CTLs mémoires conduit à la mort cellulaire (Janssen et al., 2005) alors qu'une fois induits, l'IL-15 semble suffire à les maintenir sans support des Th1 (Prlic et al., 2007).

Le type de réponse humorale induite n'est pas très clair et semble quant à lui être très dépendant de la voie d'injection et de la méthode d'administration. En effet, une injection dans la peau (voie intradermique ou bombardement par *gene-gun*) semblerait être reliée à une réponse Th2 associée à une production d'IgA et d'IgG1 ; et inversement, une injection dans le muscle serait reliée aux Th1 associés à une production d'IgG2A (Shedlock and Weiner, 2000).



**Figure 21 : Mécanisme général de la vaccination basée sur les ADN et sur les vecteurs viraux**

Le plasmide et le vecteur viral (par son récepteur ou fusion) rentrent dans la CPA. L'expression interne de la protéine d'intérêt est initiée. Les protéines de sources intracellulaires sont dégradées par la voie du protéasome et les peptides sont apprêtés sur les CMHs classe I. La CPA capte aussi des antigènes exogènes qui entrent dans la voie de dégradation des endolysosomes. Les peptides résultants s'associent aux CMHs class II et par présentation croisée peuvent s'associer aux CMHs I. Les LTs spécifiques des peptides présentés fournissent un « help » à la fois pour l'activation des CD8 et celle des LB qui reconnaissent via leur BCR des protéines sécrétées ou transmembranaires. Adaptée de Liu (2003).

### 3.3. Avantages et inconvénients

Les vaccins ADN présentent de nombreux avantages par rapport à certaines approches de vaccination citées plus haut (Berzofsky et al., 2004 ; Herrada et al., 2012 ; Kutzler and Weiner, 2008 ; Senovilla et al., 2013 ; Shedlock and Weiner, 2000):

<b>Avantages</b>	
<b>Ingénierie</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Facilité d'incorporation de gènes multiples qui encodent des TAAs entiers ou partiels, des molécules immuno-stimulatrices et/ou des protéines de fusion.</li><li>✓ Facilité d'optimisation.</li><li>✓ Approches combinatoires facilement adaptables</li></ul>
<b>Production</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Possibilité d'obtenir de grande quantité pour une utilisation clinique (GMP), rapide et peu onéreux</li></ul>
<b>Sécurité</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Incapacité à retrouver une forme virulente</li><li>✓ Absence d'effet secondaire reporté sur plus de 100 essais cliniques à ce jour</li><li>✓ Administrations multiples possibles (absence immunité anti-ADN)</li></ul>
<b>Stabilité</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Insensible aux variations de température</li><li>✓ Longue durée de conservation</li></ul>
<b>Immunogénicité</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Capacité à induire à la fois des réponses humorales et cellulaires</li><li>✓ Longue production de l'antigène</li><li>✓ Injection de faibles doses efficaces dans les modèles animaux (<math>\mu\text{g}</math>)</li></ul>

**Tableau 11 : Avantages des vaccins ADN**

Malgré, ces caractéristiques attractives, de potentiels problèmes de sécurité ont été émis (Kutzler and Weiner, 2008) concernant une intégration du vaccin dans l'ADN cellulaire pouvant causer une mutagénèse insertionnelle dans les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs mais ceci représente un phénomène rare.

Ces problèmes mettent potentiellement en cause le développement d'auto-immunité. Cependant, aucune preuve d'anticorps anti-noyau ou anti-ADN n'a été rapportée à ce jour sur les essais cliniques et précliniques.

Le dernier point émis est le développement d'une résistance aux antibiotiques, marqueur utilisé pour la sélection à grande échelle des plasmides. Cependant, les antibiotiques utilisés pour la sélection bactérienne (souvent la kanamycine) ne sont pas utilisés pour traiter les infections chez l'Homme. De plus, de nouvelles stratégies n'utilisant pas les antibiotiques ont été mises au point (Luke et al., 2009).

Néanmoins, outre ces problèmes potentiels, les inconvénients des vaccins ADN incluent :

<b>Inconvénients</b>	
<b>Ingénierie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Faible efficacité de transfection</li> <li>✗ Requier la connaissance détaillée de la séquence de l'antigène</li> </ul>
<b>Immunogénicité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Faible immunogénicité surtout pour les antigènes du soi et l'ADN nu dans de nombreux animaux et chez l'Homme, comparé à la souris</li> </ul>

**Tableau 12 : Inconvénients des vaccins ADN**

Afin d'augmenter l'immunogénicité des vaccins ADN, à ce jour de nombreuses approches ont été envisagées et mises au point, par exemple des stratégies d'immunisation prime-boost avec un vecteur viral encodant le même antigène (abordé dans le dernier point de cette partie) ou de nombreuses techniques d'immunisation et de système de transfert de l'ADN telles qu'une immunisation intradermique couplée à une procédure d'électrotransfert de gènes (EGT), aussi appelée électroporation (Coban et al., 2011).

### **3.4. Voie d'injection et méthodes de transfert**

Le niveau et la polarisation des réponses immunitaires induites par la vaccination ADN apparaît donc aussi dépendre de la voie d'injection et du système de livraison utilisé (Senovilla et al., 2013).

En général, les voies d'injection sont intramusculaire (IM); sous-cutanée (SC), intradermique (ID) ou encore intratumorale (IT). Les méthodes pouvant être employées pour délivrer l'ADN incluent des vecteurs bactériens ou eucaryotes (e.g. souche atténuée de *Salmonella typhimurium* ou *Saccharomyces cerevisiae*) combinés à une méthode physique (e.g. *gene gun* ; *jet injection*, tatouage, sonoporation, injection hydrodynamique, voie orale et EGT) ou des vecteurs non-viraux (e.g. liposomes, polymères, nanoparticules).

Dans les deux sous-parties qui suivent, la vaccination par injection intradermique et l'EGT seront détaillés. Cette voie d'injection et cette méthode sont utilisées dans la stratégie de vaccination développée par INVECTYS.

### 3.4.1. La peau, un site immunitaire privilégié

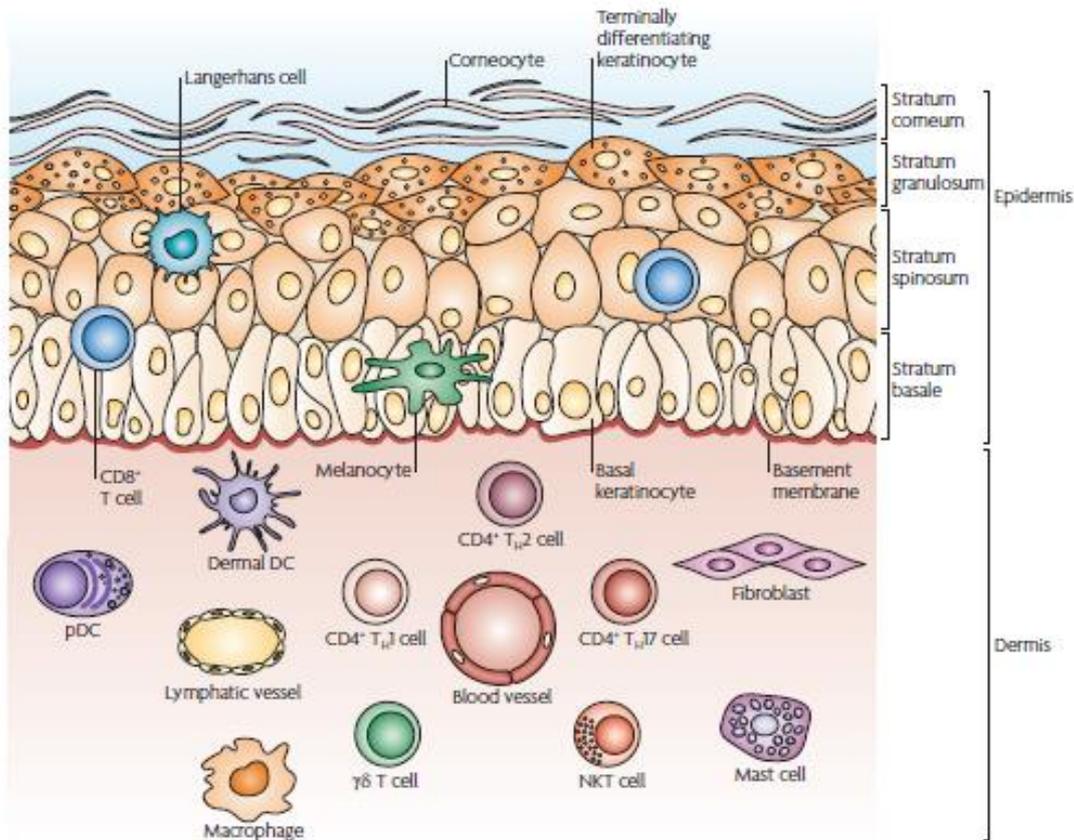
La grande majorité des vaccins est injectée en IM. En effet, cette route permet l'expression d'un transgène pendant plusieurs mois grâce aux myocytes qui sont des cellules post-mitotiques et produisent de grande quantité de protéines (Gothelf et al., 2010). Cependant, le muscle est loin d'être un tissu hautement immunogène (Kim and Prausnitz, 2011).

Au contraire, la peau, première barrière de l'organisme contre les pathogènes, est un tissu facilement accessible avec une large surface de vaccination et possède des caractéristiques immunologiques uniques et pertinentes (Nicolas and Guy, 2008). En effet, elle représente un site plus attractif pour la vaccination dû à sa richesse en CPAs résidentes ; et à son réseau dense de capillaires sanguins et vaisseaux lymphatiques assurant un drainage efficace et par conséquent une migration élevée des cellules aux DLNs (Lambert and Laurent, 2008 ; Nicolas and Guy, 2008). Néanmoins, la peau étant un tissu en renouvellement, l'expression du transgène est donc régie par le type de cellules transfectées au site d'injection, e.g. la transfection des kératinocytes provenant des cellules souches de la membrane basale limite l'expression du transgène à quelques semaines (Elnekave et al., 2011 ; Gothelf and Gehl, 2012).

La peau est divisée en deux couches principales, l'épiderme et le derme (Figure 22). L'épiderme représente une barrière physique constituant la première ligne de l'immuno-surveillance et est séparé en quatre strates qui permettent le renouvellement des cellules de l'épiderme (Peachman et al., 2003). L'épiderme contient différents types de cellules dont des kératinocytes (90% des cellules de l'épiderme), des mélanocytes, des cellules de Merkel et des cellules de Langerhans (LCs) importantes pour l'initiation des réponses immunitaires (3-5% des cellules de l'épiderme). Il contient aussi des LTs CD8 cytotoxiques effecteurs et mémoires qui contribuent à la mise en place rapide d'une réponse cellulaire spécifique d'un antigène. (Combadiere and Liard, 2011).

Le derme sert de support solide pour la peau et est constitué de fibroblastes synthétisant les composants de la MEC, de DCs dermiques (dDCs), de macrophages, de mastocytes, de LTs mémoires (CD4 et CD8), et des LTs $\gamma\delta$  (Nicolas and Guy, 2008). De plus, la riche vascularisation du derme par les vaisseaux sanguins et lymphatiques facilite le recrutement

d'autres cellules immunitaires (neutrophiles, monocytes, MoDCs, LTs mémoires) ainsi que leur recirculation (Combadiere and Liard, 2011 ; Nicolas and Guy, 2008).



**Figure 22 : Anatomie de la peau et effecteurs cellulaires**  
Tirée de Nestle et al. (2009).

Les kératinocytes en réponse à des stimuli peuvent sécréter de grande quantité de chimiokines et de cytokines dont d'IL-1 $\alpha$ , IL-6 et le TNF. Les fibroblastes, quant à eux, sécrètent aussi de l'IL-6 (activation des dDCs) et du TGF- $\beta$  (maturation des LCs). Les cellules épithéliales et les cellules immunitaires innées résidentes expriment des PRRs. Les mastocytes en réponse à une stimulation TLR sécrètent de nombreuses cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF et GM-CSF). Ainsi l'activation des LCs et des dDCs par les TLRs dans ce contexte inflammatoire augmente la production des cytokines pro-inflammatoires (par exemple l'IL-1 $\beta$  par les LCs) et entraînent leur migration et leur maturation vers les DLNs (Kupper and Fuhlbrigge, 2004 ; Nestle et al., 2009).

Toutes ces caractéristiques font de la peau un tissu idéal pour l'injection des vaccins ADN et de nombreuses techniques d'injection ont été développées pour obtenir une vaccination efficace.

### 3.4.2. Administration intradermique des vaccins ADN

Les différentes méthodes d'immunisation adaptées à la peau utilisées à l'heure actuelle sont regroupées en trois catégories selon la strate de la peau ciblée (Figure 23).

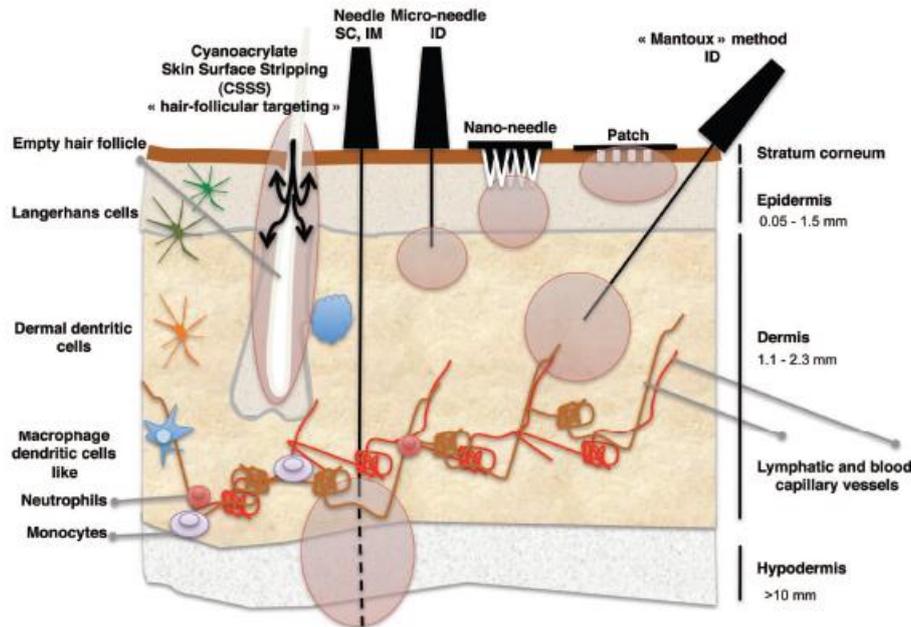


Figure 23 : Voies d'immunisation dans la peau et diffusion dans les différentes zones  
Tirée de Combadiere and Liard (2011).

La première concerne l'immunisation épidermique. Elle fait appel à une vaccination par suppression du stratum corneum ou du follicule pileux (*stripping*) ou à une vaccination transcutanée (patch) ou avec des nano-aiguilles mais induit uniquement un niveau de réponses immunitaires équivalent à une injection IM (Peachman et al., 2003).

La seconde catégorie couvre à la fois l'immunisation épidermique et intradermique par la technologie *gene gun* et l'EGT (Peachman et al., 2003). L'immunisation balistique (*gene gun*) utilise de l'hélium comprimé pour injecter des particules d'or qui sont chargées avec le plasmide. Malgré des résultats prometteurs, cette technique voit son efficacité limitée par la mort des cellules ayant intégré des particules d'or et par la polarisation des réponses CD4 en type Th2 (Kis et al., 2012). L'EGT impliquant des impulsions électriques améliore la

transfection de l'ADN (cette technique est décrite au point 3.4.3) mais nécessite au préalable une injection de l'ADN (Kim and Prausnitz, 2011).

La troisième catégorie concerne l'immunisation intradermique décrite pour induire des réponses immunitaires plus efficaces que les autres voies d'immunisation (e.g. IM et SC) avec une plus faible dose de vaccin (PATH, 2009). L'injection intradermique de vaccins utilisant la technique de Mantoux provient de Charles Mantoux, physicien français, qui en 1910 fut le premier à utiliser cette technique pour les diagnostic tuberculiques (Mantoux, 1910). Cette immunisation standard consiste à insérer une seringue de calibre 26-27 dans la peau étirée avec un angle de 45°. De plus, cette technique permet l'injection d'un volume de 100 à 200 µL de solution vaccinale (1/5<sup>ème</sup> du volume classiquement injecté par les voies IM et SC (Lambert and Laurent, 2008).

A l'heure actuelle, la voie intradermique est utilisée uniquement pour un nombre limité de vaccins approuvés tels que le BCG, la tuberculose, le vaccin contre la rage et contre la vaccine (smallpox). Au cours des dernières années, cette voie a aussi été explorée comme alternative avec succès pour les vaccins contre le HBV, le virus de la rougeole (MV) et le virus de la grippe (Endmann et al., 2010 ; Kenney et al., 2004 ; Sangare et al., 2009).

Bien que l'avantage de cette injection soit la facilité d'accès au matériel, cette technique d'injection requiert tout de même une certaine expérience pour la réalisation de l'injection. En effet, la profondeur de l'aiguille est cruciale, si l'injection est réalisée trop profonde, le vaccin peut entrer dans l'hypoderme (tissu peu immuno-compétent) et si elle est réalisée trop superficielle, le vaccin peut s'écouler sur la peau (Combadiere and Liard, 2011).

Par conséquent, afin de mieux standardiser cette injection, de nouveaux systèmes sont à l'heure actuelle développés tels que des systèmes de microinjection (microaiguilles, *liquid jet injectors*...) permettant une injection ID perpendiculairement à la peau (e.g. Intanza<sup>®</sup> développé par Sanofi) (Kis et al., 2012 ; Lambert and Laurent, 2008 ; Laurent et al., 2007).

### **3.4.3. Electrotransfert de gènes**

Comme exposé précédemment, pour optimiser les réponses immunitaires induites par une vaccination ADN, différentes approches ont été mises au point dont l'EGT. Cette technique est utilisée comme outil de recherche depuis 1980 pour transférer des cellules *in vitro*

(Neumann et al., 1982). Basée sur ces succès, l'EGT a commencé à être utilisée *in vivo* pour délivrer de l'ADN dans la peau (Zhang et al., 1996). Des études combinant l'EGT et la vaccination ADN ont montré qu'il était possible d'obtenir des réponses immunitaires cellulaires et humorales efficaces en préclinique (Kutzler and Weiner, 2008).

Cette technique consiste à appliquer un champ électrique qui surpasse la capacité électrique de la membrane cellulaire. Le champ électrique modifie l'équilibre des charges et augmente la pression électrostatique exercée sur différentes parties de la membrane. Les cellules sont rendues transitoirement perméables dues à l'entrée d'eau dans la membrane et à la formation de pores hydrophiles (Gehl, 2003). L'EGT dépend aussi des propriétés biophysiques de la membrane cellulaire et de celles des molécules et ions environnants (Escoffre et al., 2009).

Du fait que l'ADN est trop large pour rentrer par simple diffusion à travers les pores hydrophiles, les cellules doivent rester dans un état perméabilisé. Dans ce sens, les impulsions électriques ont été optimisés et généralement une série de court haut voltage (*high voltage*, HV, e.g. 1 à 8 pulses de 0,1 ms à 1000 V/cm de l'écartement de l'électrode) suivi d'un long bas voltage (*low voltage*, LV, e.g. 1 pulse de 400 ms à 80 V/cm) est utilisé pour délivrer l'ADN (Figure 24) (Andre et al., 2008).

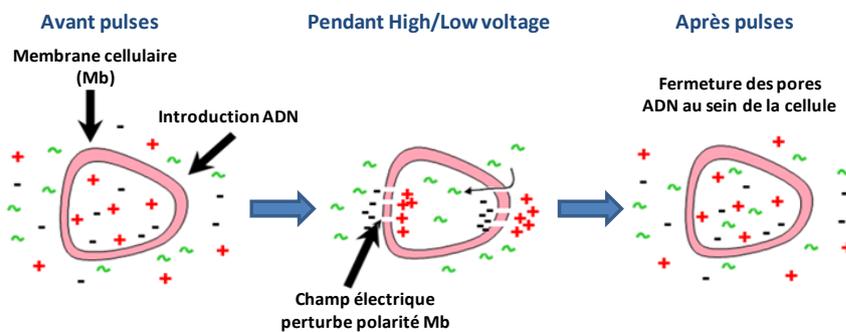


Figure 24 : Principe de l'EGT dans le cadre d'une vaccination ADN ([btxonline.com](http://btxonline.com))

La délivrance des impulsions électriques est réalisée (clinique et préclinique) par des générateurs d'impulsions commerciaux, e.g. le Cliniporator® (IGEA) qui est le seul générateur autorisé pour une utilisation chez l'Homme (marquage CE, Figure 25). Il délivre des impulsions électriques de HV courtes ( $\mu$ s, 100-1000V) et de LV long (ms, 20-200V).

Quatre types d'électrodes sont disponibles pour une application anti-cancer (Figure 25):

- électrodes plates non-invasives
- électrodes invasives avec aiguilles en lignes parallèles

- électrodes invasives avec aiguilles hexagonales
- électrodes invasives en bague

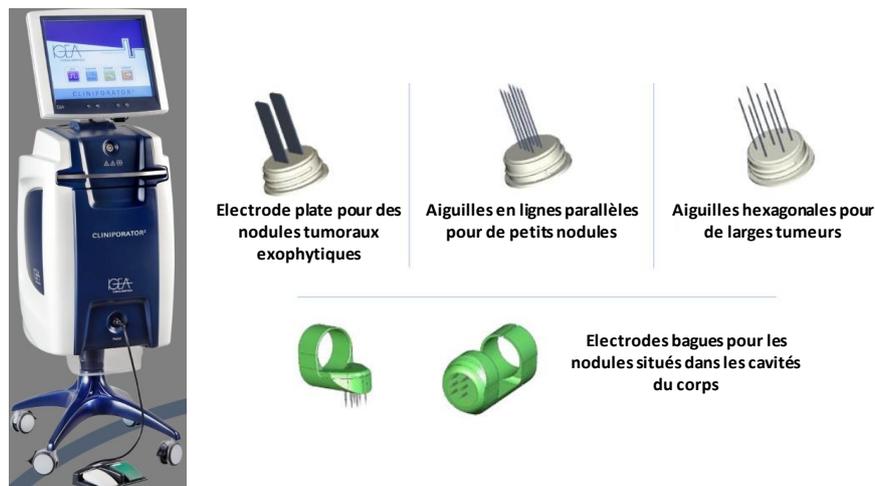


Figure 25 : Générateur Cliniporator® et électrodes disponibles pour les applications anti-cancer ([igea.com](http://igea.com))

De nombreuses études ont été réalisées avec l'EGT dans différents tissus, principalement le muscle, la peau et la tumeur (Mir et al., 2005). L'EGT est un traitement bien toléré qui est réalisé rapidement. Les effets négatifs sont mineurs et peuvent être reliés à l'injection ID et l'insertion d'une électrode si celle-ci est invasive, douleurs qui sont évitées avec une anesthésie locale.

### 3.5. Essais cliniques vaccin ADN anti-cancer

De nombreux essais cliniques basés sur les immunothérapies anti-cancer existent mais peu impliquent une vaccination ADN et moins encore avec une injection ID (Gothelf and Gehl, 2012). A l'heure actuelle, les seuls essais cliniques impliquant une vaccination ADN en ID avec EGT réalisés et complétés, concernent le cancer de la prostate avec des résultats prometteurs (Eriksson et al., 2013 ; Miller et al., 2005 ; Todorova et al., 2005). En ce qui concerne, les essais cliniques sur hTERT, seuls deux vaccins ADN combinés à l'EGT développés par Inovio (Yan et al., 2013) et Invectys sont à l'heure actuelle en essais cliniques et le seul à être injecté en ID est celui d'Invectys.

## 4. Vaccination basée sur un virus vivant atténué rougeole

L'utilisation des virus comme stratégie d'immunisation afin d'induire des réponses spécifiques anti-tumorales est basée sur l'observation qu'une infection virale résulte à la présentation des antigènes spécifiques du virus via les CMH classe I et II des cellules infectées (Guo et al., 2013). De plus, la plupart des vecteurs viraux ont l'avantage d'être naturellement immunogènes, de pénétrer efficacement dans les cellules en mimant l'infection naturelle et d'induire de puissantes réponses immunitaires (Bonnet et al., 2000).

### 4.1. Système viral de délivrance

La plupart des virus peuvent être modifiés pour exprimer des TAAs et ainsi donner naissance à des vecteurs recombinants. Comme les plasmides, ces virus recombinants ont la capacité de délivrer le transgène aux CPAs (infection) dont spécifiquement les DCs et de leur faire exprimer pour en permettre la présentation sur les molécules de CMH I et II. Cette présentation améliorée des antigènes de tumeurs conduit à une augmentation de la fréquence et de l'avidité des CTLs spécifiques de l'antigène (Larocca and Schlom, 2011).

Par ailleurs, des études ont démontré que les transgènes exprimés par un vecteur viral sont plus immunogènes que les transgènes administrés avec des adjuvants (Kass et al., 1999). Cette observation est attribuée à l'environnement pro-inflammatoire induit par l'infection. En effet, les vecteurs viraux activent fortement l'immunité innée via les TLRs ce qui facilite aussi le recrutement des LTs spécifiques (Zhu et al., 2007). De plus, les signaux inflammatoires induits par les vecteurs influencent la dépendance à l'IFN de type I des LTs CD8 pour l'expansion clonale et la formation de CD8 mémoires (Kolumam et al., 2005 ; Thompson et al., 2006).

Historiquement, les premiers vecteurs viraux à avoir été évalués appartiennent à la famille des *poxviridae* tels que la vaccine ou la souche modifiée de la vaccine Ankara (MVA) et le avipoxvirus (fowlpox et canarypox ; ALVAC vecteur recombinant CEA) (Marshall et al., 2000 ; Walsh and Dolin, 2011). A ce jour, un certain nombre d'essais cliniques utilisant des vecteurs recombinants ont été rapportés ou sont actuellement en cours. Ces vecteurs expriment en général des antigènes de tumeurs et/ ou des cytokines ou molécules immuno-

stimulatrices, e.g. ALVAC-CEA (*canarypox-carcinoembryonic antigen*) dans les carcinomes (Zhu et al., 2000); PROSTVAC (vecteur fowlpox qui comprend un transgène PSA et un TRICOM (trois molécules de co-stimulation CD80, CD54, et CD58)) dans le cancer de la prostate (Kantoff et al., 2010b ; Madan et al., 2009) ; TG4010 (vecteur MVA-MUC1-IL-2) dans le carcinome rénal métastatique (Oudard et al., 2011) ou encore des vecteurs adénovirus recombinants PSA, HER-2/Neu (NCT00583024, NCT00197522).

## 4.2. Type de vecteurs : avantages et inconvénients

Certes, les vecteurs viraux présentent des risques et des inconvénients qui concernent en général, le risque de potentiel retour à la virulence, de réactogénicité ou de recombinaison. Les inconvénients concernent majoritairement la préexistence d'une immunité contre le vecteur ou l'immuno-dominance des antigènes viraux sur les antigènes tumoraux (Berzofsky et al., 2004). Néanmoins, l'avantage principal de ces vecteurs est leur capacité à induire de fortes réponses immunitaires par leur immunogénicité naturelle même après avoir été atténués (Draper and Heeney, 2010).

Un des autres avantages est la possibilité de combinaisons avec d'autres immunothérapies dont l'ADN. En effet, bien que l'ADN induise des réponses immunitaires efficaces, un vecteur vivant atténué peut être requis pour élever la réponse à un niveau plus protectif. La plupart des stratégies hétérologues utilisent l'ADN pour initier la réponse immunitaire et la réponse mémoire (prime) et un vecteur viral pour l'augmenter (boost) (Anderson and Schneider, 2007).

Différents types de vecteurs (Tableau 13) peuvent aussi être utilisés comme virus oncolytiques possédant un tropisme direct pour les cellules tumorales (Elsedawy and Russell, 2013) : virus de la rougeole (MV), virus de l'herpès simplex (HSV), virus de la stomatite vésiculaire (VSV).

L'utilisation du vecteur viral de la rougeole en tant qu'immunothérapie anti-cancer apparaît prometteuse de par les caractéristiques précisées ci-dessus et celles présentes dans le tableau. En effet, le vaccin rougeole est caractérisé depuis près de 30 ans, avec une expérience importante acquise lors de nombreux essais précliniques et cliniques dans le cadre (Draper and Heeney, 2010 ; Shedlock and Weiner, 2000) des maladies infectieuses (Chikungunya,

Dengue, West-Nile). En conséquence, la stratégie de vaccination d'Invectys utilisant un vecteur viral est basée sur l'utilisation du MV dans un cadre collaboratif avec l'équipe du Dr. F. Tangy (Institut Pasteur).

Vecteur viral	Avantages	Inconvénients
<b>Poxvirus</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Vaccinia Virus (VV)</b></li> <li>• <b>Modified virus Ankara (MVA)</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Facile à manipuler</li> <li>✓ Insertion de larges gènes</li> <li>✓ Immunogène</li> <li>✓ Réponse humorale et cellulaire</li> <li>✓ Absence de mutagénèse insertionnelle</li> <li>✓ MVA non-réplicatif</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Développement d'anticorps neutralisants, immunité préexistante</li> <li>✗ VV virus réplicatif</li> </ul>
<b>Avian Poxvirus</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Fowlpox</b></li> <li>• <b>Canarypox (ALVAC)</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Cycle incomplet chez les mammifères ; Incapacité à former des particules virales</li> <li>✓ Pas d'anticorps neutralisants</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Faible réponse immunitaire</li> </ul>
<b>Adenovirus (Ad)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Facile à manipuler</li> <li>✓ Réponse humorale et cellulaire</li> <li>✓ Haute expression du transgène</li> <li>✓ Large tropisme cellulaire</li> <li>✓ Absence de mutagénèse insertionnelle</li> <li>✓ Beaucoup de souches disponibles</li> <li>✓ Non réplicatif utilisé</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Récepteur spécifique (CAR) pas sur toutes les cellules cancéreuses</li> <li>✗ Anticorps neutralisants, immunité préexistante</li> <li>✗ Insertion de gènes limités</li> </ul>
<b>Virus de la rougeole (MV)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Large tropisme DC, LT, macrophage, cellule tumorale</li> <li>✓ Virus oncolytique</li> <li>✓ Absence de mutagénèse insertionnelle</li> <li>✓ Souches non-pathogènes, non contagieuses</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Contre-indiqué si patients immunodéprimés</li> <li>✗ Immunité préexistante à MV</li> <li>✗ Insertion jusqu'à 5 kb</li> <li>✗ Réplicatif</li> <li>✗ Expression du transgène limitée à la lyse de la cellule infectée</li> </ul>
<b>Virus de l'Herpès Simplex (HSV)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Facile à manipuler</li> <li>✓ Large tropisme, incluant les DCs</li> <li>✓ Virus oncolytique</li> <li>✓ Capacité pour de larges transgènes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Neurotropisme</li> <li>✗ Expression du transgène limité par lyse de la cellule cible</li> </ul>
<b>Virus de la stomatite vésiculaire (VSV)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Large tropisme dont DC</li> <li>✓ Haute expression du transgène</li> <li>✓ Absence de mutagénèse insertionnelle</li> <li>✓ Souches non-pathogènes, non contagieuses</li> <li>✓ Virus oncolytique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Potentiel neurotropisme</li> <li>✗ Insertion de gènes de taille intermédiaire</li> <li>✗ Expression du transgène limitée à la lyse de la cellule infectée</li> </ul>

**Tableau 13 : Principaux vecteurs viraux utilisés et leurs caractéristiques**

### 4.3. Virus de la rougeole et souche atténuée du vaccin

La rougeole est une maladie infantile aigüe très contagieuse qui est restreinte à l'espèce humaine et aux grands singes et se contracte par voies respiratoires. Elle reste une cause importante de décès alors qu'il existe un vaccin sûr et efficace (145 700 décès en 2013).

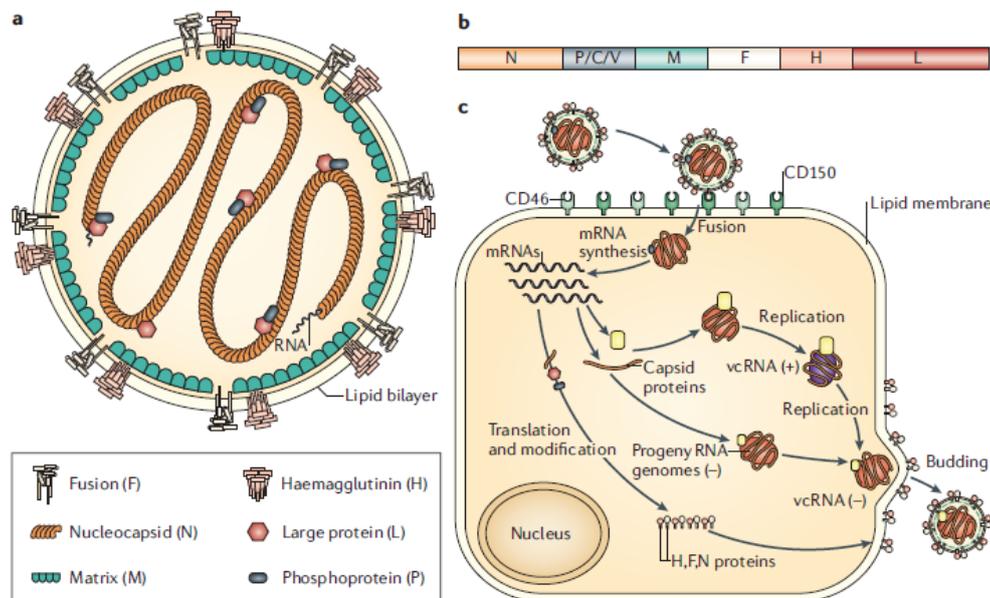
#### 4.3.1. Structure, cycle viral et souche atténuée

Le MV est sphérique, enveloppé, avec un ARN de polarité négative non-segmenté, simple-brin (*Mononegavirales*) appartenant au genre *Morbillivirus* de la famille des *Paramyxoviridae* (Figure 26). Son génome comprend 16 000 nucléotides et code pour 8 protéines. Deux des huit protéines sont non structurales (V et C) résultant d'un transcrit alternatif de l'ARN de la phosphoprotéine (P) et contribuent à la virulence et à la pathogénèse du virus en bloquant par exemple la signalisation des IFNs de type I (Takeuchi et al., 2003 ; Takeuchi et al., 2005). La protéine large (L) et la nucléoprotéine (N) forment la nucléocapside virale contenant l'ARN viral. Les protéines de matrice (M), de fusion (F) et l'hémagglutine (H) forment l'enveloppe virale avec les lipides provenant de la membrane des cellules hôtes infectées (Moss and Griffin, 2012). Le génome viral est donc composé de 6 gènes (Figure 24) séparés par des régions intergéniques contenant des régions cis-régulatrices de transcription et trois nucléotides « CUU » séparant les séquences de terminaison et d'initiation de transcription des gènes. Cette composition du génome conduit à un gradient de transcription des 6 gènes de 3' en 5' qui se traduit par l'abondance de la protéine N (3000 copies/virion), la moins abondante étant la protéine L (50 copies/virion) (Brandler et al., 2007).

Le cycle viral des paramyxovirus est entièrement cytoplasmique (Figure 26). Il commence avec l'absorption de MV par la cellule hôte à travers la liaison de la protéine H avec les récepteurs CD46, CD150 (SLAM, *signaling lymphocyte activation molecule*) et/ou Nectin-4. Ensuite, la protéine F entraîne la fusion entre la particule virale et la membrane de la cellule hôte, permettant l'entrée de l'ARN viral négatif et des protéines associées dans le cytoplasme. Ces protéines forment un complexe ribonucléoprotéique qui sert de modèle à la transcription

de l'ARNm et à la réplication du génome viral (Bankamp et al., 2011). En effet, dès qu'une quantité suffisante de protéines N est produite, la polymérase virale ne respecte plus les arrêts et transcrit la totalité du génome viral. Ceci permet de produire des molécules antigénomiques de polarité positive qui serviront de matrice pour la production des nouveaux ARN génomiques de polarité négative. La fin du cycle est caractérisée par le bourgeonnement des virions à travers la membrane cellulaire hôte.

De plus, l'infection par le MV est connue pour induire la formation de syncytia. Les cellules infectées fusionnent avec les cellules avoisinantes non-infectées formant des cellules infectées multinucléées. Ceci est un phénomène qui augmente l'efficacité de la réplication du MV (Guillerme et al., 2013).



**Figure 26 : Le virus de la rougeole**  
a) Le virus de la rougeole et ses composants, b) génome viral composé de 6 gènes, c) cycle viral  
Tirée de Moss and Griffin (2006)

La première souche du MV a été isolée chez un enfant et nommée souche Edmonston. A partir de cette souche, différentes souches atténuées du MV ont été générées par culture *in vitro* sur différents types cellulaires (Bankamp et al., 2011). La souche Schwarz a été générée en 1962 par des passages additionnels sur des cellules embryonnaires de poulet pour remplacer la souche Edmonston qui contenait des mutations et causait des problèmes de réactogénicité (Schwarz, 1962). La souche Schwarz est aujourd'hui utilisée pour vacciner les

enfants en Europe et au Brésil. L'analyse comparative des séquences entre la souche d'origine Edmonston et la souche Schwarz montre des modifications sur 42 nucléotides ce qui contribue au profil atténué de ce vaccin (Bankamp et al., 2011).

#### **4.3.2. Récepteurs**

Les récepteurs majoritaires d'entrée du MV sont assez bien définis. La souche sauvage utilise le récepteur SLAM conférant un tropisme naturel du MV pour les LTs, les LBs et les monocytes/macrophages activés. La souche vaccinale Schwarz, quant à elle, utilise majoritairement le récepteur CD46 pour entrer dans une cellule (Yanagi et al., 2006). Le CD46 est une molécule impliquée dans le blocage de la cascade du complément (stade C3) et son expression à une faible densité protège les tissus normaux des accidents d'activation du complément. Cette molécule est exprimée de façon ubiquitaire mais à un faible niveau sur les cellules nucléées sauf pour les cellules tumorales qui, pour échapper aux mécanismes de cytotoxicité liée au complément (CDC), la surexpriment (Guillerme et al., 2013). Ceci explique le tropisme naturel de vaccin Schwarz pour les cellules tumorales et donc son utilisation en tant que virus oncolytique (Achard et al., 2015).

Un autre récepteur nouvellement identifié, Nectin-4 (PVRL-4), semble être utilisé par les deux souches et joue un rôle crucial dans la transmission du virus par le tractus respiratoire (Muhlebach et al., 2011).

#### **4.3.3. Vaccins atténués : efficacité et sécurité**

Le virus de la rougeole, agent hautement contagieux, a causé des millions de morts dans le monde depuis son émergence (Guillerme et al., 2013). Une période d'incubation de 10 à 14 jours lui permet de diffuser et de se répliquer dans les cellules épithéliales, les cellules et tissus lymphoïdes ainsi que les cellules endothéliales de différents organes. La plupart des manifestations cliniques de la maladie (fièvre, éruption cutanée, conjonctivite) sont dues aux réponses immunitaires déclenchées par l'infection (Griffin, 2010). En effet, l'induction des réponses immunitaires innées permet le contrôle du virus par l'activation des NKs et par la synthèse d'IFNs de type I. Bien que ces réponses innées soient importantes, seule l'induction de réponses adaptatives cellulaires et humorales spécifiques permet l'élimination du virus et l'établissement d'une immunité à vie (Moss and Griffin, 2006).

Le vaccin vivant atténué a été distribué à des millions d'enfants dans le monde à travers des programmes d'immunisation étendus (EPI) de l'OMS. Le vaccin atténué mime l'infection naturelle et comme le virus sauvage, il induit une forte et longue immunité contre le MV après une ou deux injections et n'induit pas d'immunosuppression contrairement à la souche sauvage (Okada et al., 2001). En effet, il entraîne la production d'anticorps (IgG), l'induction précoce de CTLs spécifiques (IFN- $\gamma$ ) et de CD4 Th1 (IFN- $\gamma$  et IL-2) suivie par l'induction d'une réponse CD4 Th2 plus tardive (IL-4 et IL-13). Cette immunité persiste jusqu'à près de 30 ans après la vaccination et la mémoire immunologique induite est composée d'anticorps neutralisants et de cellules T mémoires circulantes (Brandler et al., 2007 ; Naniche et al., 2004).

En matière de sécurité, des centaines de millions de doses ont été distribuées et le risque d'un sérieux effet est de 8,4 par millions de doses distribuées. De plus, la réversion du vaccin à une forme pathogène n'a jamais été observée à l'heure actuelle (Guillerme et al., 2013). L'ensemble de ces arguments a été en faveur d'une utilisation de ce vaccin vivant atténué comme vecteur répliatif de vaccination. Ce vaccin a ainsi été modifié pour créer un vecteur recombinant par l'insertion de transgènes (procédé expliqué dans la partie Outils-Méthodes) codant pour des protéines différentes de celles du virus (Combredet et al., 2003).

Cependant, il convient de souligner que la majeure partie des adultes possède une immunité préexistante contre la rougeole, qu'elle ait été acquise après infection ou vaccination, ce qui pourrait compromettre l'utilisation d'un tel vecteur. Néanmoins, des essais cliniques menés à large échelle ont démontré qu'une revaccination induisait une augmentation du titre des anticorps neutralisants chez des enfants préalablement immunisés. Ceci implique donc la réplication du vaccin MV ainsi que l'expression de ses protéines même en présence d'une immunité préexistante (Dilraj et al., 2000 ; Dilraj et al., 2007). Une étude préclinique, réalisée sur des souris immuno-compétentes, a aussi montré que la préexistence d'anticorps neutralisants anti-MV n'inhibe pas la réplication d'un vaccin recombinant MV ainsi que l'induction de réponses cellulaires et humorales spécifiques du transgène (Knuchel et al., 2013).

De par l'ensemble de ces caractéristiques et de ces avantages, ce vecteur est à l'heure actuelle aussi bien utilisé dans la cadre des maladies infectieuses que dans le cadre du cancer. A ce

jour, 4 essais cliniques sont en cours pour le traitement du mésothéliome, du cancer ovarien (MV-CEA), du glioblastome (MV-CEA) et des myélomes multiples (MV-NIS).

Ainsi, ce vecteur est une alternative attractive pour induire des réponses spécifiques de hTERT dans le cadre de notre stratégie.

# **OBJECTIFS**



A l'heure actuelle, la plupart des immunothérapies anti-cancer spécifiques souffrent d'un impact clinique limité pour de nombreux patients, en dépit de l'induction de réponses immunitaires et de leurs succès en préclinique (Beatty and Vonderheide, 2008). En effet, le manque de stimulation efficace pour rompre la tolérance périphérique qui s'est établie durant le développement tumoral, ainsi que le développement de nombreux mécanismes d'échappement initiés par la tumeur et son microenvironnement, en lien avec l'expression des antigènes associés aux tumeurs sont les principaux obstacles responsables dans cet échec (Dunn et al., 2002 ; Kim et al., 2007). Il est donc essentiel d'induire des réponses immunitaires spécifiques contre la tumeur mais aussi d'agir contre la tolérance intrinsèque de la tumeur (Bhardwaj, 2007).

L'immunothérapie anti-tumorale est à l'heure actuelle acceptée comme composante clé des stratégies préventives ou thérapeutiques dans le traitement des cancers. Dans ce contexte, le travail de ce doctorat a été focalisé sur le développement de vaccins thérapeutiques génétiques.

Ce travail a donc porté, dans un premier temps, sur le développement d'un protocole de vaccination adapté à l'administration de nos vaccins ADN. L'immunogénicité, la fonctionnalité et l'effet anti-tumoral du vaccin INVAC-1 (vaccin ADN codant une forme inactives de hTERT) *in vivo* chez la souris, ont ensuite été évalués.

Dans un second temps, et/ou dans le but de développer des stratégies thérapeutiques combinatoires basées sur des *prime-boost* hétérologues, des constructions plasmidiques codant des protéines hTERT réarrangées, ou le vecteur viral rougeole recombinant une forme modifiée de hTERT ont été, à leur tour, évalués.

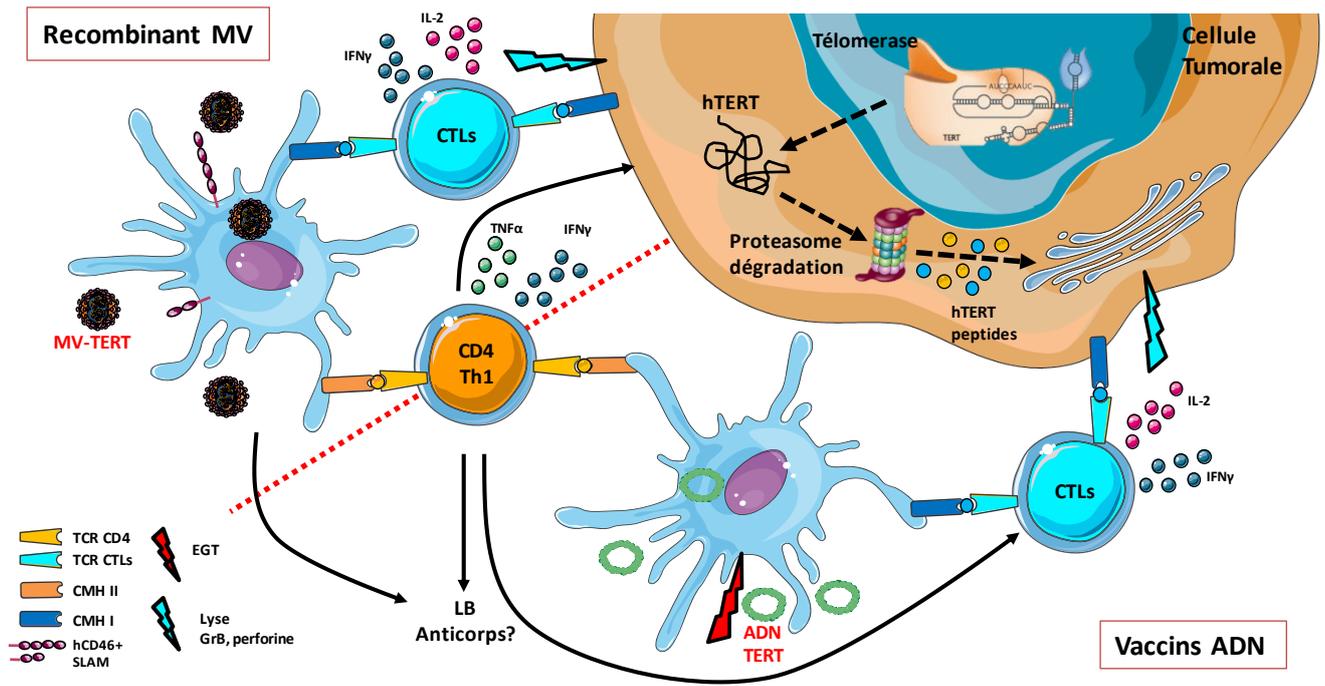


Figure 27 : Stratégies d'immunothérapies développées et évaluées par INVECTYS

# **OUTILS - METHODES**



Toutes les constructions développées et utilisées au cours de ce projet dans le cadre d'une vaccination thérapeutique anticancéreuse sont basées sur le TAA universel que représente la hTERT décrite précédemment. Pour des raisons évidentes de sécurité, liées à ses caractéristiques physiologiques et particulièrement à son utilisation clinique chez l'Homme, la hTERT a subi des modifications afin (1) d'inactiver son activité catalytique et (2) de modifier la localisation cellulaire où celle-ci s'exprime normalement.

(1) Toutes les séquences codant la hTERT présentent une délétion de 9 pb qui supprime 3 acides aminés (867-869, Valine-Acide Aspartique-Acide Aspartique ou VDD) ayant un rôle crucial au sein du site catalytique. En effet, la valine (V) influence l'incorporation des nucléotides et la fidélité de l'enzyme. Les acides aspartiques (DD) sont importants pour la chélation du nucléotide entrant dans le site catalytique. Ce triplet d'acides aminés est hautement conservé dans la famille des polymérases et une mutation sur l'un de ces acides aminés entraîne l'inactivité catalytique (Drosopoulos and Prasad, 2007).

(2) La séquence nucléotidique hTERT contenue dans les différentes constructions a aussi été délétée de 23 à 47 acides aminés de son extrémité N-terminale. Cette extrémité incluant la séquence de localisation nucléolaire (NoLS ; (Yang et al., 2002) a été remplacée par une séquence ubiquitine (Ubi). L'ensemble des protéines codées par ces séquences suit ainsi l'approche de protéine fusionnée à l'ubiquitine et la *N-end rule*, décrite par Varshavsky, par la présence d'acides aminés déstabilisants à la jonction Ubi- $\Delta$ hTERT en N-terminal (Bachmair et al., 1986 ; Varshavsky, 1996). Ces approches sont décrites pour l'augmentation de la présentation peptidique par les CMH de classe I via l'orientation rapide des protéines de fusion vers la voie de dégradation dépendante du protéasome et aussi pour l'augmentation des réponses immunitaires spécifiques contre de nombreux antigènes (Leachman et al., 2002 ; Wang et al., 2012).

# I. Vaccin ADN : constructions plasmidiques

## 1. INVAC-1 : plasmide et protéine

INVAC-1 est un plasmide de 7120 paires de bases (pb) qui encode une protéine de fusion ubiquitine humaine-TERT humaine modifiée de 1158 acides aminés (AA, brevet n° d'application PCT/EP2014/073164, déposé le 28/10/2014) construite selon les caractéristiques énoncées précédemment (Figure 29). Le transgène Ubi- $\Delta$ hTERT a été inséré dans le vecteur d'expression NTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI créé par Nature Technology Corporation (Lincoln, Nebraska) (Carnes et al., 2010). L'expression du transgène est sous contrôle d'un promoteur-intron chimérique optimisé (SV40-CMV-intron synthétique HTLV-1 R). Ce plasmide ne réplique pas dans les cellules eucaryotes et est sélectionné par un marqueur de sélection sucrose (RNA-OUT) sans antibiotique dans les cellules NTC4862 *E. coli* cells (DH5 $\alpha$  att $\lambda$ ::P5/6 6/68-RNA-IN-SacB, catR). Le RNA-OUT supprime l'expression du gène Sac B permettant la croissance des cellules contenant le plasmide au sein d'un milieu enrichi en sucrose (Figure 28) (Luke et al., 2009). Les lots GLP et GMP d'INVAC-1 ont été produits par Eurogentec (Belgique) à une concentration finale de 2 mg/mL.

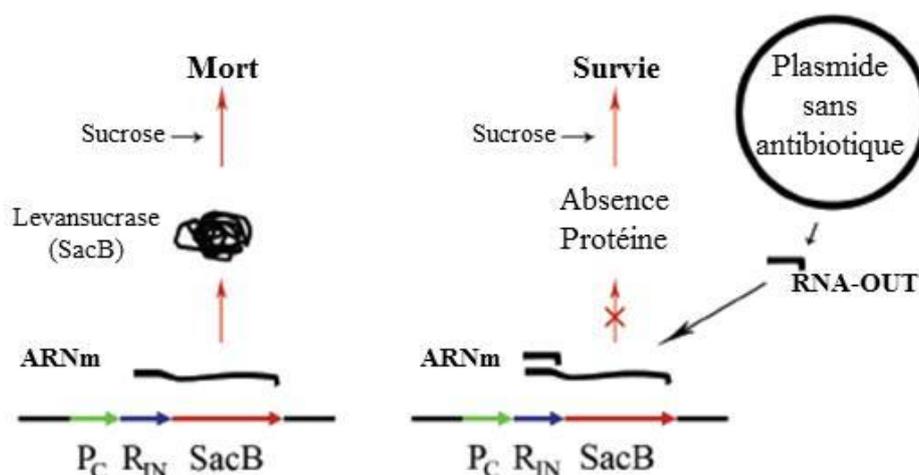


Figure 28 : Sélection du plasmide INVAC-1

La levansucrase codée par le gène SacB est exprimée dans les cellules n'ayant pas incorporé le plasmide codant le RNA-OUT. Cette enzyme toxique en présence de sucrose conduit à la mort cellulaire. Les cellules, ayant intégré le plasmide, répriment l'expression de l'enzyme par le RNA-OUT conduisant à la survie des cellules et à la sélection du plasmide.

## 2. Dérivés réarrangés d'INVAC-1 : pUTScram et pUTInv

pUTScram et pUTInv sont des plasmides d'ADN double brins d'approximativement 8,9 kilobases (kb) encodant une protéine de fusion ubiquitine humaine-TERT humaine modifiée selon les critères décrits précédemment. Les transgènes Scrambled et Inverted ont été clonés dans des vecteurs d'expression pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Carlsbad, USA) via les sites de restriction HindIII/XbaI. L'expression des deux transgènes est sous contrôle du promoteur cytomegalovirus (CMV) humain. Les plasmides sont sélectionnés via l'ampicilline et sont produits après extraction et purification à 2 mg/mL.

Afin de réaliser les séquences codant les inserts Scrambled et Inverted, la séquence hTERT modifiée (délétion VDD, remplacement de 23 AA en N-ter par Ubi) a été divisée en 10 fragments immunogènes déterminés sur la totalité de la séquence impliquant une délétion supplémentaire de 76 AA non-immunogènes (228 pb).

Fragment 1 (258 pb ; Leu24-Gly109), fragment 2 (201 pb ; Phe115-Ala181), fragment 3 (120 pb ; Trp203-Ala242), fragment 4 (117 pb; Ser255-Arg293), fragment 5 (303 pb; Pro320-Thr420), fragment 6 (312 pb; Ala423-Val526), fragment 7 (210 pb; Cys528-Gln597), fragment 8 (477 pb; Arg599-Lys757), fragment 9 (576 pb; Lys760-Ile951), fragment 10 (516 pb; Asn958-Asp1129).

Ces fragments ont été réassemblés dans l'ordre suivant (Figure 29) :

**Scrambled : 7 – 2 – 6 – 4 – 9 – 3 – 1 – 8 – 10 - 5**

**Inverted : 10 – 9 – 8 – 7 – 6 – 5 – 4 – 3 – 2 - 1**

Les fragments au sein de chaque insert sont liés par 6 résidus glycine (lien-G ; 18 pb). Un tag V5 (dérivé d'un épitope présent sur les protéines P et V du virus simien 5, SV5) a été ajouté à l'extrémité C-terminale des différents inserts afin de faciliter leur détection *in vitro*.

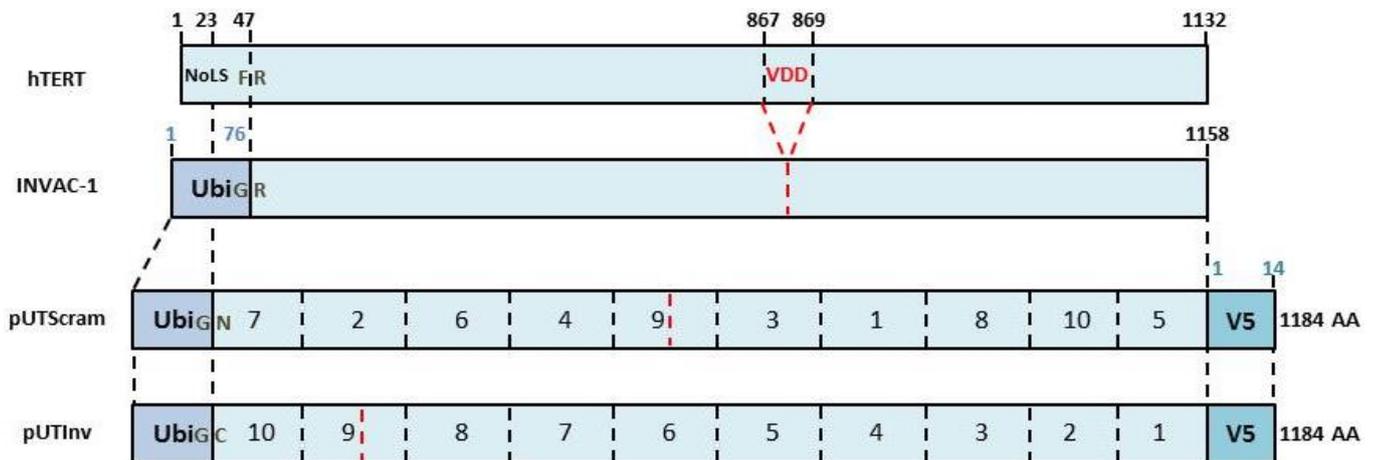


Figure 29 : Alignement schématique entre la hTERT naturelle et les protéines codées par INVAC-1, pUTScram et pUTInv

**VDD** : Déletion des AA 867-869 dans le site catalytique ; **Ubi** : ubiquitine humaine (1-76 AA); **F (Phe)**: Phenylalanine de hTERT (AA47); **G (Gly)**: glycine C-terminal de l'ubiquitine (AA76); **R (Arg)**: Arginine, premier AA de la protéine INVAC-1-hTERT (AA 77); **N (Asn)**: Asparagine, premier AA de la protéine Scrambled (AA 81); **C (Cys)**: Cysteine, premier AA de la protéine Inverted; **V5**: Tag V5 en C-terminal.

## II. Vecteur dérivé du Vaccin Rougeole :

### MV-TERT

Comme exposé en partie III, le vaccin vivant atténué rougeole a été utilisé pour vacciner des millions d'enfants. Au cours des trente dernières années, il a montré son efficacité et son innocuité. Le retour du vaccin à une forme pathogène n'a jamais été observé. Par conséquent, l'utilisation du vaccin rougeole Schwarz comme vecteur vaccinal s'avère pertinente pour les stratégies d'immunothérapie anti-cancer par rapport à d'autres vecteurs viraux (oncolytiques ou non). MV-TERT est un vecteur recombinant qui permet en plus de l'expression des particules virales de rougeole, l'expression de la protéine hTERT modifiée (déletion VDD, remplacement de 47 AA en N-ter par Ubi). La création de ce vecteur est décrite ci-après.

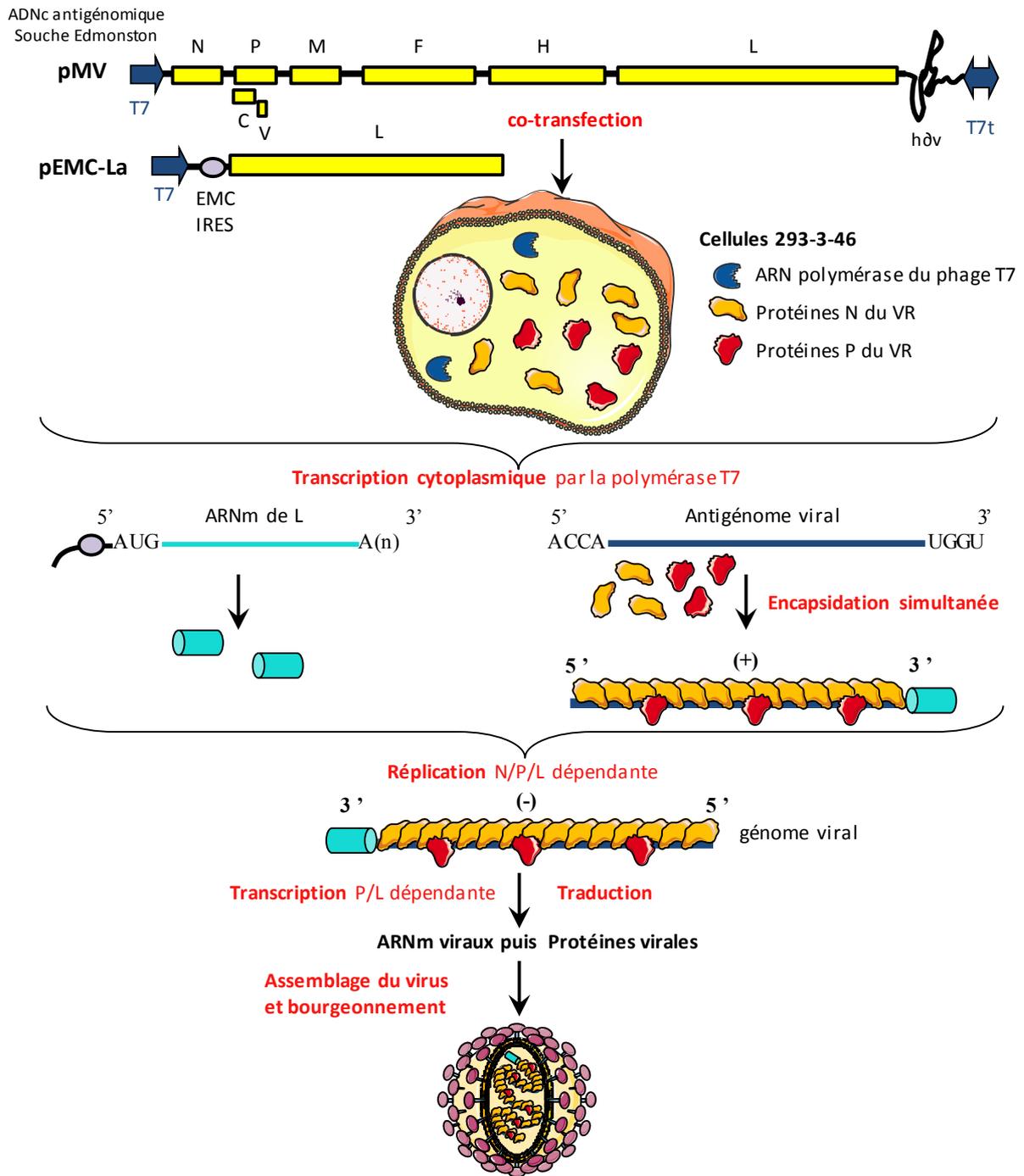
#### 1. Clonage des souches vaccinales du MV

Un travail pionnier réalisé par l'équipe de Martin Billeter (Université de Zurich) a permis l'obtention d'un ADN complémentaire (ADNc) infectieux correspondant à l'antigénome de la souche Edmonston B (EdB) du MV et l'établissement d'un système de génétique inverse

permettant la production du virus correspondant (Parks et al., 1999 ; Radecke et al., 1995). Le promoteur du phage T7 a été ajouté à cet ADNc pour permettre à la polymérase du phage T7 de transcrire l'ADNc en ARN antigénomique de polarité positive. Le plasmide contenant l'ADNc et celui codant pour la polymérase L du MV sont cotransfectés dans des cellules HEK293-3-46 exprimant de manière stable et constitutive la polymérase T7 ainsi que les protéines N et P du MV (Figure 30).

A partir de ce clone, un vecteur a été développé, capable d'exprimer de façon stable des gènes additionnels de plus de 5 000 nucléotides pendant plus de 12 passages (Lorin et al., 2004 ; Singh et al., 1999 ; Wang et al., 2001). Cette stabilité est un avantage des virus à ARN négatif. En effet, les virus à ARN positif éliminent l'expression de gènes additionnels dès les premiers cycles d'infection en culture cellulaire. Cette stabilité est aussi due à l'absence de contraintes géométriques exercées sur la taille du génome de ces virus grâce à leurs nucléocapsides hélicoïdales.

Cependant, l'ADNc utilisé pour ce vecteur provient de la souche Edmonston B qui a été passée plusieurs fois sur les cellules HeLa (Ed-Tag cDNA). Le vecteur a donc accumulé de nombreuses mutations, dont certaines affectent sa capacité à éviter la réponse antivirale innée (Devaux et al., 2011 ; Ohno et al., 2004). De plus, à cause des problèmes de réactogénicité, cette souche a été abandonnée pour la vaccination humaine en 1975 et a été remplacée par la souche Schwarz/Moraten qui est une souche certifiée et aujourd'hui utilisée en clinique : vaccins Attenuavax (Merck and Co. Inc., West point, USA), Rouvax (Aventis Pasteur, Marcy l'Etoile, France) et Priorix (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium).



**Figure 30 : Système de génétique inverse**

Production de particules infectieuses de rougeole à partir d'un ADNc de l'antigénome viral.

Le plasmide contenant l'ADNc de l'antigénome du MV (pMV) et le plasmide codant la polymérase L du MV (pEMC-La) sont cotransfectés dans les cellules HEK293-3-46 (expression de la polymérase du phage T7, de N et de P du MV). Dans le cytoplasme, la polymérase T7 synthétise l'ARN antigénomique, simultanément encapsidé par les protéines N, P, L. La polymérase du MV (P/L) entreprend la réplication virale cytoplasmique à partir de l'ARN antigénomique encapsidé. Ceci conduit à la synthèse d'un ARN génomique de polarité négative, à celle des protéines virales et au bourgeonnement du virus. T7t, T7 RNA polymerase terminator ;  $\delta$ , hepatitis delta virus ribozyme. Adaptée de Parks et al. (1999) ; Radecke et al. (1995).

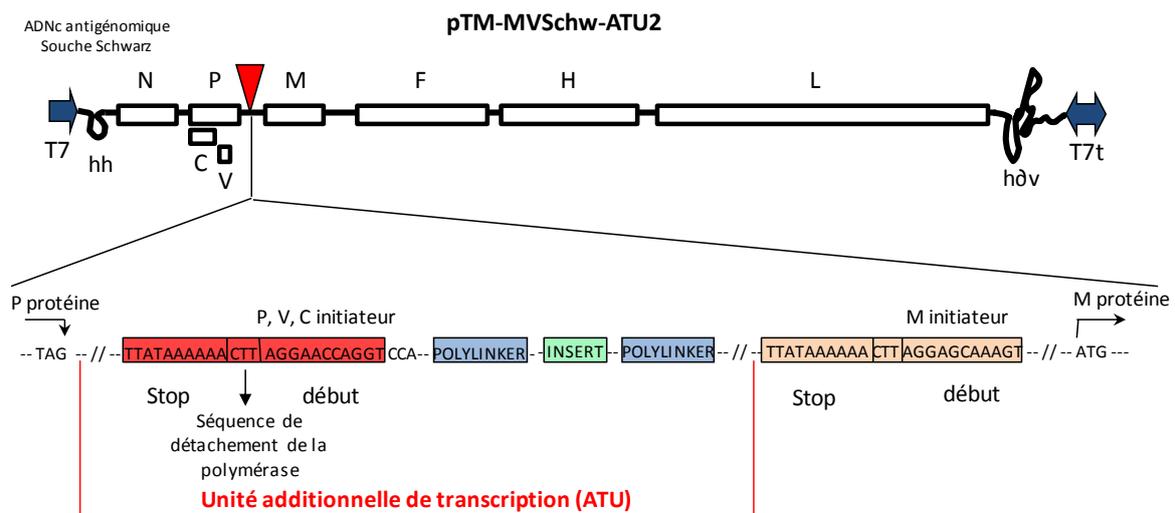
## 2. Vecteur dérivé de la Souche Schwarz et insertion d'une ATU

L'efficacité et la sûreté d'une souche atténuée étant supposées dépendre uniquement de sa séquence génomique, l'ADNc du vaccin Schwarz a été cloné à partir de particules virales purifiées d'un lot de production industrielle en utilisant des procédures optimisées pour la fidélité du clonage (Combredet et al., 2003). La séquence du clone moléculaire obtenue a été démontrée identique à celle du génome parental. L'ADNc antigénomique viral a été placé sous le contrôle du promoteur de la polymérase du phage T7 avec le motif GGG afin d'optimiser le rendement du système de génétique inverse décrit par Radecke et al. (1995). Pour faciliter le clivage de l'ARN viral aux deux extrémités, un ribozyme en tête de marteau a été inséré entre le motif GGG et le premier nucléotide viral et le ribozyme du virus de l'hépatite delta a été placé en aval de la séquence terminatrice du phage T7. Le plasmide résultant est désigné sous le nom de pTM-MVSchw. Ce plasmide a permis de produire le virus correspondant à l'aide du système de génétique inverse basé sur la cotransfection de cellules humaines trans-complémentantes (Parks et al., 1999 ; Radecke et al., 1995).

Afin d'éviter les mutations précédemment observées et l'adaptation du vaccin recombinant à des cellules non certifiées, les cellules HEK293 transfectées avec l'ADNc ont été co-cultivées avec des fibroblastes embryonnaires de poulet, cellules sur lesquelles le vaccin a été originellement sélectionné et produit. Le virus a été également produit après co-culture sur des cellules Vero (singe vert africain) très sensible au MV ou des cellules diploïdes humaines MRC5 (substrat cellulaire agréé pour la production de vaccins vivants). Aucune mutation n'a été retrouvée dans le génome entièrement séquencé par rapport à la séquence d'origine après deux passages du virus recombinant sur fibroblastes primaires de poulet. Il a aussi été démontré que la cinétique de croissance et le rendement de production du virus recombinant MVSchw étaient identiques à ceux du vaccin industriel. De plus, l'immunogénicité du virus recombinant et celle du vaccin industriel ont été comparées chez le macaque cynomolgus. L'injection sous-cutanée d'une dose standard ( $10^4$  TCID<sub>50</sub>) induit des réponses anticorps et cellulaires spécifiques de même intensité, le virus cloné a donc la même immunogénicité chez le macaque que le vaccin parental industriel (Combredet et al., 2003).

Le pTM-MVSchw a été modifié pour permettre l'expression de gènes d'intérêt par l'introduction d'unités additionnelles de transcription (ATU). Les ATUs, cassettes de clonage

multiple, ont été insérées dans le plasmide pTM-MV Schw par mutagenèse dirigée entre les gènes P et M du MV. Chaque phase de lecture du MV a une transcription successive indépendante contrôlée par son propre élément cis-actif. Les gènes additionnels insérés dans l'ATU sont contrôlés eux aussi par un élément cis-actif équivalent à celui présent dans la région intergénique N/P. Le plasmide résultant est nommé pTM-MV Schw-ATU2 (Figure 31) (Combredet et al., 2003 ; Lorin et al., 2004).



**Figure 31 : Schéma du plasmide pTM-MV Schw et de l'ATU2**

Le plasmide contenant l'ADNc antigénomique de la souche vaccinale Schwarz du MV a été modifié pour permettre l'expression de gènes étrangers. Une unité additionnelle de transcription (ATU, flèche rouge) a été insérée entre les gènes viraux P et M et contient les séquences régulatrices correspondant à celles des régions intergéniques entre les gènes N et P. Elle inclut successivement le signal de transcription du gène N, la séquence CTT de détachement de la polymérase et le signal du début de transcription du gène P. La séquence de l'insert est ajoutée en amont du signal de début de transcription du gène M pour obtenir le pTM-MV Schw-ATU2.

T7 : Promoteur de l'ARN polymérase T7 ; hh : ribozyme en tête de marteau (hammerhead) ; hδv : ribozyme du virus de l'hépatite delta ; T7t : terminateur de l'ARN polymérase T7.

### 3. Insertion du transgène Ubi- $\Delta$ hTERT-Flu-V5 au sein de l'ATU

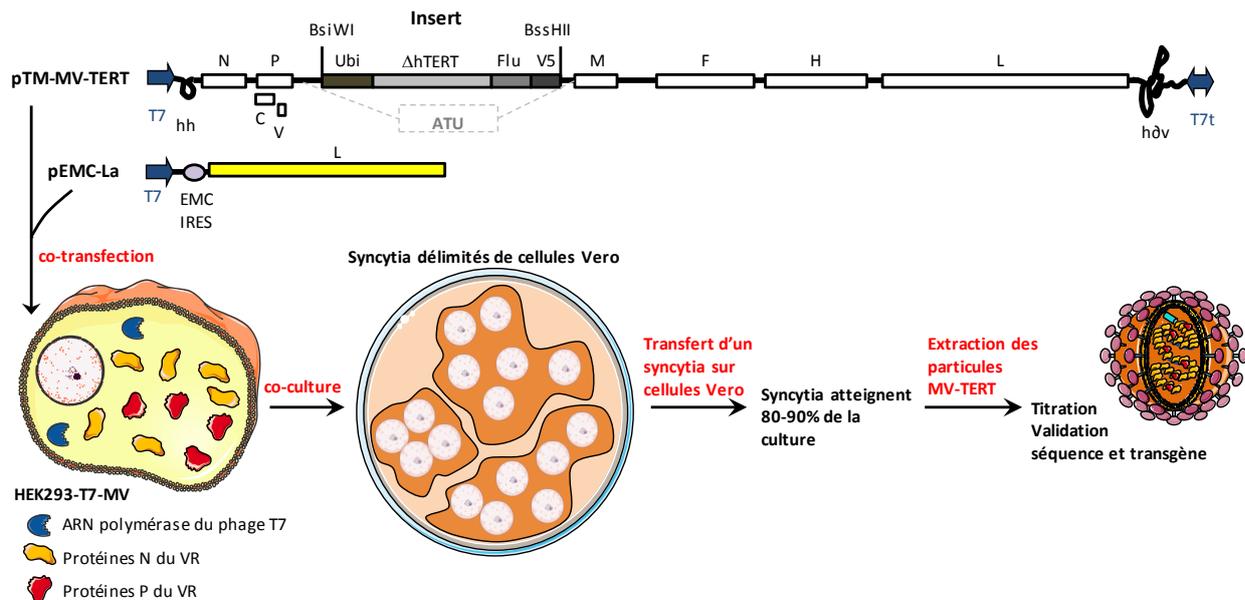
Le transgène Ubi- $\Delta$ hTERT-Flu-V5 encode une forme modifiée de la hTERT fusionnée à l'ubiquitine selon les critères décrits précédemment (délétion VDD, remplacement de 47 AA en N-ter par Ubi). Un épitope de la grippe restreint à HLA-A\*0201 et un tag V5 ont été ajoutés à l'extrémité C-terminale de la protéine de fusion dans le but de faciliter la caractérisation de ce vecteur.

La séquence d'ADNc du transgène a été sous-clonée via les sites BsiWI/BssHII sur le pTM-MV Schw-ATU2. Le plasmide résultant est désigné pTM-MV-TERT (Figure 32). La séquence du transgène inséré respecte la « règle des six » dans laquelle le nombre de nucléotides totaux du génome du MV doit être un multiple de six afin de permettre une répllication optimale du vecteur.

### 4. Vecteur vaccinal MV-TERT obtenu à partir du pTM-MV-TERT

Afin de produire le virus recombinant MV-TERT correspondant au plasmide pTM-MV-TERT, les cellules HEK293-T7-MV, exprimant stablement l'ARN polymérase T7 ainsi que les protéines N et P du MV, ont été cotransfectées avec 5  $\mu$ g de pTM-MV-TERT et 20 ng d'un plasmide codant la L polymérase du MV (pEMC-La) en utilisant du phosphate de calcium. Après différentes incubations (37°C sur la nuit suivie d'un choc thermique de 3h à 43°C puis 2 jours à 37°C), les cellules HEK293-T7-MV transfectées ont été transférées sur un tapis de cellules Vero et incubées à 37°C. Des syncytia se forment suite à l'infection, les syncytia bien délimités sont isolés et transférés sur une nouvelle couche de cellules Vero pour réaliser l'amplification du virus. Lorsque les syncytia représentent 80 à 90% de la culture, les virus sont récupérés par grattage des cellules et des cycles congélation-décongélation (Figure 32).

Le titre viral déterminé par dilution limite sur les cellules Vero est calculé en utilisant la méthode de Kärber et est exprimé en TCID<sub>50</sub>/mL (Kärber, 1931).



**Figure 32 : Schéma de production du virus recombinant MV-TERT à partir du pTM-MV-TERT**

Le plasmide pTM-MV-TERT contient dans l'ATU2 une séquence nucléotidique encodant une protéine de fusion ubiquitine- $\Delta$ hTERT-Flu-V5. La protéine obtenue possède les mêmes caractéristiques que la protéine fusionnée INVAC-1, à savoir la délétion du NoLS (47 AA) remplacée par l'ubiquitine et la délétion VDD au sein du site catalytique. Elle possède en plus, une fusion avec un épitope de la grippe restreint HLA-A\*0201 et le tag V5. T7 : Promoteur de l'ARN polymérase T7 ; hh : ribozyme en tête de marteau (hammerhead) ; h $\delta$ v : ribozyme du virus de l'hépatite delta ; T7t : terminateur de l'ARN polymérase T7.

Le pTM-MV-TERT et le plasmide codant la polymérase L du MV (pEMC-La) sont cotransfectés dans les cellules HEK293-T7-MV (expression de la polymérase du phage T7, de N et de P du MV). Comme décrit précédemment, ce procédé conduit à la synthèse d'un ARN génomique de polarité négative, à celle des protéines virales et au bourgeonnement du virus recombinant MV-TERT. Les virus MV-TERT entraînent la formation de syncytia sur les cellules Vero et après deux passages sur ces cellules les virus sont récupérés et titrés.

### III. Animaux transgéniques

Différents modèles de souris transgéniques ont été utilisés pour leur capacité à exprimer des molécules de CMH humains afin de démontrer que ces vaccins couvrent toute la diversité des molécules CMH existante chez l'homme. Les modèles transgéniques murins spécifiques au vecteur recombinant MV expriment le CD46 humain, récepteur spécifique du virus MV, n'expriment plus le récepteur de l'IFN de type I et peuvent exprimer différentes molécules de CMH (murins ou humains).

#### **Lignées transgéniques utilisées dans le cadre de la vaccination ADN**

Les souris transgéniques **HLA-B7** expriment les domaines  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  de la molécule humaine HLA-B\*0702 et le domaine  $\alpha 3$  de la molécule murine H2-D. Ces souris n'expriment pas les molécules murines H2-Kb et H2-Db (Rohrlich et al., 2003)

Les souris transgéniques **HLA-A2/DR1** expriment une chaîne chimérique des domaines  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  de la molécule humaine HLA-A\*0201 et le domaine  $\alpha 3$  de la molécule murine H2-D lié à son extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale de la  $\beta 2$ -microglobuline humaine. Elles expriment les molécules humaines HLA-DR $\beta 1$ \*0101 et HLA-DR $\alpha$ \*0101 et sont aussi dépourvues (Knock-out) des gènes murins H2-Db, H2-Kb et H2-IAb (Pajot et al., 2004).

#### **Lignées transgéniques utilisées pour les immunisations avec le vecteur recombinant rougeole**

Les rongeurs tels que les souris conventionnelles ne sont pas sensibles à une infection par la rougeole. En effet, elles ne possèdent ni le CD46, ni le CD150 (SLAM) ou encore nectine-4 (PVRL-4), récepteurs d'entrée du virus (décrit dans le Contexte Scientifique-partie III). En conséquence, depuis la fin des années 1990, pour étudier l'infection rougeole dans les modèles murins, des souris transgéniques exprimant de façon ubiquitaire le hCD46 ont été générées. Néanmoins, ces modèles se sont avérés moins sensibles au virus qu'attendu. En effet, les cellules CD46<sup>+</sup> permettaient l'entrée, la réplication et la transcription du virus avec plus ou moins d'efficacité indiquant la présence de mécanismes limitant l'infection (Horvat et al., 1996). Sachant que les IFNs de type I, représentant la première ligne de défense antivirale,

contrôlent la réplication du virus chez l'homme (Leopardi et al., 1992), des souris transgéniques hCD46 ont été mutées pour le récepteur aux IFNs type I afin d'être plus sensibles à l'infection (Mrkic et al., 1998).

La lignée **IFNAR/CD46** provient d'un croisement entre une souris FVB transgénique hCD46<sup>+/-</sup> (Yannoutsos et al., 1996) et une souris 129sv knock-out (KO) IFN $\alpha$ / $\beta$ R (Muller et al., 1994).

La lignée **HHD/IFNAR/CD46** est le résultat d'un croisement entre les souris IFNAR/CD46 décrites ci-dessus et les souris HHD<sup>+</sup> KO H2-Db<sup>-/-</sup>  $\beta$ 2m<sup>-/-</sup> (Pascolo et al., 1997). Ces souris, en plus d'être *knock-out* (KO) pour le récepteur aux IFNs type I, d'exprimer le CD46 humain, expriment aussi une chaîne chimérique des domaines  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2 de la molécule humaine HLA-A\*0201 et le domaine  $\alpha$ 3 de la molécule murine H2-D lié à son extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale de la  $\beta$ 2-microglobuline humaine.

## IV. Epitopes CD4 et CD8 spécifiques de hTERT

Comme la plupart des antigènes associés aux tumeurs, la hTERT est un antigène du soi et par conséquent les lymphocytes avec un complexe CMH/peptide hTERT de haute affinité ont normalement été éliminés lors de la sélection thymique négative, réduisant ainsi un potentiel répertoire de LT précurseurs. Cependant, des réponses CD8 anti-hTERT spécifiques naturelles ont été observées chez des patients cancéreux et chez des individus sains. Ces réponses, soulignant l'existence de LT précurseurs, ont été démontrées par une immunisation *in vitro* avec des peptides hTERT restreints à HLA-A\*0201 (Zanetti et al., 2005). Par conséquent, l'identification de peptides antigéniques tumoraux reconnus par les LT CD4 et CD8 permettant l'induction d'efficace réponse immunitaire est primordiale pour le développement de vaccins prophylactiques ou thérapeutiques ainsi que pour évaluer leur immunogénicité *in vitro* ou *in vivo* dans des modèles adaptés.

Les peptides utilisés au cours de ce projet (Tableau 14), nous permettent d'évaluer chez la souris (conventionnelle ou transgénique pour HLA) l'immunogénicité de nos candidats vaccins. Ils ont été identifiés par une stratégie prédictive ou d'immunologie inverse (Iurescia

et al., 2012). L'élaboration des premiers algorithmes pour la prédiction de peptides potentiellement immunogènes est basée sur la découverte de résidus spécifiques conservés à des positions particulières dans les peptides capables de se lier à différentes allèles de CMH (Rotzschke et al., 1991). La prédiction de peptides se liant aux CMH de classe I est souvent plus exacte que celle des peptides se liant aux CMH de classe II. L'analyse de leurs séquences est souvent plus complexe due à leur plus grande taille, 9 à 20 résidus contre 8 à 10 résidus pour les peptides CMH classe I et plusieurs peptides obtenus possèdent souvent le même « cœur » de séquence. La combinaison de différentes approches prédictives a permis la génération de nouveaux outils immuno-informatiques plus précis (Deluca and Blasczyk, 2007).

Les prédictions que nous avons réalisées sont donc basées sur plusieurs critères tels que l'affinité de liaison du peptide au CMH (Syfpeithi, <http://www.syfpeithi.de>), le temps de dissociation du complexe peptide/CMH (BIMAS, <http://www-bimas.cit.nih.gov>), le clivage protéasomal et la voie de transport TAP (NetMHCpan, SMM..., <http://tools.immuneepitope.org/main/tcell/>).

Nous avons ainsi pu déterminer des épitopes sur hTERT et mTERT pour les CMH murins H2 (C57BL/6JRj : H2-K/Db et H2-IAb ; BALB/cJRj : H2-K/Dd) et pour le CMH humain HLA-A\*0201 qui ont été évalués *in vivo* chez la souris pour leur capacité à stimuler des lymphocytes activés par la vaccination. Nous avons aussi utilisé d'autres épitopes T CD8 dérivés de hTERT restreints à HLA-A\*0201 (Hernandez et al., 2002 ; Minev et al., 2000) et HLA-B\*0702 (Adotevi et al., 2006 ; Cortez-Gonzalez et al., 2006) et des épitopes T CD4 restreints à HLA-DRβ\*0101 (Godet et al., 2012) déjà décrits par ces différentes approches (Tableau 14).

Peptide	Sequence	CMH	Numéroté sur	Souche souris
p429	HAQCPYGVL	H2-Kb	Ubi-ΔhTERT (INVAC-1)	C57BL/6 IFNAR/CD46
p1034	QA YRFHACVL			
p660	RPIVNMDYV	H2-Db		
p1021	QTVCTNIYKI			
p85	VCVPWDARPPPAAPS	H2-IAb	Ubi-ΔhTERT (INVAC-1)	IFNAR/CD46
p86	CVPWDARPPPAAPSF			
p87	VPWDARPPPAAPSF			
p329	GRQHHA GPPSTSRPP			
p1080	MSLGA KGAA GPLPSE			
p1082	LGAKGAA GPLPSEA V			
p1137	TLTALEAAANPALPS			
p1138	LTALEAAANPALPSD			
p196	AYQVCGPPL	H2-Kd	Ubi-ΔhTERT (INVAC-1)	BALB/c
p414	RYWQMRPL			
p853	SYVQCQGI			
p114	TYVPLLGSL			
p277 (Adotevi et al., 2006)	RPAEEATSL	HLA-B*0702	hTERT	HLA-B7
p351 (Adotevi et al., 2006)	RPSLTGARRL			
p1123 (Cortez-Gonzalez et al., 2006)	LPSDFKIL			
p181	LLARCALFVL		Ubi-ΔhTERT (INVAC-1)	HLA-A2/DR1
p576	WLMSVYVVEL			
p801	YMRQFVAHL			
p959	LLDTRTLEV			
p540 (Hernandez et al., 2002)	ILAKFLHWL	HLA-A*0201		
pY572 (Hernandez et al., 2002)	YLFFYRKS V			
pY988	YLQVNSLQTV		hTERT	HHD/IFNAR/CD46
UCP2.1 (Dosset et al., 2012)	SVWSKLQSI			
UCP4.1 (Dosset et al., 2012)	SLCYSILKA			
UCP2 (Godet et al., 2012)	KSVWSKLQSIGIRQH			
UCP3 (Godet et al., 2012)	GTA FVQMPAHGLFPW	HLA-DRβ*0101	hTERT	HLA-A2/DR1
UCP4 (Godet et al., 2012)	SLCYSILKAKNAGMS			

**Tableau 14 : Listes des peptides identifiés et utilisés pour évaluer l'immunogénicité des vaccins hTERT**

L'utilisation des logiciels de prédiction épitopiques sur toutes les allèles disponibles de CMH humains, a aussi permis de déterminer et de délimiter les différents blocs immunogènes constituant les constructions pUTScram et pUTInv citées dans le point I.

# **RESULTATS**



# I. Développement d'immunothérapies basées sur la vaccination ADN

Dans cette partie, nous aborderons dans un premier temps la stratégie d'immunothérapie active anti-tumorale basée sur INVAC-1, premier vaccin ADN d'Invectys codant le TAA universel hTERT (Article #2) et la mise au point d'un protocole d'immunisation reposant sur une vaccination intradermique combinée à l'application de champs électriques, procédure EGT (Article #1). Dans un second axe, le développement et la caractérisation de deux dérivés réarrangés d'INVAC-1 seront présentés.

## 1. Vaccin INVAC-1 et procédure EGT optimisée (article #1 & #2)

### 1.1. ARTICLE #1

#### **Optimization of a gene electrotransfer procedure for efficient intradermal immunization with an hTERT-based DNA vaccine in mice**

Christophe Y Calvet<sup>1,2,3</sup>, Jessie Thalmensi<sup>4</sup>, Christelle Liard<sup>4</sup>, Elodie Pliquet<sup>4</sup>, Thomas Bestetti<sup>4</sup>, Thierry Huet<sup>4</sup>, Pierre Langlade-Demoyen<sup>4</sup> and Lluis M Mir<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Univ Paris-Sud, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, Villejuif, France;

<sup>2</sup>CNRS, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, Villejuif, France;

<sup>3</sup>Gustave Roussy, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, Villejuif, France;

<sup>4</sup>Invectys, Pasteur BioTop, Paris, France

Molecular Therapy — Methods & Clinical Development (2014) 1, 14045;  
doi:10.1038/mtm.2014.45; published online 24 September 2014

**But:**

Développer un protocole de vaccination adapté aux caractéristiques du produit INVAC-1 en collaboration avec le laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses (Gustave Roussy) du Pr. L. M Mir.

**Méthode :**

Cette collaboration a permis de mettre au point une procédure d'EGT dans le but d'obtenir des réponses immunitaires optimales spécifiques de la hTERT dans le derme (tissu cible). Différents protocoles de vaccination ont été évalués via l'expression d'un transgène codant la luciférase (suivi en bioluminescence) et via l'induction de réponses immunitaires cytotoxiques spécifiques de hTERT (ELISpot IFN- $\gamma$  et test de lyse *in vivo*).

Ces protocoles ont été réalisés avec ou sans EGT ; avec (1) des électrodes non-invasives (deux plaques métalliques parallèles ; épaisseur 1 mm ; écartement 5 mm) ou (2) invasives (deux rangées de quatre longues aiguilles ; écartement 4 mm ; ou deux rangées de trois petites aiguilles ; écartement 4 mm) et avec des paramètres impliquant des variations de champs électriques pour le HV (*high voltage*) et le LV (*low voltage*).

**Résultats :**

L'EGT sans optimisation des paramètres initialement décrits pour le derme entraîne une expression significative du transgène au site d'injection et permet l'induction d'une réponse CD8 spécifique de hTERT. Parmi, les trois types d'électrodes testées, nous avons démontré que l'électrode parallèle non-invasive permettait d'obtenir une réponse significative spécifique de hTERT dans le derme (médiane spots # 140) comparée aux deux autres types d'électrodes invasives (médiane spots entre 30 et 60).

Parmi les différentes combinaisons HV-LV testées, nous avons observé que les combinaisons HV-LV de 1400 V/cm + 140 V/cm ou 1400 V/cm + 180 V/cm induisaient une forte expression de luciférase (pCMV-Luc) dans le derme et la génération significative de LTs CD8 spécifiques de hTERT sécrétant de l'IFN- $\gamma$  (médiane spots respectives # 272,6 ou 344,2), en comparaison avec les souris ayant reçu PBS + EGT (médiane spots # 0).

Cependant, dû à l'électrode choisie, à son écartement et au marquage CE du Cliniporator<sup>®</sup>, le HV ne peut pas dépasser 1250 V/cm. L'immunogénicité et la cytotoxicité de la réponse induite par INVAC-1 ont donc été à nouveau évaluées avec des paramètres de 1250 V/cm + 180 V/cm en comparaison des 1400 V/cm + 180 V/cm. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux HV.

### **Conclusions:**

Comme précisé dans l'introduction, l'ADN étant faiblement immunogène, nous avons choisi de combiner la vaccination intradermique avec la technique EGT. Ainsi dans le cadre d'un travail collaboratif, nous avons optimisé une procédure d'EGT afin d'obtenir d'efficaces réponses immunitaires suite à l'immunisation avec INVAC-1 + EGT. Cette procédure optimisée a été utilisée, par la suite, pour toutes les immunisations avec le vaccin INVAC-1 ainsi que pour les vaccinations avec les constructions réarrangées Scrambled et Inverted (décrites en I.0 de ce chapitre Résultats).

ARTICLE

# Optimization of a gene electrotransfer procedure for efficient intradermal immunization with an *hTERT*-based DNA vaccine in mice

Christophe Y Calvet<sup>1,2,3</sup>, Jessie Thalmensi<sup>4</sup>, Christelle Liard<sup>4</sup>, Elodie Pliquet<sup>4</sup>, Thomas Bestetti<sup>4</sup>, Thierry Huet<sup>4</sup>, Pierre Langlade-Demoyen<sup>4</sup> and Luis M Mir<sup>1,2,3</sup>

DNA vaccination consists in administering an antigen-encoding plasmid in order to trigger a specific immune response. This specific vaccine strategy is of particular interest to fight against various infectious diseases and cancer. Gene electrotransfer is the most efficient and safest non-viral gene transfer procedure and specific electrical parameters have been developed for several target tissues. Here, a gene electrotransfer protocol into the skin has been optimized in mice for efficient intradermal immunization against the well-known telomerase tumor antigen. First, the *luciferase* reporter gene was used to evaluate gene electrotransfer efficiency into the skin as a function of the electrical parameters and electrodes, either non-invasive or invasive. In a second time, these parameters were tested for their potency to generate specific cellular CD8 immune responses against telomerase epitopes. These CD8 T-cells were fully functional as they secreted IFN $\gamma$  and were endowed with specific cytotoxic activity towards target cells. This simple and optimized procedure for efficient gene electrotransfer into the skin using the telomerase antigen is to be used in cancer patients for the phase 1 clinical evaluation of a therapeutic cancer DNA vaccine called INVAC-1.

*Molecular Therapy — Methods & Clinical Development* (2014) **1**, 14045; doi:10.1038/mtm.2014.45; published online 24 September 2014

## INTRODUCTION

*In vivo* gene electrotransfer (EGT)<sup>1,2</sup> possesses promising applications in the field of DNA vaccination as a cost-saving and practical alternative to peptide-based and viral vector-based immunization.<sup>3</sup>

In order to induce strong and specific cellular and humoral immune response triggered by DNA vaccination, electric pulses (EP) delivery has to be performed using a tissue-specific procedure that enables the effective EGT. First, DNA has to be brought close to the target cells by injecting it at the expected site of vaccination and second, EP are delivered to transfer the DNA into the cell. Electrotransfer is a multistep process that relies on two different effects of the EP: the cell membrane permeabilization and the electrophoretic transport of the nucleic acids towards and/or across the plasma membrane.<sup>4</sup> Cell membrane permeabilization can be achieved using one or several short (about 100 of microseconds) and intense (about 1,000 volts per centimeter) pulses, called high voltage (HV) pulses, that reversibly permeabilize the cell membrane. A defined lag time later, electrophoretic movement of the DNA is achieved by the application of one or several long (about several hundred of milliseconds) and less intense (about 100 volts per centimeter) pulses, called low voltage (LV) pulses. These pulses are intended to drive the DNA molecules towards the electropermeabilized cells.<sup>5</sup>

Different target tissues are under investigation for efficient vaccination using the EGT strategy. Among them skin tissue and particularly the intradermal (ID) route is regaining interest. Some reasons include the ease of accessibility, the large surface available for the treatment, the ease of histological and clinical evaluation and the presence of numerous antigen-presenting cells (APCs).<sup>2,6</sup> Indeed, skin APCs are capable of efficiently processing the antigens of interest, and then migrate to secondary lymphoid organs to present the antigens onto MHC class I and II molecules in order to prime naive or memory CD8 and CD4 T-cells, respectively. This will generate specific cellular immune responses which are of real interest to fight cancer.<sup>7-9</sup>

Cancer DNA vaccines are intended to break immune tolerance against tumor-specific or tumor-associated antigens.<sup>10</sup> Thus, they aim at generating a pool of antigen-specific effector and memory T-cells and B-cells which will migrate to the tumor site and contribute to tumor destruction *via* several effector mechanisms such as direct cytotoxic activity and cytokines secretion.<sup>11</sup> In the case of cancer vaccines, the stimulation of tumor-specific T-cell response possesses several theoretical advantages. First, T-cells can home into antigen-expressing tumor deposits, no matter where they are located in the body, even in deep tissue beds.<sup>12</sup> Moreover, among immune cells that are relevant in antitumor immune responses, CD8 cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) have been identified as the

The first two authors contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Univ Paris-Sud, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, Villejuif, France; <sup>2</sup>CNRS, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, Villejuif, France; <sup>3</sup>Gustave Roussy, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, Villejuif, France; <sup>4</sup>Invectys, Pasteur BioTop, Paris, France. Correspondence: LM Mir (luis.mir@gustaveroussy.fr)

Received 14 May 2014; accepted 11 July 2014

most powerful effectors,<sup>9</sup> as are Th1 cytokines such as IFN $\gamma$ .<sup>11</sup> As a consequence, an efficient cancer vaccine should target class I MHC-restricted peptides derived from tumor antigens, in order to generate antitumor CTLs, which will exhibit cytolytic activity towards tumor cells. Thus, one of the ultimate goals of an efficient cancer DNA vaccine combined with EGT technology must be the generation of a strong cellular CD8 immune response against the tumor antigen encoded by the plasmid of interest.

In muscles, a large number of electrical parameters have been explored, including the combinations of HV and LV pulses which have been finely tuned to obtain safe and efficient EGT.<sup>1,4,13–15</sup> In skin, several kinds of electrodes and EP have been explored<sup>1,2</sup> but the combinations of HV and LV pulses after ID DNA injection have been analyzed only in a few studies.<sup>16–18</sup> To our knowledge, immune responses against an antigen of interest have only been monitored by Roos *et al.*<sup>19</sup> Therefore, in the present study, we have investigated the impact of different EGT parameters after ID administration of a DNA. First, a generic approach was set up using a *luciferase*-encoding plasmid in order to determine the best EGT parameters. Second, these latter were tested in a CD8 response-monitoring DNA vaccination model using the INVAC-1 plasmid that encodes a modified form of the human telomerase reverse transcriptase gene (*hTERT*). Telomerase is a well-known tumor antigen overexpressed in 85% of human cancers and is consequently of great interest for vaccination purposes against cancer.<sup>20,21</sup>

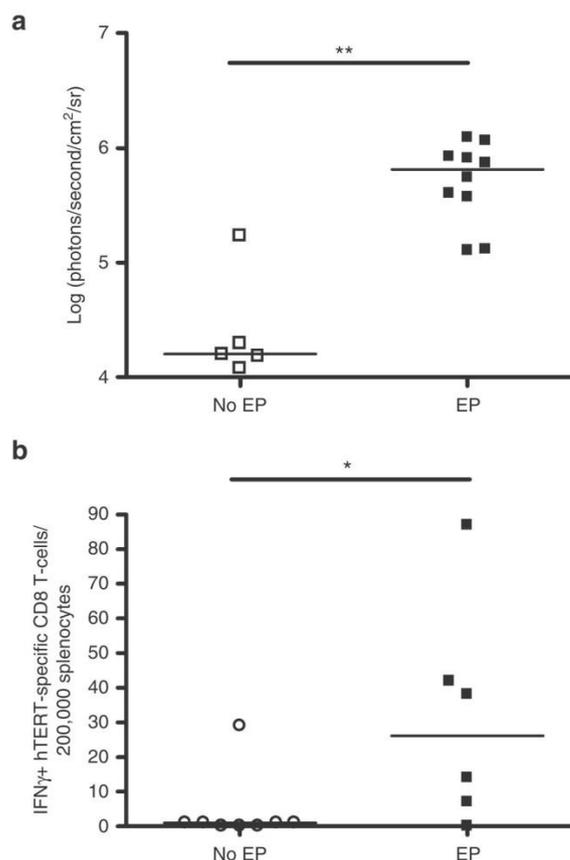
## RESULTS

Gene electrotransfer in the dermis achieves high *in vivo* transgene expression and the induction of hTERT-specific CD8 T-cells

C57BL/6J mice were injected intradermally on both flanks with either pCMV-luc (encoding *luciferase*) or INVAC-1 (encoding a modified form of *hTERT*) plasmids, followed or not by the application of EP (1 HV pulse of 1,000 V/cm and of 100  $\mu$ s followed 1,000 ms later by 1 LV pulse of 140 V/cm and of 400 ms).<sup>1</sup> Erythema was observed neither after mice shaving nor during or after the EGT procedure. Two parameters were measured after EGT according to the plasmid used: the *luciferase* expression 48 hours after EGT of pCMV-luc and the frequency of the IFN $\gamma$ <sup>+</sup> hTERT-specific CD8 T-cells 14 days after EGT of INVAC-1. Both the *luciferase* expression (Figure 1a) and the frequency of IFN $\gamma$ <sup>+</sup> hTERT-specific CD8 T-cells (Figure 1b) were significantly increased when EP were applied directly after ID DNA injection into the dermis ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively), in comparison with animals which received ID DNA injection without EP. Thus, electrotransfer is essential to reach significant levels of *luciferase* expression after ID injection of pCMV-luc and to induce significant levels of hTERT-specific CD8 T-cell responses after immunization with an ID injection of INVAC-1.

Determination of the best electrodes for efficient gene electrotransfer in the dermis and generation of intense CD8 immune responses

Different types of electrodes can be used for EGT in the skin.<sup>2</sup> Here, three different electrodes (plate electrodes, finger electrodes and needle electrodes) were tested in order to determine which one was the most suitable for efficient EGT and for the generation of an intense specific cellular immune response in mice. Actually, the EP delivered using invasive needle electrodes or the non-invasive plate electrodes significantly enhanced *luciferase* expression in C57BL/6J mice compared to the animals which received the plasmid without EP ( $P < 0.05$  and  $P < 0.001$ , respectively) (Figure 2a). However, there was a better homogeneity in the response for the



**Figure 1** Comparison of pCMV-luc gene transfer into the dermis and INVAC-1-mediated ID vaccination efficiencies with or without EP using plate electrodes. **(a)** Representation of bioluminescence intensities in C57BL/6J mice 2 days after pCMV-luc ID injection followed or not by EP,  $n = 5$  mice for pCMV-luc ID injection alone,  $n = 10$  (from 5 mice, 2 treatments per mouse) for pCMV-luc ID injection+EP. **(b)** Frequency of hTERT-specific IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8 T-cells detected in C57BL/6J mice vaccinated 14 days before with 25  $\mu$ g of INVAC-1 followed or not by EP,  $n = 8$  both for INVAC-1 ID injection alone or  $n = 6$  for INVAC-1 ID injection+EP. Bars represent median values, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Mann–Whitney–Wilcoxon test.

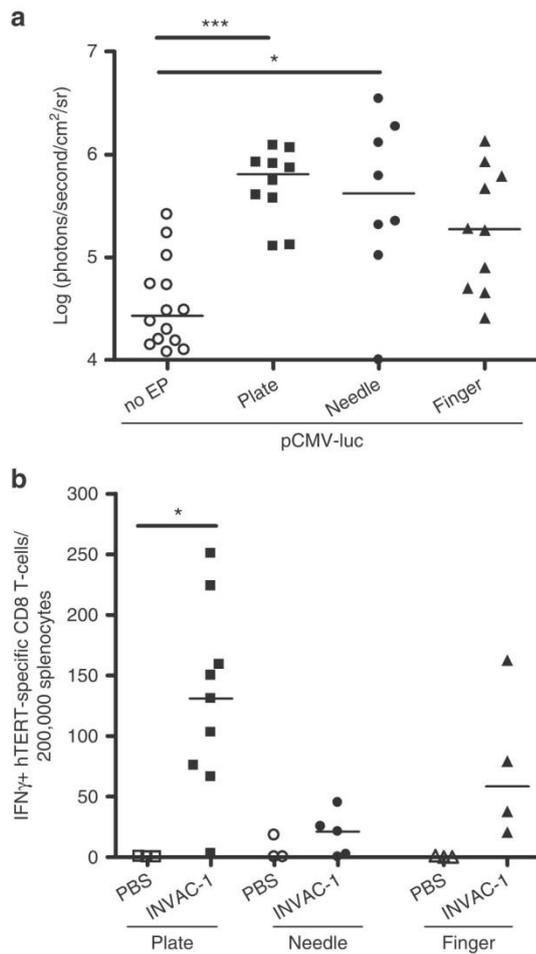
group of mice in which the gene electrotransfer was performed with plate electrodes. By contrast, results were not statistically significant when invasive finger electrodes were used.

Similar results were obtained in immunogenicity studies in HLA-B7 mice. The highest median frequency of IFN $\gamma$ <sup>+</sup> specific CD8 T-cells was obtained when plate electrodes were used in mice vaccinated using EGT of INVAC-1 injected *via* the ID route. This difference was statistically significant in comparison with control group in which a phosphate-buffered saline (PBS) injection followed by EP application was performed ( $P < 0.05$ ) (Figure 2b).

In summary, plate electrodes displayed the best ability to electrotransfer both pCMV-luc to produce luciferase and INVAC-1 to generate significant levels of hTERT-specific CD8 T-cells.

Localization of luciferase after ID injection followed by gene electrotransfer

EGT is known to be very efficient in muscles.<sup>1</sup> In order to make sure that *luciferase* was only electrotransferred into the skin after an ID injection of pCMV-luc, a skin flap was opened in the flank of C57BL/6J mice at the site of the treatment. The bioluminescence for both the skin flap and for the underlying muscles was



**Figure 2** Choice of the best electrodes for pCMV-luc electrotransfer into the dermis and INVAC-1-mediated ID vaccination. **(a)** Representation of bioluminescence intensities 2 days after pCMV-luc electrotransfer in C57BL/6J mice using the three types of electrodes,  $n = 14$  mice for pCMV-luc ID injection alone,  $n = 8-10$  (from four to five mice, two treatments per mouse) for pCMV-luc ID injection+EP. **(b)** Frequency of hTERT-specific  $\text{IFN}\gamma^+$  CD8 T-cells detected in HLA-B7 mice vaccinated intradermally 14 days before with INVAC-1 using the three types of electrodes,  $n = 3$  mice for PBS immunization control and  $n = 4-9$  mice for INVAC-1-mediated immunization. Bars represent median values,  $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$ , Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test.

measured 4 days after EGT performed with the plate electrodes. We confirmed that the transgene expression occurred only in the skin and that no expression was detected in the underlying muscles (Figure 3).

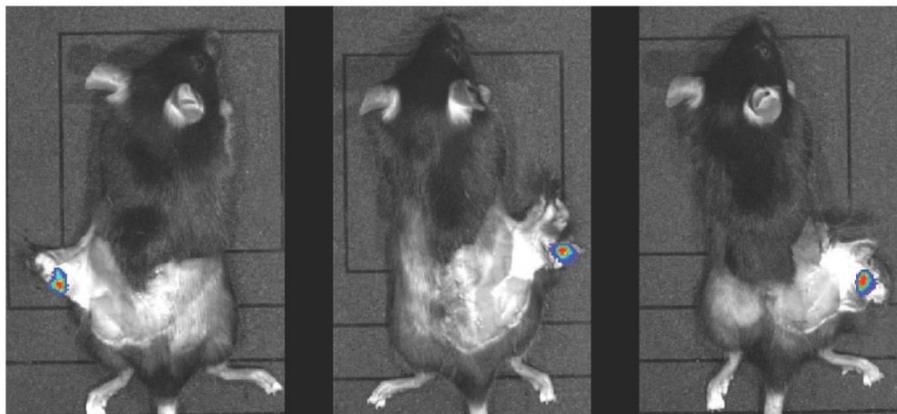
#### Determination of the best HV pulse for efficient gene electrotransfer in the dermis

The first optimization of the EGT electrical parameters consisted in determining the most efficient amplitude of the HV pulse (100  $\mu\text{s}$  duration) among the following field amplitudes: 600 V/cm; 800 V/cm; 1,000 V/cm; 1,200 V/cm; 1,400 V/cm; and 1,600 V/cm. The intensity of the LV pulse (400 ms duration) was kept constant at 140 V/cm and the lag between HV and LV pulses was set at 1,000 ms. This evaluation was performed in C57BL/6J mice using the *luciferase* reporter gene.

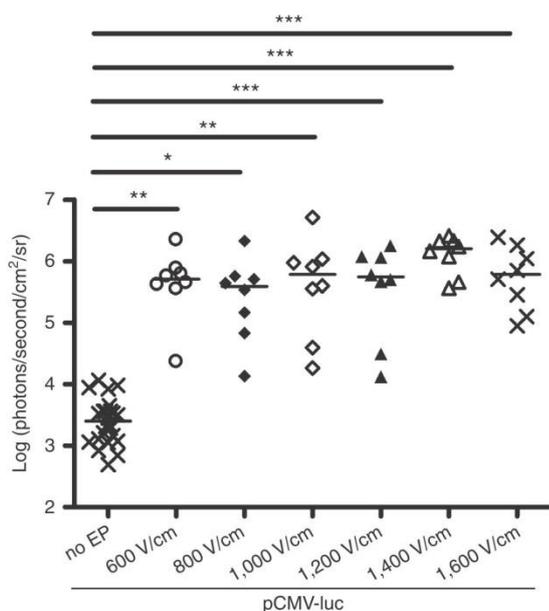
Among the tested amplitudes, C57BL/6J mice electrotransferred with field amplitudes of 1,200 V/cm; 1,400 V/cm; or 1,600 V/cm presented the most significant enhancements of *luciferase* expression as compared to control mice ( $P < 0.001$ ) (Figure 4). In particular, the highest median bioluminescence was obtained in the group treated with a field amplitude of 1,400 V/cm. There was also a better homogeneity in the results for this group as compared to other groups. However, there was no statistical difference between *luciferase* expressions obtained in the 1,200; 1,400; and 1,600 V/cm groups.

#### Determination of the best HV-LV pulses combination for efficient gene electrotransfer in the dermis and generation of intense CD8 immune responses

The influence of different HV-LV combinations was evaluated in C57BL/6J mice by monitoring the *luciferase* expression and the cellular CD8 immune response after electrotransfer of intradermally injected pCMV-luc and INVAC-1 plasmid, respectively. Regarding the HV pulse, 1,000 V/cm or 1,400 V/cm were chosen to be combined with various LV pulses. Pulses of 1,000 V/cm are the reference for EGT following subcutaneous injection of plasmids<sup>1</sup> whereas 1,400 V/cm was optimal for EGT following ID administration of the plasmid, as determined previously. Hence, directly after ID injection of pCMV-luc or INVAC-1, one HV pulse (100  $\mu\text{s}$  duration) of 1,000 V/cm or 1,400 V/cm was applied followed by one LV pulse (400 ms duration) of either 60 V/cm, 100 V/cm, 140 V/cm, 180 V/cm, or 220 V/cm. The ten HV-LV pulses combinations were referred to as "P1" to "P10" (Table 1).



**Figure 3** Localization of *luciferase* expression after ID injection and electrotransfer of pCMV-luc into the dermal layer of C57BL/6J mice using plate electrodes. Bioluminescence intensities were evaluated in the skin flap and in the underlying muscles 4 days after ID injection of pCMV-luc and EGT,  $n = 3$  mice.



**Figure 4** Determination of the optimal HV pulse intensity for intradermally injected pCMV-luc electrotransfer in C57BL/6J mice using plate electrodes. Bioluminescence intensities were evaluated 2 days after pCMV-luc electrotransfer performed in C57BL/6J mice. One single HV pulse of different intensities in combination with one LV pulse of 140 V/cm were compared,  $n = 24$  mice for pCMV-luc ID injection alone,  $n = 8$  (from 4 mice, 2 treatments per mouse) for pCMV-luc ID injection+EP. Bars represent median values, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparison test.

Due to technical limitations, the Cliniporator was not able to deliver constantly 220 V/cm during 400 ms. Thus, the results obtained when P5 and P10 conditions were used did not generate reliable data and were excluded for data analysis.

The P4, P8, and P9 combinations of HV-LV pulses generated the highest median bioluminescence intensities (Figure 5a). All of these three combinations displayed very high statistical differences when compared to pCMV-luc ID injection without EP ( $P < 0.001$ ). In particular, P9 showed the best median bioluminescence intensity, the highest value for the minimum bioluminescence intensity and the lowest point dispersion.

P4, P8, and P9 HV-LV pulses combinations were then tested for ID vaccination with INVAC-1. The hTERT-specific CD8 T-cell responses of these groups were compared to the P3 combination which was previously published for EGT following subcutaneous administration of the DNA.<sup>1</sup> When analyzing the data from the immunogenicity assay, P8 and P9 combinations appeared to be the best ones, since they enabled the generation of significant frequencies of IFN $\gamma^+$  specific CD8 T-cells in comparison with mice that received PBS followed by EP application ( $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively) (Figure 5b). Even though the difference between P8 and P9 groups was not statistically significant, P9 displayed a higher median frequency of hTERT-specific CD8 T-cells.

Given bioluminescence and immunogenicity data analyses, the best HV-LV pulses combination appeared to be P9, *i.e.*, one HV pulse (100  $\mu$ s duration) of 1,400 V/cm followed by one LV pulse (400 ms duration) of 180 V/cm, when administering the DNA intradermally and delivering the EP to the skin with plate electrodes.

The Cliniporator being CE marked for the delivery of a maximum of 1,000 V and because the plate electrodes chosen for the clinical evaluation of INVAC-1 DNA vaccine are separated by a 8-mm gap, the field amplitude that can be used in clinical trials must not

**Table 1** Combinations of HV-LV pulses evaluated in bioluminescence and in ELISpot assays

Electric fields (V/cm)	LV = 60	LV = 100	LV = 140	LV = 180	LV = 220
HV = 1,000	P1	P2	P3	P4	P5
HV = 1,400	P6	P7	P8	P9	P10

exceed 1,250 V/cm. As a consequence, we compared both the *luciferase* expression and the frequency of hTERT-specific CD8 T-cells in mice in which EGT was performed with P9 or with one HV pulse (100  $\mu$ s duration) of 1,250 V/cm followed by one LV pulse (400 ms duration) of 180 V/cm. This last combination will be further referred as Pd. No statistically significant difference was observed between the two groups, in both bioluminescence (Figure 5c) and immunomonitoring assays (Figure 5d).

#### Induction of hTERT-specific CD8 T-cell-mediated killing after INVAC-1-based ID vaccination

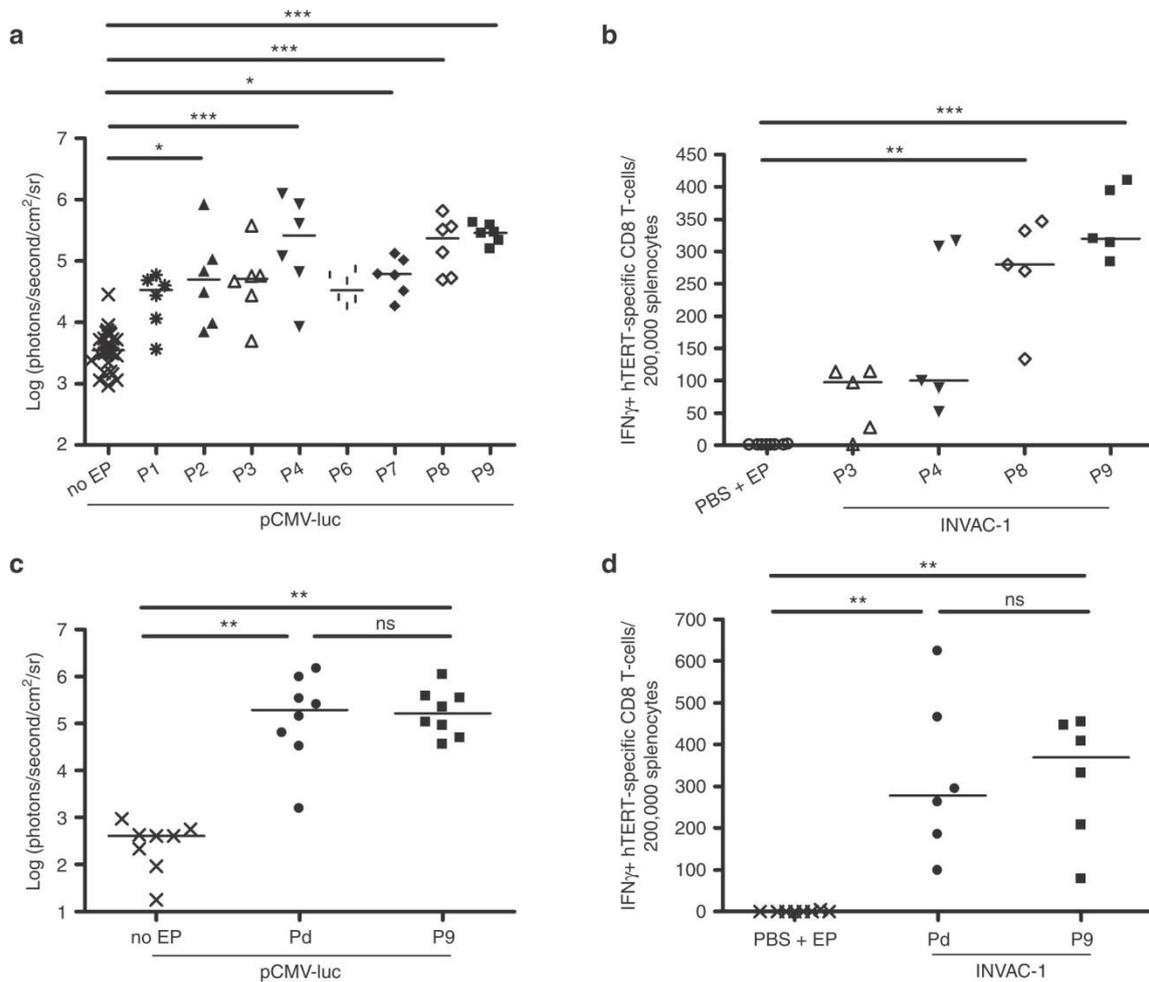
We performed an evaluation of the cytolytic strength of the hTERT-specific CD8 T-cells using carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labeled and peptide-pulsed splenocytes as target cells, as mentioned in the Materials and Methods section. Indeed, the cytotoxic activity of CTL is mandatory to kill tumor cells. In order to finally validate the EGT Pd parameters that could be used in clinical trials, we compared the cytotoxic activity of hTERT-specific CD8 T-cells in C57BL/6J mice immunized through the ID route using INVAC-1 combined with two distinct EGT parameters: one HV pulse of 700 V/cm and of 100  $\mu$ s followed 1,000 ms later by one LV pulse of 100 V/cm and of 400 ms (optimal parameters for EGT in muscle,<sup>1</sup> further referred as Pm) or Pd parameters. In the context of a single immunization with INVAC-1 plasmid, we showed that EGT performed with Pd was associated with a twofold increase in the lysis of target cells bearing class I MHC-restricted telomerase peptides (50% of specific lysis), as compared to EGT performed with Pm (25% of specific lysis) (Figure 6), even though this difference was not statistically significant due to high standard deviations. Thus, INVAC-1-mediated ID vaccination using efficient EGT parameters can generate hTERT-specific CTL.

#### DISCUSSION

DNA vaccination is an effective approach to generate efficient immune responses against a defined antigen by transfecting the gene encoding it directly into target cells.<sup>22</sup> Moreover, DNA vaccines are promising tools for immunotherapy strategies, particularly in the field of cancer management.<sup>7,23</sup> EGT using DNA molecules remains the most efficient and the safest way to deliver a transgene into tissues.<sup>24</sup> Thus, it is considered as an interesting alternative to viral vectors for clinical applications of DNA vaccines.<sup>3,22,25</sup>

In our study, we sought to optimize an *in vivo* EGT protocol for efficient telomerase-based DNA immunization to the dermis. In a first step, we optimized the pCMV-GFP electrotransfer in order to obtain intense *luciferase* expression and, in a second time, our aim was to obtain a high frequency of hTERT-specific CD8 T-cells following EP-mediated DNA vaccination with INVAC-1.

Our results support previous ones demonstrating that EGT into cutaneous tissues increased up to 100-fold the transgene expression in comparison with DNA injection alone and led to an intense antigen-specific immune response.<sup>18,26</sup> Our electrotransfer protocol

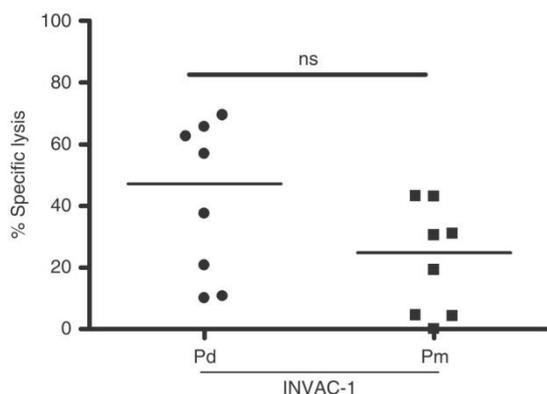


**Figure 5** Choice of the best HV-LV pulses combination for pCMV-luc dermal electrotransfer and INVAC-1-mediated ID vaccination. **(a)** Bioluminescence obtained in C57BL/6J mice 2 days after pCMV-luc ID injection upon various HV-LV pulses combinations,  $n = 30$  mice for pCMV-luc ID injection alone and  $n = 6$  (from 3 mice, 2 treatments per mouse) for pCMV-luc ID injection+EP delivered onto the skin. **(b)** Frequency of hTERT-specific IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8 T-cells detected in C57BL/6J mice vaccinated 14 days before with INVAC-1 according to various combinations of HV-LV pulses,  $n = 8$  mice for PBS immunization control and  $n = 5$  mice for INVAC-1-mediated immunization. **(c)** Comparison of the bioluminescence intensities in C57BL/6J mice in which EGT was performed 2 days before with P9 or Pd,  $n = 4$  mice for pCMV-luc ID injection alone,  $n = 8$  (from four mice, two treatments per mouse) for pCMV-luc ID injection+EP. **(d)** Comparison of the frequency of hTERT-specific IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8 T-cells in C57BL/6J mice immunized intradermally 14 days before by using INVAC-1 combined with P9 or Pd,  $n = 4$  mice for PBS immunization control and  $n = 6$  mice for INVAC-1-mediated immunization. Bars represent median values. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparison test.

was optimized by testing several electrotransfer parameters including different types of electrodes as well as various combinations of HV and LV pulses intensities.

We determined that non-invasive plate electrodes generated both an intense expression of the *luciferase* gene and a specific cellular CD8 immune response against telomerase epitopes. This finding was robust since a similar observation was done in dogs immunized using a canine *TERT*-based DNA vaccine (data not shown). Many preclinical studies used plate electrodes on small rodents for ethical and practical reasons and very few compared non-invasive and invasive electrodes for EGT efficiency.<sup>2,16</sup> Indeed, invasive electrodes designed for human tissues may not be appropriate for small laboratory animals. In order to ensure that all needles penetrate the skin, the experimenter must put enough pressure when digging them into the tissues, which can eventually harm dramatically the animals. Moreover, the use of invasive electrodes may mechanically damage the target tissue and very intense electric fields may occur during electric pulse application at the level of the needles,<sup>27</sup> potentially leading to the death of cells in contact with or very close to the electrodes. Overall, this may explain

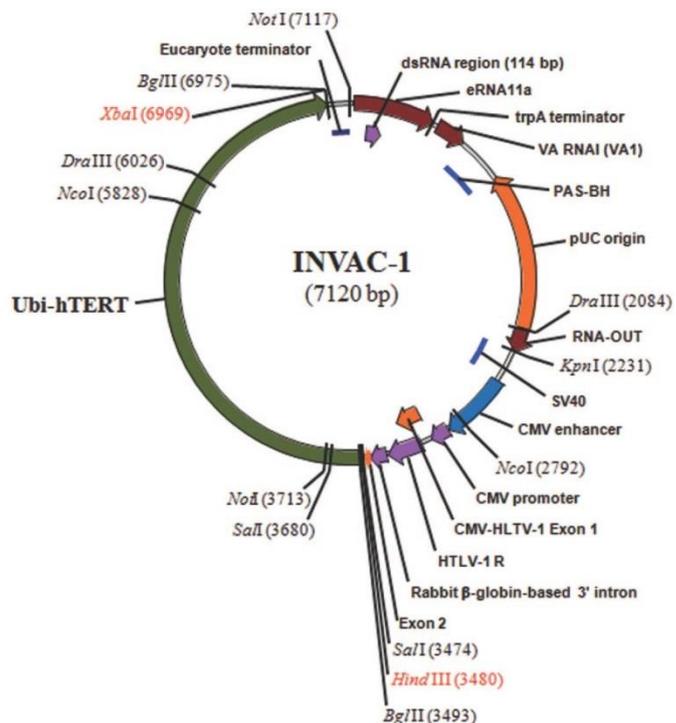
the low efficiency of invasive electrodes in our study. Moreover, plate electrodes generate more homogeneous electric field distribution than invasive electrodes<sup>28</sup> and may achieve a more robust electropermeabilization of target cells. For these reasons, most ongoing clinical trials using electroporation deal with non-invasive electrodes in order to minimize patients’ discomfort and safety concerns. Several optimization procedures have been made in order to improve electroporation using non-invasive plate electrodes. Some of them include the use of conductive gel to improve the contact with the skin<sup>29</sup> or a particular handling in order for the rows of the plate electrodes to be largely in contact with the target tissue.<sup>30</sup> However, it should be noted that the use of noninvasive electrodes involves to overcome the insulating properties of the stratum corneum. In that configuration, a higher electric field should be used with non-invasive electrodes than with invasive electrodes in order to ensure the permeabilization of the target cells located underneath the stratum corneum. Aside from practical and safety issues in favor of the use of non-invasive plate electrodes, we demonstrated here that these were more efficient for EGT of *luciferase* and immunization with INVAC-1 than the two



**Figure 6** Evaluation of the hTERT-specific cytotoxicity of CD8 T-cells in immunized mice as a function of the dermal electrotransfer parameters used. C57BL/6J mice were intradermally immunized with INVAC-1 using Pd or Pm parameters. 14 days later, splenocytes from naïve mice were recovered, stained with CFSE, pulsed with p660 peptides and eventually injected i.v. in immunized mice. 15 hours later, spleens from immunized mice were recovered and CFSE-labeled splenocytes were quantified by flow cytometry,  $n = 8$  mice. Bars represent median values, ns for not statistically significant, Mann–Whitney–Wilcoxon test.

other invasive electrodes, both procedures being performed after ID injection of the DNA. This finding is supported by *in silico* electric field modelization showing that non-invasive electrodes permeabilize very efficiently the surface of tissues (in our case, the skin tissue) while invasive electrodes are intended to be used for electroporation of deeper tissues.<sup>31</sup> Conversely, one study reported that invasive electrodes were more potent than non-invasive ones to induce gene expression following EGT in porcine skin.<sup>16</sup> It should be noted that this comparison was made using the same HV pulse intensity (*i.e.*, 1,000 V/cm), which may not have been high enough to overcome the insulating properties of the stratum corneum in the case of the use of non-invasive electrodes. Moreover, although high transgene expression is an important factor for mounting intense immune responses, it is not the only factor. As a demonstration, there was no obvious difference in our study between plate and needle electrodes in terms of *luciferase* expression whereas the contrast was marked in terms of specific cellular immune response intensity.

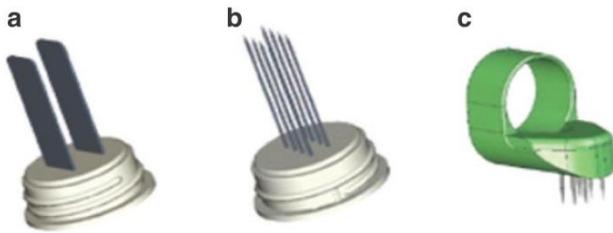
Regarding EGT electrical parameters, we tested various HV-LV combinations. Indeed, although different pulse parameters are used amongst the different groups working in this field, it is accepted that the combination of one HV and one LV leads to an intense transgene expression.<sup>4,14,15</sup> We determined that an injection of *luciferase* gene into the dermis followed by one HV of 1,400 V/cm and of 100  $\mu$ s followed by one LV pulse of 180 V/cm and of 400 ms resulted in a higher luciferase production than the other combinations. This result was supported by the ELISpot assay since this combination led to the highest frequencies of hTERT-specific CD8 T-cells secreting IFN $\gamma$ . Our group previously showed that optimal electrotransfer of *luciferase* into subcutaneous tissues required one HV of 1,000 V/cm and of 100  $\mu$ s followed by one LV pulse of 140 V/cm and of 400 ms.<sup>1</sup> However, one should take in account that this latter work was performed with a subcutaneous injection of DNA (targeting the hypodermis, a fat layer located beneath the skin tissues) whereas the present work was performed with injections into the dermis. Given that dermis-resident fibroblasts, a population mostly represented in this layer of the skin, present smaller radius than adipocytes located in the subcutaneous tissues,<sup>6</sup> it could be hypothesized that adipocytes are more easily electropermeabilized than fibroblasts.<sup>13</sup> Consequently, it is not surprising that, after



**Figure 7** INVAC-1 plasmid map. Bases 1–3478: NTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI vector (NTC); Bases 3479–3484: HindIII cloning site (NTC/Invectys); Bases 3485–6967: Ubi-Telomerase transgene (Invectys); Bases 6968–6973: XbaI cloning site (Invectys/NTC); Bases 6974–7120: NTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI vector (NTC).

an ID injection, a higher electric field amplitude has to be used to transfer DNA into the dermis resident cells. Besides, we demonstrated in this study that plate electrodes were more suitable than invasive ones when using nonoptimized electrical parameters. The major concern when using plate electrodes consists in applying an electric field intense enough to overcome the insulating barrier represented by the stratum corneum. Here, the optimum electrical parameters for EGT following ID DNA injection (one HV pulse of 1,250 V/cm followed by one LV pulse of 180 V/cm) were more intense than those used for the determination of the best electrodes (one HV pulse of 1,000 V/cm followed by one LV pulse of 140 V/cm). It is thus expected that these optimum electrical parameters would further favor the choice of plate electrodes over invasive ones since the stratum corneum insulating property would be overcome more efficiently.

These optimal parameters were obtained in mice using non-invasive plate electrodes spaced 5 mm apart to fit with an ID injection of a 50  $\mu$ l volume in mice. For an injection of 100  $\mu$ l of a plasmid solution, as intended to be used in humans, the 8-mm-spaced-plate electrodes must be used. The voltage must be set according to the distance between the two rows of the electrodes. In that case, the HV is limited to 1,250 V/cm (instead of 1,400 V/cm) because Cliniporator settings for human use are limited to 1,000 V for safety reasons (CE mark). The CE mark also covers the 8-mm-spaced-plate electrodes. Consequently, we compared the optimal parameters that were discussed previously with the ones of maximum intensity that can be used while keeping the Cliniporator CE mark (Pd parameters). As a matter of fact, both parameters were equally efficient in inducing an intense *luciferase* expression and the difference in terms of hTERT-specific CD8 T-cell response was not statistically different between the two groups.



**Figure 8** Electrodes used in this study. (a) Non-invasive plate electrodes. (b) Invasive needle electrodes. (c) Invasive finger electrodes.

Finally, we showed that immunized mice generated hTERT-specific CTL endowed with killing capacity towards target cells bearing class I MHC-restricted hTERT peptides. Moreover, this cytotoxic activity was strongly dependent on the electric parameters used for EGT.

In summary, we demonstrated that our parameters for EGT into the dermis greatly enhanced the *luciferase* expression *in vivo* and allowed the induction of intense specific CD8 T-cell responses when using an ID injection of DNA vaccine encoding *hTERT* as a tumor antigen. The present study highlights the need to define optimal EGT parameters to allow a successful immunization when using DNA vaccination protocols in a defined target tissue. The determined EGT parameters are being used in regulatory toxicology and safety studies of INVAC-1-based DNA vaccination and are intended to be used for its clinical evaluation. A prime/boost strategy will be investigated in order to mount robust, intense and cytotoxic hTERT-specific cellular immune responses in cancer patients. Moreover, it is expected that our EGT parameters could be used for efficient DNA vaccination using other types of antigens, should they be tumor or pathogen antigens.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

HLA-B7 mice are transgenic mice expressing the HLA-B\*0702 class I molecule. They are knock-out for mouse class I H2D<sup>b</sup> and H2K<sup>b</sup> molecules. They were described by Rohrlrich *et al.*<sup>32</sup> and were obtained from the Pasteur Institute internal breeding. Female C57BL/6J mice (6–8 weeks old) were purchased from Janvier (Saint-Berthevin, France) or Harlan (Gannat, France) laboratories.

Animals were housed at specific pathogen-free animal facilities of the Pasteur Institute or of Gustave Roussy. All animal experiments were performed in strict compliance with the ethical guidelines issued by the European Committee (Directive 2010/63/EU) and animals were handled in strict accordance with good animal practice. The experimental protocols (#2013\_0026 and #2012\_007) were respectively approved by the registered committees on ethics in animal experimentation, CETEA–Institut Pasteur and CEEA #26.

### Plasmids

pCMV-luc (Plasmid Factory, Bielefeld, Germany) is a double stranded plasmid DNA of 6,233 bp encoding the firefly *luciferase* reporter gene under control of the cytomegalovirus promoter (pCMV).

INVAC-1 is a double stranded plasmid DNA of 7,120 bp encoding a modified sequence of the telomerase protein fused to the Ubiquitin protein sequence. The encoded telomerase protein is enzymatically inactive, due to the deletion of three amino acids inside the catalytic site of hTERT (delta VDD), but can still induce immune responses against telomerase epitopes *in vivo*. The ubiquitin-telomerase insert is cloned into the NTC8685-ERNA41H-HindIII-XbaI expression vector designed by Nature Technology Corporation (Lincoln, Nebraska). The presence of the ubiquitin increases the addressing of the TERT protein to the proteasome and increases the MHC class I presentation pathway of TERT-derived peptides.<sup>33,34</sup> The DNA sequence coding for the TERT protein was deleted of 47 amino acids in the N-terminal region, which encodes the nucleolar localization signal. Figure 7 represents INVAC-1 plasmid map.

### EP generator and electrodes

EGT was performed using the Cliniporator (IGEA, Carpi, Italy) delivering HV pulses and LV pulses. Voltages were set up according to the distance between the two rows of the electrodes. Different types of electrodes were used: (i) non-invasive plate electrodes (P30-8B, IGEA) consisting in two metallic plates, 1 mm thick and 5 mm apart (Figure 8a), (ii) invasive needle electrodes (N-30-4B, IGEA) consisting in two rows of four long needles, 4 mm apart (Figure 8b), and (iii) invasive finger electrodes (F-05-OR, IGEA) consisting in two rows of three short needles, 4 mm apart (Figure 8c).

### *In vivo* gene electrotransfer

Prior to the ID injections, mice were anesthetized either with 2% isoflurane/oxygen mixture gas anesthesia (Abbot, Suresnes, France) or with a mix solution (intraperitoneal route) of 2% xylazine (Bayer Santé, Loos, France) and 8% ketamine (Merial, Lyon, France) in PBS according to individual animal weight. After shaving, ID injection was performed on the lower part of the flank (bilateral injections) with 29 G insulin specific needles. Each animal, either HLA-B7 or C57BL/6J mouse, was vaccinated with a single dose of DNA, corresponding to 100 µg (unless otherwise specified) of INVAC-1 plasmid (50 µg in 25 µl PBS per flank). Regarding *luciferase* electrotransfer, 5 µg in 25 µl PBS per site were injected (three sites per mouse: two electroporated and one control non-electroporated).

Immediately after the ID injection, EGT was performed using one HV pulse (100 µs duration) followed 1,000 ms later by one LV pulse (400 ms duration). Electrodes were placed in such a way they surrounded the bleb formed by the plasmid injection and were in contact with it. Both finger or needle electrodes were pressed for about 5 mm to the skin. Large amount of conductive gel (NM Médical, Asnières-sur-Seine, France) was used for the plate electrodes in order to improve the contact between the metallic plates and the skin. Negative controls of vaccination included the application of EP in mice injected with PBS only and negative controls of gene transfer consisted in the absence of EP application on mice injected with pCMV-luc.

### *In vivo* bioluminescence imaging and electrotransfer localization

Two days after pCMV-luc electrotransfer, mice were injected intraperitoneally with 0.15 mg beetle luciferin (Promega, Lyon, France) per gram of body mass. Twenty minutes after the injection, animals were anesthetized using a 2% isoflurane/oxygen mixture gas anesthesia and the luciferase-driven bioluminescent reaction was detected using the *In Vivo* Imaging System IVIS 50 (Xenogen, Waltham, MA). In order to validate the EGT in the skin, three mice were killed by cervical dislocation 4 days after EGT and 20 minutes after luciferin injection. Then, the electropermeabilized skin area was removed from the animals. Bioluminescence intensities were assessed in the skin flap and in the underlying muscles.

### HLA-B7 and H2 restricted peptides

hTERT peptides restricted to HLA-B\*0702 class I molecules have been previously described.<sup>35,36</sup> Other peptides were predicted by *in-silico* epitope prediction in order to bind mouse MHC class I, H2K<sup>b</sup>, H2D<sup>b</sup> using four algorithms available online: Syfpeithi (<http://www.syfpeithi.de/>), Bimas (<http://www.bimas.cit.nih.gov/>), NetMHCpan and SMM (<http://tools.immuneepitope.org/main/>). All synthetic peptides were purchased lyophilized (>90% purity) from Proimmune (Oxford, UK). Details of peptides sequence according to B7 or H2 restriction are shown below:

HLA-B7-restricted hTERT peptides:

- HLA-B7: RPSLTGARRL (p351)
- HLA-B7: RPAEEATSL (p277)
- HLA-B7: LPSDFKTL (p1123)

H2-restricted hTERT peptides:

- H2D<sup>b</sup>: RPVNM DYV (p660).
- H2K<sup>b</sup>: HAQCPYGV L (p429)

For availability reasons, HLA-B7-restricted hTERT peptides were used in a first assessment in ELISpot assays with transgenic HLA-B7 mice to compare EGT efficiency into the dermis using different types of electrodes. Then, H2-restricted hTERT peptides were used in ELISpot assays with C57BL/6J mice to determine the best electrical parameters for EGT into the dermal layer. The p660 peptide was also used in the *in vivo* CTL killing assay performed in C57BL/6J mice.

### IFN $\gamma$ ELISpot assay

IFN $\gamma$  cytokine was chosen since it is strongly produced by cytotoxic CD8 T-cells, one of the most efficient antitumor effector cells.<sup>9</sup> An IFN $\gamma$  ELISpot kit (Diacalone, Eurobio, Courtaboeuf, France) was used according to the manufacturer's instructions with some adjustments. Briefly, 14 days after ID injection of INVAC-1 and EGT, spleens were recovered and a ficoll-purified lymphocytes solution was prepared at  $2 \times 10^6$  cells/ml in complete RPMI culture medium (RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Calf Serum, 1% sodium-pyruvate, 1% penicillin-streptomycin and 0,1%  $\beta$ -mercaptoethanol). All the components mentioned above were purchased from Life technologies (Saint-Aubin, France). Lymphocytes were incubated in triplicates at  $2 \times 10^5$  cells/well in the presence of the relevant H2 peptides (p660 and p429) or B7 peptides (p351, p277 and p1123) at 5  $\mu$ g/ml. Positive controls with 10  $\mu$ g/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-ionomycin and negative controls with serum-free culture medium were performed. Plates were incubated for 19 hours at 37 °C. Spots were revealed following the manufacturer's instructions and were counted using the Immunospot ELISpot counter and software (Cellular Technology, Bonn, Germany).

### *In vivo* CTL killing assay

The *in vivo* CTL killing assay was performed using labeled and peptide-pulsed syngenic splenocytes as targets.<sup>37</sup> Briefly, labeling was performed using CFSE (Life Technologies) for 15 minutes at room temperature. CFSE<sup>high</sup> splenocytes (labeled with 5  $\mu$ mol/l CFSE) from naïve C57BL/6J mice were pulsed with class I MHC-restricted p660 peptides at 5  $\mu$ g/ml during 90 minutes and non-pulsed CFSE<sup>low</sup> splenocytes (labeled with 0.2  $\mu$ mol/l CFSE) served as control. A mix containing an equal number of both fractions (high and low), that represented  $6 \times 10^6$  total cells, was injected through the retro-orbital vein into immunized or control mice 14 days following, respectively, INVAC-1 or PBS injection and EP application. After 15 hours, single-cell suspensions from spleens were analyzed by flow cytometry (Myltenyii, Bergisch Gladbach, Germany). The disappearance of peptide-pulsed cells was determined by comparing the ratio of pulsed (high CFSE fluorescence intensity) to non-pulsed (low CFSE fluorescence intensity) populations in INVAC-1-immunized mice versus control non-immunized mice. The percentage of specific killing per test animal was calculated according to the following calculation:

$$[1 - \frac{\text{mean (CFSE}^{\text{low}}\text{PBS/CFSE}^{\text{high}}\text{PBS)}}{\text{mean (CFSE}^{\text{low}}\text{INVAC-1/CFSE}^{\text{high}}\text{INVAC-1)}}] \times 100$$

"Mean (CFSE<sup>low</sup>PBS/CFSE<sup>high</sup>PBS)" represents the mean of the ratios of the percentages of unpulsed cells stained with 0.2  $\mu$ mol/l CFSE to the percentages of peptide-pulsed cells stained with 5  $\mu$ mol/l CFSE that were detected in spleens from control non-immunized mice.

"CFSE<sup>low</sup>INVAC-1/CFSE<sup>high</sup>INVAC-1" represents the ratio of the percentage of unpulsed cells stained with 0.2  $\mu$ mol/l CFSE to the percentage of peptide-pulsed cells stained with 5  $\mu$ mol/l CFSE that were detected in spleens from the considered INVAC-1-immunized mouse.

### Statistical analysis and data handling

GraphPad Prism software was used for data handling, analysis and graphic representations. A Mann-Whitney-Wilcoxon test or a Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test was used, depending on the experiment. Significance was set at  $P < 0.05$ .

### CONFLICT OF INTEREST

INVAC-1 plasmid is developed by the company INVECTYS. L.M.M. has a consulting activity for IGEA and holds several patents on the electroporation technologies.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Valérie Rouffiac from Gustave-Roussy's flow cytometry and imaging facility for her technical support and all the Pasteur Institute's and Gustave Roussy's animal facilities staff members for ensuring the well-being of the animals. We acknowledge IGEA for the permission to use the pictures of the electrodes used in this study. This work was partly funded by the Fondation EDF, the CNRS, the University of Paris-Sud, Gustave Roussy, the Pasteur Institute and by a grant from Medicen and from the Conseil Général du Val-de-Marne through the Telvac project. Research was conducted in the scope of the EBAM European Associated Laboratory.

### REFERENCES

- André, FM, Gehl, J, Sersa, G, Prétat, V, Hojman, P, Eriksen, J *et al.* (2008). Efficiency of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin. *Hum Gene Ther* **19**: 1261–1271.
- Gothelf, A and Gehl, J (2010). Gene electrotransfer to skin; review of existing literature and clinical perspectives. *Curr Gene Ther* **10**: 287–299.
- Rochard, A, Scherman, D and Bigey, P (2011). Genetic immunization with plasmid DNA mediated by electrotransfer. *Hum Gene Ther* **22**: 789–798.
- André, FM and Mir, LM (2010). Nucleic acids electrotransfer in vivo: mechanisms and practical aspects. *Curr Gene Ther* **10**: 267–280.
- Rosazza, C, Buntz, A, Rieß, T, Wöll, D, Zumbusch, A and Rols, MP (2013). Intracellular tracking of single-plasmid DNA particles after delivery by electroporation. *Mol Ther* **21**: 2217–2226.
- Combadiere, B and Liard, C (2011). Transcutaneous and intradermal vaccination. *Hum Vaccin* **7**: 811–827.
- Eschenburg, G, Stermann, A, Preissner, R, Meyer, HA and Lode, HN (2010). DNA vaccination: using the patient's immune system to overcome cancer. *Clin Dev Immunol* **2010**: 169484.
- Kutzler, MA and Weiner, DB (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* **9**: 776–788.
- Vesely, MD, Kershaw, MH, Schreiber, RD and Smyth, MJ (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* **29**: 235–271.
- Stevenson, FK and Palucka, K (2010). Understanding and activating immunity against human cancer. *Curr Opin Immunol* **22**: 212–214.
- Braumüller, H, Wieder, T, Brenner, E, Aßmann, S, Hahn, M, Alkhaled, M *et al.* (2013). T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* **494**: 361–365.
- Disis, ML, Bernhard, H and Jaffee, EM (2009). Use of tumour-responsive T-cells as cancer treatment. *Lancet* **373**: 673–683.
- Mir, LM, Moller, PH, André, F and Gehl, J (2005). Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues. *Adv Genet* **54**: 83–114.
- Satkauskas, S, André, F, Bureau, MF, Scherman, D, Miklavcic, D and Mir, LM (2005). Electrophoretic component of electric pulses determines the efficacy of *in vivo* DNA electrotransfer. *Hum Gene Ther* **16**: 1194–1201.
- Favard, C, Dean, DS and Rols, MP (2007). Electrotransfer as a non viral method of gene delivery. *Curr Gene Ther* **7**: 67–77.
- Gothelf, A, Mahmood, F, Dagnaes-Hansen, F and Gehl, J (2011). Efficacy of transgene expression in porcine skin as a function of electrode choice. *Bioelectrochemistry* **82**: 95–102.
- Daugimont, L, Baron, N, Vandermeulen, G, Pavselj, N, Miklavcic, D, Jullien, MC *et al.* (2010). Hollow microneedle arrays for intradermal drug delivery and DNA electroporation. *J Membr Biol* **236**: 117–125.
- Vandermeulen, G, Staes, E, Vanderhaeghen, ML, Bureau, MF, Scherman, D and Prétat, V (2007). Optimisation of intradermal DNA electrotransfer for immunisation. *J Control Release* **124**: 81–87.
- Roos, AK, Eriksson, F, Timmons, JA, Gerhardt, J, Nyman, U, Gudmundsdottir, L *et al.* (2009). Skin electroporation: effects on transgene expression, DNA persistence and local tissue environment. *PLoS ONE* **4**: e7226.
- Beatty, GL and Vonderheide, RH (2008). Telomerase as a universal tumor antigen for cancer vaccines. *Expert Rev Vaccines* **7**: 881–887.
- Buseman, CM, Wright, WE and Shay, JW (2012). Is telomerase a viable target in cancer? *Mutat Res* **730**: 90–97.
- Gothelf, A and Gehl, J (2012). What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines. *Hum Vaccin Immunother* **8**: 1694–1702.
- Senovilla, L, Vacchelli, E, Garcia, P, Eggermont, A, Fridman, WH, Galon, J *et al.* (2013). Trial watch: DNA vaccines for cancer therapy. *Oncoimmunology* **2**: e23803.
- Villemejeane, J and Mir, LM (2009). Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications. *Br J Pharmacol* **157**: 207–219.
- Auriscicchio, L, Mancini, R and Ciliberto, G (2013). Cancer vaccination by electro-gene-transfer. *Expert Rev Vaccines* **12**: 1127–1137.
- Drabick, JJ, Glasspool-Malone, J, King, A and Malone, RW (2001). Cutaneous transfection and immune responses to intradermal nucleic acid vaccination are significantly enhanced by *in vivo* electropermeabilization. *Mol Ther* **3**: 249–255.
- Miklavcic, D, Semrov, D, Mekid, H and Mir, LM (2000). A validated model of *in vivo* electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy. *Biochim Biophys Acta* **1523**: 73–83.
- Gehl, J, Sorensen, TH, Nielsen, K, Raskmark, P, Nielsen, SL, Skovsgaard, T *et al.* (1999). *In vivo* electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution. *Biochim Biophys Acta* **1428**: 233–240.
- Ivorra, A, Al-Sakere, B, Rubinsky, B and Mir, LM (2008). Use of conductive gels for electric field homogenization increases the antitumor efficacy of electroporation therapies. *Phys Med Biol* **53**: 6605–6618.
- Corovic, S, Al Sakere, B, Haddad, V, Miklavcic, D and Mir, LM (2008). Importance of contact surface between electrodes and treated tissue in electrochemotherapy. *Technol Cancer Res Treat* **7**: 393–400.

31. Miklavcic, D, Corovic, S, Pucihar, G and Pavselj, N (2006). Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy. *EJC Suppl* **4**: 45–51.
32. Rohrllich, PS, Cardinaud, S, Firat, H, Lamari, M, Briand, P, Escriou, N *et al.* (2003). HLA-B\*0702 transgenic, H-2KbDb double-knockout mice: phenotypical and functional characterization in response to influenza virus. *Int Immunol* **15**: 765–772.
33. Rodriguez, F, Zhang, J and Whitton, JL (1997). DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *J Virol* **71**: 8497–8503.
34. Wang, Q, Lei, C, Wan, H and Liu, Q (2012). Improved cellular immune response elicited by a ubiquitin-fused DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis*. *DNA Cell Biol* **31**: 489–495.
35. Adotévi, O, Mollier, K, Neuveut, C, Cardinaud, S, Boulanger, E, Mignen, B *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**: 3158–3167.
36. Cortez-Gonzalez, X, Sidney, J, Adotevi, O, Sette, A, Millard, F, Lemonnier, F *et al.* (2006). Immunogenic HLA-B7-restricted peptides of hTERT. *Int Immunol* **18**: 1707–1718.
37. Durward, M, Harms, J and Splitter, G (2010). Antigen specific killing assay using CFSE labeled target cells. *J Vis Exp* **45**: <<http://www.jove.com.gate1.inist.fr/video/2250/antigen-specific-in-vivo-killing-assay-using-cfse-labeled-target-cells>>.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

## 1.2. ARTICLE #2

### **Anti-cancer DNA vaccine based on human telomerase reverse transcriptase generates a strong and specific T cell immune response**

Jessie Thalmensi<sup>1, \*</sup>, **Elodie Pliquet**<sup>1, 2, \*</sup>, Christelle Liard<sup>1</sup>, Marie Escande<sup>1</sup>, Thomas Bestetti<sup>1</sup>, Marion Julithe<sup>1</sup>, Anna Kostrzak<sup>1</sup>, Anne-Sophie Pailhes-Jimenez<sup>1</sup>, Emanuèle Bourges<sup>1</sup>, Maria Loustau<sup>1</sup>, Julien Caumartin<sup>1</sup>, Abderrahim Lachgar<sup>1</sup>, Thierry Huet<sup>1</sup>, Simon Wain-Hobson<sup>1, 2</sup> and Pierre Langlade-Demoyen<sup>1, 2</sup>

\* Contributed equally

<sup>1</sup> Invectys, Pasteur BioTop, Paris, France

<sup>2</sup> Molecular Retrovirology Unit, CNRS-URA 3015, Institut Pasteur, Paris, France

#### **Soumis**

Brevet article #2 (cf. Annexes): **A telomerase encoding DNA vaccine.**

European Patent Application PCT/EP2014/073164

Pierre Langlade-Demoyen, Simon Wain-Hobson, Thierry Huet, Christelle Liard, **Elodie Pliquet**

#### **But:**

Démontrer l'immunogénicité, la fonctionnalité et l'effet anti-tumoral induit par une immunisation INVAC-1 (ID + EGT) *in vivo* chez la souris.

#### **Méthode :**

Dans un premier temps, nous avons évalué *in vitro* au cours du temps l'expression et la stabilité de la protéine codée par le plasmide INVAC-1. Pour des raisons de sécurité, nous avons vérifié *in vitro* l'absence d'activité catalytique via un test TRAP (*Telomeric Repeat Amplification Protocol*) et l'exclusion nucléaire-nucléolaire de cette protéine par immunofluorescence.

Les différents tests pour étudier la réponse immunitaire induite par l'immunisation INVAC-1 impliquent une stimulation spécifique des effecteurs. Nous avons donc utilisé une méthode prédictive (expliquée en point IV de la section Outils-Méthodes) afin d'identifier les peptides dérivés de hTERT restreints à H2 (haplotype b et d) et à HLA-A2 nécessaires à la stimulation des cellules issues de souris conventionnelles ou transgéniques HLA.

L'induction des réponses LTs CD4 et CD8 spécifiques de hTERT suite à une immunisation INVAC-1 dans différentes lignées murines (conventionnelles et transgéniques HLA-B7, HLA-A2/DR1) a été observée à l'aide de tests ELISpot (*enzyme-linked immunospot*) permettant de détecter la sécrétion d'IFN- $\gamma$ . La polarisation des réponses LTs CD4 a été évaluée sur les surnageants de lymphocytes stimulés en testant les cytokines sécrétées en multiplex (CBA). Les études de fonctionnalité servant à déterminer le pouvoir cytotoxique de la réponse CTLs induite ont été basées sur le principe de lyse *in vivo* (cibles marquées à la CFSE, *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*) et chargées en peptides hTERT), sur des ELISpot GrB et des ELISpot réalisés avec les lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs).

Le modèle tumoral Sarc-2 (léiomyosarcome murin spontané de souris HLA-A2/DR1) injecté par voie sous-cutanée a été utilisé pour évaluer l'effet anti-tumoral thérapeutique induit par INVAC-1 dans les souris transgéniques HLA-A2/DR1.

### **Résultats :**

Les protéines fusionnées à l'ubiquitine étant démontrées pour une dégradation rapide à travers la voie du protéasome favorisant la présentation peptidique par les CMH I, nous avons caractérisé *in vitro* la protéine codée par INVAC-1. Nous avons observé une forme protéique majoritaire non-ubiquitinylée et sa dégradation au cours du temps comparée à la protéine sauvage hTERT. De plus, la suppression du NoLS entraîne une localisation cytoplasmique de la protéine INVAC-1 (immunofluorescence) et la délétion du site catalytique conduit à une forme inactive de l'enzyme (TRAP).

En utilisant le protocole d'immunisation décrit ci-dessus (100  $\mu$ g ADN en ID + EGT) et des peptides hTERT (restreints à chaque CMH ou chevauchants), nous avons démontré qu'INVAC-1 induit de significatives réponses CD4 polarisées Th1 (sécrétion majoritaire d'IL-2, TNF et IFN- $\gamma$ ) et CD8 (sécrétion IFN- $\gamma$ ) spécifiques de hTERT. Ces réponses ont aussi été soulignées par la largeur du répertoire T induit contre de nombreux épitopes

couvrant la totalité de la protéine. Nous avons aussi montré que l'administration d'une seconde immunisation augmente et raccourcit le temps de génération de ces réponses LTs spécifiques.

Les résultats significatifs de fonctionnalité ont aussi démontré le profil cytotoxique des CD8 (CTLs) spécifiques de hTERT (lyse *in vivo* et ELISpot GrB) ainsi que leur capacité à migrer au site tumoral (ELISpot sur les TILs). Les données de l'essai thérapeutique sur le modèle murin Sarc-2 attestent d'un ralentissement de la croissance tumorale suite aux vaccinations INVAC-1 avec un taux de survie de 50%.

### **Conclusions:**

Les modifications apportées à la séquence protéique confèrent à la protéine INVAC-1 une certaine innocuité ainsi que la capacité d'être dégradée par le protéasome à travers l'ubiquitine et le *N-end rule* dans le but d'augmenter la présentation antigénique. Nos résultats démontrent qu'INVAC-1 induit de manière significative des LTs CD4 Th1 et des CTLs spécifiques avec la capacité à reconnaître de nombreux épitopes de hTERT. L'ensemble des données et surtout la capacité des CTLs à migrer au site tumoral, le ralentissement observé de la croissance tumorale et le taux de survie des animaux porteurs de tumeurs sous l'effet d'INVAC-1, lui permettent aujourd'hui d'être utilisé dans un essai clinique de phase I.

Anti-cancer DNA vaccine based on human telomerase reverse transcriptase  
generates a strong and specific T cell immune response

Jessie Thalmensi<sup>1,\*</sup>, Elodie Pliquet<sup>1,2,\*</sup>, Christelle Liard<sup>1</sup>, Marie Escande<sup>1</sup>, Thomas Bestetti<sup>1</sup>,  
Marion Julithe<sup>1</sup>, Anna Kostrzak<sup>1</sup>, Anne-Sophie Pailhes-Jimenez<sup>1</sup>, Emanuèle Bourges<sup>1</sup>,  
Maria Loustau<sup>1</sup>, Julien Caumartin<sup>1</sup>, Abderrahim Lachgar<sup>1</sup>, Thierry Huet<sup>1</sup>,  
Simon Wain-Hobson<sup>1,2</sup> and Pierre Langlade-Demoyen<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Invectys, Pasteur BioTop, Paris, France

<sup>2</sup> Molecular Retrovirology Unit, CNRS-URA 3015, Institut Pasteur, Paris, France

\*J.T. and E.P. contributed equally to this manuscript

Corresponding author: PLD [pierre.langlade@invectys.com](mailto:pierre.langlade@invectys.com)

Invectys

Pépinière Paris Santé Cochin

27, rue du Faubourg Saint Jacques

75014 Paris

Conflict of interest: SWH and PLD are founders and shareholders of Invectys. The authors  
have declared no conflicts of interest for this article

Short title: Anti-cancer DNA vaccine targeting telomerase

Key words: hTERT, DNA vaccines, DNA electrogene transfer, electroporation, cancer,  
immunotherapy

## **Abstract**

Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is overexpressed in more than 85% of human cancers regardless of their cellular origin. As immunological tolerance to hTERT can be overcome not only spontaneously but also by vaccination, it represents a relevant universal tumor associated antigen. Indeed, hTERT specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) precursors are present within the peripheral T-cell repertoire. Consequently, hTERT vaccine represents an attractive candidate for antitumor immunotherapy. Here, an optimized DNA plasmid encoding an inactivated form of hTERT, named INVAC-1, was designed in order to trigger cellular immunity against tumors. Intradermal injection of INVAC-1 followed by electrogene transfer (EGT) in a variety of mouse models elicited broad hTERT specific cellular immune responses including high CD4 Th1 effector and memory CD8 T-cells. Furthermore, therapeutic INVAC-1 immunization in a HLA-A2 spontaneous and aggressive mouse sarcoma model slows tumor growth and induce survival rate of 50% of tumor-bearing mice. These results emphasize that INVAC-1 based immunotherapy represents a relevant cancer vaccine candidate.

## **Introduction**

Among a wide range of tumor antigens <sup>1</sup>, human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a very attractive and important target for anti-cancer immunotherapeutic approaches. Human TERT is the rate-limiting catalytic subunit of the telomerase complex, a ribonucleoprotein enzyme which synthesizes telomeric DNA at chromosome ends <sup>2</sup>. It prevents apoptosis through the telomere-dependent pathway promoting cell immortality effectively allowing cells to grow indefinitely. These properties have been described in malignant cell transformation as some of the hallmarks in cancer genesis <sup>3</sup>. Human TERT is overexpressed in the vast majority (80-90%) of cancer cells regardless of their origin, <sup>4</sup> and is associated with a poor prognosis. <sup>5</sup> This overexpression leading to presentation of hTERT peptides at the surface of tumor cells enables recognition and destruction of these tumor cells by a natural anti-hTERT immune response. This response has been highlighted in some cancer patients revealing the natural break of self-tolerance. <sup>6</sup> Given its widespread expression in tumor cells, hTERT is considered to be a near universal tumor associated antigen (TAA), <sup>7</sup> The crucial role of hTERT in oncogenesis justifies its use in clinical immunotherapy as a treatment for cancer.

To date, different clinical approaches have been explored based on MHC class I or II restricted hTERT peptides, autologous antigen-presenting cells (APCs; dendritic cells or B lymphocytes) loaded with hTERT peptides or transduced with hTERT mRNA.<sup>8</sup> Unfortunately, these strategies suffer from some limitations and disadvantages<sup>9</sup> and have had limited clinical impact for most patients<sup>7</sup> despite of the induction of specific immune responses.

DNA vaccines offer numerous advantages such as the flexibility to incorporate easily multiple genes which encode either full-length or partial tumor antigens and/or immunostimulatory molecules.<sup>10</sup> In addition, several smart add-on features have been explored such as the use of strong viral promoters, the engineering of codon-optimized sequences, the addition of immunoglobulin sequences or the enrichment of CpG motifs in plasmid backbone.<sup>11</sup> On top of this DNA is safe, stable and easy to manufacture. Despite these traits initial DNA vaccination studies showed that DNA was generally poorly immunogenic,<sup>12</sup> especially when self-antigens were studied. Recent improvements in ElectroGene Transfer (EGT), or DNA electroporation, such as the use of a sequence of high volt-low volt pulses have greatly increased the efficiency of the DNA vaccination.<sup>13</sup> There are now many ongoing clinical trials using DNA vaccination for cancer immunotherapy or against infectious diseases.<sup>14</sup>

We report the development of INVAC-1, a DNA plasmid for cancer immunotherapy. It encodes a modified full-length hTERT protein devoid of telomerase catalytic activity fused to human ubiquitin. INVAC-1 triggered broad and strong hTERT specific cytotoxic and Th1 immune responses in different mouse strains immunized through the intradermal route (ID) combined with an optimized EGT protocol. It shows a potent anti-tumor activity against a spontaneous and aggressive mouse sarcoma. These pharmacological data support the use of INVAC-1 in human clinical trials for the treatment of various types of cancers.

## **Results**

### **Expression, subcellular localization and catalytic inactivity of INVAC-1 hTERT protein**

INVAC-1 DNA construct encodes a 9 bp deletion coding for 3 critical amino acids (867-869, Valine-Aspartic Acid-Aspartic Acid or VDD) in the catalytic site. They are highly conserved across polymerases and mutation of any of these residues resulted in catalytic inactivation.<sup>15</sup>

The nucleolar localization sequence (NoLS) at the N-terminal region (residues 1-47) was deleted and replaced by a complete 76 residue human ubiquitin (Ubi, MW = 8.4 kDa) moiety. Ubiquitin-fused proteins enter into a rapid proteasome-dependent degradation pathway leading to enhanced MHC class I peptides presentation and improved specific immune responses to a variety of antigens.<sup>16</sup> Telomerase expression in HEK293T cells was assessed by Western blotting (Fig. 1B). INVAC-1 construct expressed two distinct hTERT specific products, a weak upper product corresponding to the Ubi-hTERT fusion protein at the predicted size of 127.4 kDa and a major lower product corresponding probably to INVAC-1 hTERT protein lacking the ubiquitin sequence (119 kDa). By contrast, wild-type hTERT protein was detected at 124.5 kDa as expected. The INVAC-1 hTERT protein signal disappeared over time indicating that it was rapidly degraded, likely through the ubiquitin-dependent proteasome pathway, in contrast to wild-type hTERT protein which was stable out to 96 hours (Fig. 1B).

The impact of the NoLS deletion on the cellular localization was assessed in transfected QT6 cells, which do not express cross-reacting telomerase antigens, the avian and human enzymes sharing ~50% amino acid homology. INVAC-1 hTERT protein was localized in the cytoplasm, both at 24 h (Fig. 1C) and 48 h (data not shown), while wild-type hTERT was mainly detected in the nucleus and nucleolus showing that the deletion of the nucleolar localization signal drastically altered the subcellular distribution.

In order to confirm the lack of INVAC-1 hTERT activity, a critical requirement for any human trials, telomerase activity was determined in transfected CrFK cells using a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay. Relative telomerase activity (RTA) data showed that INVAC-1 hTERT protein was completely devoid of any telomerase activity in comparison to wild-type hTERT control (Fig. 1D). Taken together, these results demonstrate that INVAC-1 hTERT protein displayed the characteristics and properties expected given the modifications engineered into the INVAC-1 plasmid construct.

### **INVAC-1 induces broad and strong hTERT specific T-cell responses**

CD8 T-cells are known to be essential effectors involved in the elimination of tumor cells while CD4 play a major role in orchestrating the global antitumor response.<sup>17, 18</sup> To evaluate whether DNA vaccination with INVAC-1 could trigger specific CD8/CD4 T-cell-mediated immune responses, C57BL/6 (H2-b) and BALB/c (H2-d) mice and Tg mice (HLA-B7 and

HLA-A2/DR1) were immunized with INVAC-1. Fourteen days after, specific immune responses in spleen were monitored via an IFN- $\gamma$  ELISpot assay using specific hTERT peptides. As shown in Figure 2A, INVAC-1 immunized mice generated a significantly higher hTERT specific CD8 T-cell response than control mice ( $p < 0.01$ ) in all strains. In the same way, a significant CD4 T-cell response restricted to HLA-DRB1 was detected in HLA-A2/DR1 immunized mice in comparison to control mice ( $p < 0.01$ ).

CD4 T helper 1 (Th1), secreting several cytokines such as IFN- $\gamma$ , TNF and IL-2, are particularly important for the induction of efficient cell-mediated immunity against tumors. Consequently, the polarization profile of hTERT specific CD4 T-cells induced in HLA-A2/DR1 after INVAC-1 vaccination was investigated using a cytokine binding assay. Results showed (Fig. 2B) that significant concentrations of IL-2, TNF and IFN- $\gamma$ , Th1 cytokines, but also IL-6 were detected in supernatants from immunized mice in comparison with control mice ( $p < 0.05$ ). Thus, INVAC-1 vaccination is able to promote expansion of hTERT specific CD8 T-cells and specific CD4 T-cells with a predominant Th1 profile.

#### **Prime-boost vaccination enhanced, shortened and broadened hTERT specific responses**

Most vaccination protocols are based on a prime-boost regimen in order to improve the frequency of vaccine specific immune responses. Consequently, the impact of prime-boost vaccination on the generation of hTERT specific CD8 T-cell response was evaluated in C57BL/6 immunized 4 times with INVAC-1. The hTERT specific CD8 T-cell response was monitored in PBMCs over time by an IFN $\gamma$  ELISpot assay using hTERT peptides restricted to H2-Kb/Db (Fig. 3A). hTERT specific CD8 T-cell responses were observed 14 days post-priming (mean # spots: 38,  $p < 0.001$ ). The second vaccination (first boost) shortened the time to generate hTERT specific immune responses (10 days after the boost) although this response was not higher (mean # spots: 40,  $p < 0.001$ ). Interestingly, this immune response was lasting over time since it was still detected at D118 (mean # spots: 9) suggesting the establishment of a memory response. As often observed, following CD8 T-cell activation and expansion, a contraction phase occurs before the generation of a stable memory population.<sup>19</sup> To confirm this hypothesis, mice were vaccinated two more times at D123 and D144. As expected, responses were faster and higher (at D154, mean #spots: 96,  $p < 0.001$ ) confirming the establishment of a hTERT specific CD8 memory response.

The breadth of the specific immune response against the INVAC-1 hTERT protein was studied in a homologous prime-boost approach in HLA-B7 mice immunized with INVAC-1 at D0 and D21. At D31, this immune response was analyzed using 13 pools of overlapping peptides spanning the whole INVAC-1 hTERT sequence by an IFN- $\gamma$  ELISpot assay. As shown in Figure 3B, INVAC-1 immunization induced a broad repertoire of T-cells against numerous hTERT epitopes (at least 13 epitopes) as all peptide pools were able to stimulate T-cells.

### **Generation of hTERT specific cytotoxic CD8 T cell responses**

Having established that the INVAC-1 DNA vaccine was able to induce CD4 and CD8-mediated immunity, it was essential to establish that CD8 T-cells displayed cytotoxic activity. To this aim, we focused on granzyme B (GrB), a key mediator of target cell death secreted by T-cells. The GrB secretion was evaluated using an ELISpot assay in HLA-B7 Tg mice immunized twice. As shown in Figure 4A, a higher frequency of hTERT specific CD8 T-cells secreting GrB was detected in splenocytes from INVAC-1 immunized mice as compared to control mice ( $p < 0.01$ ). In a second step, the *in vivo* cytotoxic activity using CFSE-labelled and peptide-pulsed splenocytes was evaluated in mice by flow cytometry. To this end, C57BL/6 mice were immunized twice and the specific killing activity was evaluated 10 days post-vaccination. There was a decrease of high-labelled CFSE cells pulsed with the immunodominant peptide p660 in INVAC-1 immunized mice as compared to control mice. There was also a slight decrease of medium-labelled CFSE cells pulsed with the subdominant peptide p1034 (Fig. 4B). Approximately 50% of p660 pulsed-cells and 14% of p1034 pulsed-cells were killed in INVAC-1 immunized mice (Fig. 4C).

CTL infiltration in tumors is of paramount importance for the efficiency of cancer immunotherapy approaches. Therefore, the infiltration of hTERT specific CD8 T-cells in tumors was assessed. TC-1 bearing mice were vaccinated at D5 (palpable tumors), sacrificed at D19 and splenocytes, tumor draining lymph nodes cells and tumor infiltrated lymphocytes were isolated and assessed with an IFN- $\gamma$  ELISpot assay using H2-Kb/Db restricted peptides. As shown in Figure 4D, hTERT specific CD8 T-cells were significantly detected in all samples from INVAC-1 immunized mice as compared to control mice ( $p < 0.01$ ) suggesting the capacity of these cells to circulate and migrate into the tumor. Hence, INVAC-1 immunization generated hTERT specific CD8 T cells that exhibited *in vivo* cytotoxic activity probably through the GrB mediated pathway and which can infiltrate the tumor.

### **hTERT specific immune response mediated by INVAC-1 delays tumor growth**

To evaluate whether the INVAC-1-mediated immune response can lead to an anti-tumor effect, mice were implanted with  $2 \times 10^5$  Sarc-2 cells s.c. on D0. On D7 (palpable tumors), D14 and D21 mice were immunized with INVAC-1 or left untreated (Fig. 5A). Individual tumor growth is shown in Figure 5B. INVAC-1 delayed the tumor growth of Sarc-2. At D34, when the majority of mice were still alive, tumor volumes of mice immunized with INVAC-1 were smaller as compared to untreated mice ( $p < 0.01$ ) (Fig. 5C). INVAC-1 also induced a higher survival prolongation (Fig. 5D). Four out of eight INVAC-1-immunized mice were still alive at D41 while all mice in the untreated (NT) group were either dead or euthanized. In conclusion, vaccination with INVAC-1 delayed tumor growth and improved survival rate of tumor-bearing HLA-A2/DR1 mice.

### **Discussion**

With improvements in EGT DNA vaccination have emerged over the past few years as a promising and powerful approach for the treatment of cancer.<sup>10</sup> This approach based on the presentation of multiple antigens through the MHC class I pathway offers numerous advantages over conventional vaccination methods, e.g. no restriction to a limited number of MHC molecules and no knowledge of host haplotype is required prior vaccination.<sup>9</sup>

Human TERT is considered as a near universal tumor antigen for immunotherapy approaches and thus represents a relevant target for such a therapeutic strategy. Indeed, it has been demonstrated that hTERT specific T-cell responses can be induced *in vitro* in HLA-A\*0201 patients with prostate cancer as well as in healthy donors suggesting the existence of T-cell precursors for hTERT which is the fundament for a potential break of the self-tolerance.<sup>6</sup> In addition, previous clinical vaccination strategies using the telomerase antigen as target, such as GV1001 peptide showed induction of a robust hTERT specific immune response in pancreatic and NSCLC cancer with clinical benefits for responding patients.<sup>8</sup> Many groups have demonstrated natural anti-hTERT CTLs and CD4 T-cell responses as Godet et al.<sup>20</sup> These findings justified our choice to develop INVAC-1, a hTERT DNA vaccine for cancer immunotherapy.

INVAC-1 incorporates a number of safety features. Deletion of the VDD triplet ensured a catalytically inactive form of the protein that was essential given that hTERT plays a critical role in tumorigenesis process. The NoLS deletion led to a drastic alteration of its subcellular distribution. In addition, this modified protein was smartly fused to an ubiquitin sequence taking into account the so-called N-end rule (destabilizing residue at N-terminal position) to oriente its degradation through the ubiquitin-dependent proteasome pathway. Protein expression assay showed that INVAC-1 hTERT became an unstable protein rapidly degraded by the proteasome in contrast with wild-type hTERT. Proteasome targeting systems as ubiquitin fusion and N-end rule have been shown to play a key role for efficient proteasomal degradation, and subsequently for antigen presentation through the MHC class I pathway.<sup>21</sup> Considering these approaches, few studies based on ubiquitin-fused DNA vaccine have shown a significant improvement of the antigen-specific cellular immune response.<sup>16</sup>

Several studies were carried out to optimize the immunization procedure for INVAC-1 vaccine delivery (data not shown), especially the EGT process.<sup>13</sup> DNA vaccination through the ID route has been shown to be more efficient than other alternative routes of immunization (intramuscular or subcutaneous).<sup>22</sup> Indeed, skin is easily accessible, presents a large surface for vaccination and constitutes a relevant immunogenic tissue due to a rich network of immunocompetent APCs such as Langerhans cells and dermal DCs.<sup>23</sup> To enhance the immune response elicited by INVAC-1 vaccination, we developed EGT using skin-specific parameters that going to be used in humans with CLINIPORATOR<sup>®</sup>2 (IGEA, Italy).<sup>13</sup>

Numerous studies have demonstrated that CD4 Th1 and CD8 immune responses elicited by DNA vaccination are crucial to mediate efficient antitumor immune responses.<sup>10</sup> INVAC-1 immunization induced high frequency of hTERT specific CD4 and CD8 T-cells producing IFN- $\gamma$  in different mouse strains. These results confirmed that hTERT antigen was well processed *in vivo* through both endogenous and exogenous pathways allowing peptide epitope presentation on numerous MHC class I and class II. We have also shown that hTERT specific CD4 T-cells elicited by INVAC-1 presented a Th1 polarization profile. These results are consistent with other studies demonstrating that the antigen specific CD8 T-cell priming and expansion require the help of antigen specific CD4 Th1.<sup>24</sup> Likewise, Antony et al. demonstrated that the maintenance of antigen specific CD8 T-cells was also dependent on IL-2-secreting CD4 Th1 cells. Furthermore, the secretion of IL-2 supports the establishment

of memory response which has been shown important for improving the frequency of specific T-cells.<sup>25</sup> In this study, we demonstrated that a homologous prime-boost regimen amplified hTERT specific CD8 T-cells by generating a large number of secondary hTERT specific responses and by expanding rapidly the existing antigen specific memory T-cells which encounter the same antigen a second-time round.

The broad response induced by INVAC-1 against numerous hTERT epitopes spanning the entire protein confirmed the advantage of using the full-length antigen as compared to individual epitopes used in peptide vaccine development.<sup>26</sup> By encoding full-length protein, the whole MHC diversity among the human population is expected to be covered while tumor escape mechanisms should be limited. Indeed, during tumor immunoediting, MHC molecules expression or presentation of tumor antigens decrease on tumor cells leading to the generation of variants resistant to immune effector cell.<sup>27</sup>

In some cases, the lack of a consistent correlation between the magnitude of the antigen-specific T-cell response and the control of tumor growth<sup>17, 18</sup> indicates that rather than the quantity of specific T-cells it is necessary to generate polyfunctional effector T-cells.<sup>19</sup> These quality responses depend on their ability to proliferate, migrate, coordinate the immune responses and carry out effector functions by directly killing tumor cells through cytotoxic mechanisms or secretion of cytokines.<sup>28</sup> hTERT specific CD8 T-cells induced by INVAC-1 have the capacity to secrete GrB and kill target cells *in vivo*, as well as to produce IFN- $\gamma$  and TNF (data not shown). These characteristics highlight the quality of hTERT specific CD8 T-cells induced by INVAC-1. Another important consideration is that effector T-cells must efficiently migrate to the tumor microenvironment in order to control malignant progression.<sup>29</sup> Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) secreting perforin and Th1/CTL cytokines with lytic potential have been shown to improve clinical outcomes by inhibiting tumor growth or tumor recurrence in multiple human cancers.<sup>30, 31</sup> In the present study, the presence of circulating and tumor-infiltrating hTERT specific CD8 T-cells with functional characteristics were observed. These results showed that these cells are able to reach primary tumors and probably disseminated metastases. Other investigations such as phenotypic characteristics or cytotoxic strength need to be further assessed in order to evaluate their functional status. Indeed, Appay et al. studied tumor-infiltrated lymphocytes on s.c. lesions obtained from two vaccinated patients. They found that Melan-A-specific CD8 T-cells

infiltrated in the tumor, although activated, appeared with suboptimal functional capacities compared with circulating Melan-A-specific CTL.<sup>32</sup>

Therapeutic vaccination with INVAC-1 delayed the tumor growth of aggressive Sarc-2 tumors in HLA-A2/DR1 transgenic mice expressing human MHC class I and class II. This anti-tumor effect may well be due to hTERT polyfunctional T-cells induced by INVAC-1. Other studies showed that hTERT DNA vaccines induced similar results against TS/A murine breast cancer<sup>33</sup> or murine lung cancer<sup>34</sup> in syngeneic tumor models. Tumors often generate systemic immunodepressed or tolerogenic states which reduce the efficacy of immunotherapy.<sup>35</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-cells (Treg), myeloid-derived suppressor cells in Sarc-2 tumors and a down-regulation of MHC I expression by tumor cells were evidenced in INVAC-1-immunized mice (data not shown). These components of tumor escape mechanisms could prevent complete tumor responses in the Sarc-2 tumor model. In order to circumvent these hurdles, combination strategies need to be considered. Numerous studies showing synergistic anti-tumor effects by combining active immunotherapy with other therapies aimed at either reducing the bulk of tumors (such as chemotherapy or radiotherapy) or potentiating the immune response with drugs against immune checkpoint inhibitors (such as anti-CTLA-4 or anti-PD-1 antibodies). For example, Mkrtychyan et al. showed that a peptide-based vaccine combined with an anti-PD-1 antibody and low-dose of cyclophosphamide induced synergistic antigen-specific immune responses.<sup>36</sup> Likewise, in colon cancer patients, co-administration of a platin-based chemotherapy (oxaliplatin) and a carcinoembryonic antigen peptide pulsed DCs induced a higher level of immune response in patients receiving chemotherapy as compared to patients who did not received.<sup>37</sup>

In conclusion, the pharmacology results presented in this report showed that treatment with INVAC-1 induced a reliable and potent anti-tumor immunity in murine models. Additional data from safety pharmacology, toxicology and biodistribution studies showed that treatment with INVAC-1 was safe and well tolerated. Taken together, these data were considered adequate and reliable to support a First-In-Human phase I study by French competent authorities. The clinical study, evaluating INVAC-1 in patients with advanced cancer, is currently ongoing in 2 clinical centers (<https://clinicaltrials.gov/>).

## **Materials and methods**

### **INVAC-1 plasmid DNA**

INVAC-1 carries a 9 bp deletion that removes three crucial amino residues from the catalytic site along with deletion of the first 47 residues encoding the nucleolar localization sequence (NoLS)<sup>38</sup> which was replaced by the ubiquitin polypeptide (Ubi; 76 aa) according to the ubiquitin-fusion approach<sup>39</sup> (Fig. 1A). The modified hTERT sequence was *de novo* synthesized by GeneCust (Luxembourg) and subcloned into the NTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI vector backbone designed by Nature Technology Corporation (Lincoln, Nebraska).<sup>40</sup> INVAC-1 plasmid was amplified through an antibiotic-free selection procedure in NTC4862 *E. coli* cells<sup>41</sup> (DH5 $\alpha$  att $\lambda$ ::P5/6 6/68-RNA-IN-SacB, catR). GLP and GMP batches of INVAC-1 were manufactured by Eurogentec (Belgium) and used at a final concentration of 2 mg/mL.

### **Cell lines**

HEK293T (from the ATCC) and CrFK (Crandell Rees feline kidney) cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco®) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin/streptomycin. QT6 cells (Japanese quail fibrosarcoma cell line) were cultured in HAM's F10 medium (Eurobio, Courtaboeuf, France) supplemented with 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin, 1% chicken serum, 1% L-glutamine and 0.5% tryptose broth. TC-1 is a murine lung epithelial cell line immortalized with HPV16 E6/E7, and transformed with the c-Ha-ras oncogene. This cell line was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin, 20 mM HEPES, 0.4 mg/mL G418 and 0.2 mg/mL hygromycin B. The Sarc-2 cell line was derived from a spontaneous murine sarcoma that was histologically characterized as a leiomyosarcoma (malignant mesenchymal tumor) obtained from HLA-A2/DR1 mice. Sarc-2 cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin at 37°C.

### ***In vitro* characterization of INVAC-1 hTERT protein**

To assess protein expression, HEK293T cells were transfected either with INVAC-1, the empty NTC vector as negative control and a vector expressing wild type hTERT (pTRIP-CMV-hTERT) as positive control using jetPrime transfection reagent (Polyplus-transfection Inc., France). Cells were harvested from 18 to 96 hours post-transfection, lysed in a specific RIPA buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and

expression assessed by Western blotting assay. hTERT proteins were detected using a primary rabbit monoclonal anti-hTERT antibody (Abcam, Cambridge, UK) followed by a secondary goat anti-rabbit antibody-horseradish peroxidase (HRP) conjugate (Cell Signaling, Danvers, USA).  $\beta$ -actin protein was used as loading control. Peroxidase activity was detected using a chemiluminescence ECL HRP substrate reagent kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

For sub-cellular localization, QT6 cells were transfected for 24 hours using Fugene HD transfection reagent (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). After fixation, permeabilization and blocking steps, cells were incubated with a rabbit monoclonal anti-hTERT antibody for 1.5 hours followed by a goat anti-rabbit antibody-Alexa Fluor 488® conjugate (Life Technologies, Saint-Aubin, France) for 45 minutes at room temperature. After washes, samples were mounted in DAPI-containing mounting medium (VECTASHIELD®). Slides were analyzed by fluorescent microscopy (Axio observer Z1 and Axiovision, Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

*In vitro* telomerase activity was assessed on total cell protein extracts from CrFK cells transfected 24 h with DNA plasmids using the TeloTAGGG Telomerase PCR ELISAPLUS kit according manufacturer's instructions (Roche Diagnostic GmbH Mannheim, Germany). Briefly, protein extracts were used to evaluate the telomerase-mediated elongation of telomeric sequences. Products were amplified by PCR (30 cycles) using biotinylated primers. PCR amplification products were transferred to streptavidin pre-coated microplate, incubated with an anti-digoxigenin HRP linked antibody and revealed using TMB substrate. Absorbance was measured against a blank at 450 nm to determine the level of telomerase activity in each sample. The relative telomerase activity (RTA) was obtained using the following formula:

$$RTA = [(AS-AS0)/AS,IS]/[(ATS8-ATS8,0)/ATS8,IS] \times 100$$

where AS: sample absorbance; AS0: heat-treated sample absorbance; AS,IS: internal standard sample absorbance; ATS8: control template absorbance; ATS8,0: lysis buffer (TS8) absorbance; ATS8,IS: TS8 IS absorbance.

### **Immunization procedure**

Female 6-week-old C57BL/6JRj and BALB/cJRj mice were purchased from Janvier laboratories (Saint-Berthevin, France). HLA-B7 and HLA-A2/DR1 transgenic (Tg) mice have been previously described.<sup>42, 43</sup> and provided from the Institut Pasteur animal breeding facility. All experiments were conducted in strict accordance with the ethical guidelines and

good animal practices of the European Committee (Directive 2010/63/EU) and were approved by the registered CETEA of Institut Pasteur committees on ethics in animal experimentation N°89 under the reference 2013-0026. Mice were immunized by intradermal (ID) injection with 100 µg in 50 µL (bilateral injection of 25 µL) of INVAC-1 or NTC empty plasmid or PBS, both as control, at the base of the tail (bilateral injections). Immediately after ID injection, EGT was performed using CLINIPORATOR® 2 (IGEA, Carpi, Italy); one High Voltage (HV) pulse (100 µs duration; 1,250 V/cm) followed 1,000 ms later by one Low Voltage (LV) pulse (400 ms duration; 180 V/cm) were applied with non-invasive plate electrodes (P-30-8G, IGEA). According to the experiment and vaccine regimen, mice could receive several administrations of DNA or control.

### **Synthetic hTERT peptides**

H2 and HLA-A\*0201 restricted INVAC-1 peptides were determined *in silico* using four online algorithms (Syfpeithi, <http://www.syfpeithi.de/>; Bimas, <http://www-bimas.cit.nih.gov/>; NetMHCpan and SMM, <http://tools.immuneepitope.org/main/>). The HLA-B\*0702 and HLA-DRB1 restricted hTERT peptides used in this study have been previously described.<sup>20,44,45</sup> Synthetic lyophilized (>90% purity) peptides were purchased from Proimmune (Oxford, UK) or GenScript (Piscataway, USA). The INVAC-1 hTERT peptide library (>70% purity) used to ascertain the breadth of immune response was purchased from GenScript. Thirteen pools of peptides spanning the entire INVAC-1 hTERT protein were used. Each pool was composed of ten peptides of 15-mers overlapping by 11 amino acids. All peptides were dissolved in sterile water at 2 mg/mL. Details of peptide sequences and MHC restriction are shown in Table 1 and Table 2.

### **IFN-γ and Granzyme B ELISpot assay**

Murine IFN-γ and Granzyme B ELISpot kits were purchased from Diaclone (Eurobio, Courtaboeuf, France) and R&D systems (Bio-Techne, Lille, France) respectively. They were used with Ficoll-purified lymphocytes from peripheral blood, spleen, tumor or tumor draining lymph nodes following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were stimulated in triplicates at  $2 \times 10^5$  cells/well with pools of restricted hTERT peptides at 5 µg/mL. Serum-free medium and phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-ionomycin were used as negative and positive controls respectively. Spots were counted using the Immunospot ELISpot counter and software (Cellular Technology Limited, Bonn, Germany).

### **Cytokine secretion**

Cytometric Bead Arrays Mouse Th1/Th2/Th17 kit (CBA, BD biosciences) was used following manufacturer instructions for simultaneous detection of seven cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-17A, and IL-10). Briefly, splenocytes from HLA-A2/DR1 immunized mice were stimulated with specific HLA-DRB1-restricted hTERT peptides (UCP2, UCP3 and UCP4) at 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , for 24 h at 37°C. Cell supernatants were collected and processed. Flow cytometry acquisition was done using the FACScan LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences). Quantitative results were generated using the FCAP Array TM Software version 3.0 (Becton Dickinson).

### ***In vivo* cytotoxicity assay**

The capacity of CD8 cytotoxic T-cells to kill peptide-loaded target cells *in vivo* was assessed as described previously.<sup>46</sup> Briefly, splenocytes from naive C57BL/6 mice were split into three equal parts and each part was stained with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) at 5  $\mu\text{M}$  (high concentration), 1  $\mu\text{M}$  (medium) or 0.2  $\mu\text{M}$  (low). Subsequently, CFSE<sup>high</sup>-labeled cells were pulsed with the immunodominant hTERT p660 peptide and CFSE<sup>medium</sup>-labeled cells were pulsed with the subdominant p1034 hTERT peptide for 1.5 hours whereas CFSE<sup>low</sup>-labeled cells were left unpulsed. Cells were mixed in a 1:1:1 ratio and  $6 \times 10^6$  cells were i.v. injected in 50  $\mu\text{L}$  of PBS into control or INVAC-1 immunized mice 10 days after the second immunization. Fifteen hours later, single-cell suspensions from spleens were analyzed by MACSQUANT® flow cytometer (Miltenyi, Germany). The percentage of specific killing was determined as follows:

$$[1 - [\text{mean} (\% \text{CFSE}^{\text{low}} / \text{CFSE}^{\text{high or medium}})_{\text{CONTROL}} / (\% \text{CFSE}^{\text{low}} / \text{CFSE}^{\text{high or medium}})_{\text{IMMUNIZED}}]] \times 100.$$

### ***In vivo* anti-tumor assessment**

For therapeutic vaccination experiments, 8 to 18-week-old HLA-A2/DR1 mice were subcutaneously engrafted with  $2 \times 10^5$  Sarc-2 cells on the right abdominal flank. When, tumors were palpable, animals were randomized and immunized with INVAC-1 at D7, D14 and D21 post-engraftment or left untreated. Twice a week, tumor growth was monitored using a caliper and mouse weight was individually followed. Mice were euthanized when tumors reached 2000  $\text{mm}^3$ . The guidelines for the welfare and use of animals in cancer research were followed, especially for monitoring of clinical signs necessitating immediate intervention.<sup>47</sup>

Tumor volume was calculated using the following formula:  $(L \cdot l^2)/2$  (L=length; l=width). Results are expressed in mm<sup>3</sup>.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed by a two-tailed Mann Whitney non-parametric test using GraphPad prims 6.0 software (GraphPad Software Inc, USA). P-values of  $\leq 0.05$  were considered significant.

### **Acknowledgments**

We would like to thank Shannon A. Fairbanks and Bernardo Fort Brescia for their unwavering support. The authors would also like to thank the staff of the Institut Pasteur's animal facilities and imaging platform. We also thank Pr. Lluís Mir from Gustave-Roussy for his knowledge on electroporation. This work was funded in part by the Paris Region "IDF" and Medicen Cluster in the context of the 12<sup>th</sup> FUI. EP was supported by an industrial PhD fellowship from the ANRT.

### **References**

1. Novellino L, Castelli C, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunology Immunotherapy* 2005; 54:187-207.
2. Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene* 2002; 21:564-79.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-74.
4. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer* 1997; 33:787-91.
5. Zhu CQ, Cutz JC, Liu N, Lau D, Shepherd FA, Squire JA, et al. Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 2006; 94:1452-9.

6. Zanetti M, Hernandez X, Langlade-Demoyen P. Telomerase reverse transcriptase as target for anti-tumor T cell responses in humans. *Springer Seminars in Immunopathology* 2005; 27:87-104.
7. Beatty GL, Vonderheide RH. Telomerase as a universal tumor antigen for cancer vaccines. *Expert Review of Vaccines* 2008; 7:881-7.
8. Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer* 2008; 8:167-79.
9. Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, Belyakov IM, Ahlers JD, Janik JE, et al. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 2004; 113:1515-25.
10. Rice J, Ottensmeier CH, Stevenson FK. DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nature Reviews Cancer* 2008; 8:108-20.
11. Fioretti D, Iurescia S, Fazio VM, Rinaldi M. DNA vaccines: developing new strategies against cancer. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2010; 2010:174378.
12. Liu MA. DNA vaccines: a review. *Journal of Internal Medicine* 2003; 253:402-10.
13. Calvet CY, Thalmensi J, Liard C, Pliquet E, Bestetti T, Huet T, et al. Optimization of a gene electrotransfer procedure for efficient intradermal immunization with an hTERT-based DNA vaccine in mice. *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development* 2014; 1:14045.
14. Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics* 2008; 9:776-88.
15. Drosopoulos WC, Prasad VR. The active site residue Valine 867 in human telomerase reverse transcriptase influences nucleotide incorporation and fidelity. *Nucleic Acids Research* 2007; 35:1155-68.
16. Wang Q, Lei C, Wan H, Liu Q. Improved cellular immune response elicited by a ubiquitin-fused DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis*. *DNA and Cell Biology* 2012; 31:489-95.
17. Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nature Medicine* 1999; 5:677-85.
18. Dunbar PR, Smith CL, Chao D, Salio M, Shepherd D, Mirza F, et al. A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response. *Journal of Immunology* 2000; 165:6644-52.

19. Palucka K, Ueno H, Banchereau J. Recent developments in cancer vaccines. *Journal of immunology* 2011; 186:1325-31.
20. Godet Y, Fabre 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. *Clinical Cancer Research* 2012; 18:2943-53.
21. Andersson HA, Barry MA. Maximizing antigen targeting to the proteasome for gene-based vaccines. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2004; 10:432-46.
22. Endmann A, Baden M, Weisermann E, Kapp K, Schroff M, Kleuss C, et al. Immune response induced by a linear DNA vector: influence of dose, formulation and route of injection. *Vaccine* 2010; 28:3642-9.
23. Nicolas JF, Guy B. Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. *Expert review of vaccines* 2008; 7:1201-14.
24. Elnekave M, Furmanov K, Hovav AH. Intradermal naked plasmid DNA immunization: mechanisms of action. *Expert review of vaccines* 2011; 10:1169-82.
25. Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarlı A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, et al. CD8<sup>+</sup> T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4<sup>+</sup> T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *Journal of Immunology* 2005; 174:2591-601.
26. 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. *Clinical Cancer Research* 2004; 10:4688-98.
27. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007; 121:1-14.
28. Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nature Reviews Immunology* 2008; 8:247-58.
29. Fisher DT, Chen Q, Appenheimer MM, Skitzki J, Wang WC, Odunsi K, et al. Hurdles to lymphocyte trafficking in the tumor microenvironment: implications for effective immunotherapy. *Immunological Investigations* 2006; 35:251-77.
30. 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.

31. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102:18538-43.
32. Appay V, Jandus C, Voelter V, Reynard S, Coupland SE, Rimoldi D, et al. New generation vaccine induces effective melanoma-specific CD8+ T cells in the circulation but not in the tumor site. *Journal of Immunology* 2006; 177:1670-8.
33. Yamano T, Kaneda Y, Hiramatsu SH, Huang S, Tran AN, Giuliano AE, et al. Immunity against breast cancer by TERT DNA vaccine primed with chemokine CCL21. *Cancer Gene Therapy* 2007; 14:451-9.
34. Yan J, Pankhong P, Shin TH, Obeng-Adjei N, Morrow MP, Walters JN, et al. Highly optimized DNA vaccine targeting human telomerase reverse transcriptase stimulates potent antitumor immunity. *Cancer Immunology Research* 2013; 1:179-89.
35. De Pas T, Giovannini M, Rescigno M, Catania C, Toffalorio F, Spitaleri G, et al. Vaccines in non-small cell lung cancer: rationale, combination strategies and update on clinical trials. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2012; 83:432-43.
36. Mkrtichyan M, Najjar YG, Raulfs EC, Abdalla MY, Samara R, Rotem-Yehudar R, et al. Anti-PD-1 synergizes with cyclophosphamide to induce potent anti-tumor vaccine effects through novel mechanisms. *European journal of immunology* 2011; 41:2977-86.
37. Lesterhuis WJ, de Vries IJ, Aarntzen EA, de Boer A, Scharenborg NM, van de Rakt M, et al. A pilot study on the immunogenicity of dendritic cell vaccination during adjuvant oxaliplatin/capecitabine chemotherapy in colon cancer patients. *British Journal of Cancer* 2010; 103:1415-21.
38. Yang Y, Chen Y, Zhang C, Huang H, Weissman SM. Nucleolar localization of hTERT protein is associated with telomerase function. *Experimental Cell Research* 2002; 277:201-9.
39. Bachmair A, Finley D, Varshavsky A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 1986; 234:179-86.
40. Carnes AE, Luke JM, Vincent JM, Anderson S, Schukar A, Hodgson CP, et al. Critical design criteria for minimal antibiotic-free plasmid vectors necessary to combine robust RNA Pol II and Pol III-mediated eukaryotic expression with high bacterial production yields. *The Journal of Gene Medicine* 2010; 12:818-31.
41. Luke J, Carnes AE, Hodgson CP, Williams JA. Improved antibiotic-free DNA vaccine vectors utilizing a novel RNA based plasmid selection system. *Vaccine* 2009; 27:6454-9.

42. Pajot A, Michel ML, Fazilleau N, Pancre V, Auriault 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. *European Journal of Immunology* 2004; 34:3060-9.
43. Rohrlich PS, Cardinaud S, Firat H, Lamari M, Briand P, Escriou N, et al. HLA-B\*0702 transgenic, H-2KbDb double-knockout mice: phenotypical and functional characterization in response to influenza virus. *International Immunology* 2003; 15:765-72.
44. 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. *Clinical Cancer Research* 2006; 12:3158-67.
45. Cortez-Gonzalez X, Sidney J, Adotevi O, Sette A, Millard F, Lemonnier F, et al. Immunogenic HLA-B7-restricted peptides of hTERT. *International immunology* 2006; 18:1707-18.
46. Durward M, Harms J, Splitter G. Antigen specific killing assay using CFSE labeled target cells. *Journal of Visualized Experiments* 2010.
47. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* 2010; 102:1555-77.

## Figure legends

### Figure 1. *In vitro* characterization of INVAC-1 hTERT protein

(A) Schematic maps and alignments of wild-type hTERT and INVAC-1 hTERT proteins. VDD: deletion in catalytic site at position AAs 867-869. NoLS: Nucleolar Localization Signal. Ubi: ubiquitin, F/R/G: Amino acids flanking the NoLS to Ubi substitution.

(B) Expression kinetics of wild-type hTERT and INVAC-1 hTERT protein monitored from 18 to 96h post-transfection into HEK293T cells. hTERT protein detection was performed using an anti-hTERT rabbit monoclonal antibody. NTC: Empty vector backbone as negative control.  $\beta$ -actin protein detection was used as a loading control assessment.

(C) Intracellular localization of wild-type hTERT and INVAC-1 hTERT proteins in transfected QT6 cells visualized 24h post-transfection with an anti-hTERT rabbit monoclonal antibody and a goat anti-rabbit secondary antibody-Alexa Fluor 488® conjugate (green fluorescence). NTC: Empty vector backbone as negative control. NT: Non-transfected cells. The nuclei were

stained with DAPI (blue). The cells were analyzed for both fluorescence wavelengths (merged) upon fluorescence microscopy (x63). **(D)** Neutralization of INVAC-1 telomerase catalytic activity. Total cell proteins were extracted from wild-type hTERT and INVAC-1 transfected CrFK cells and telomerase activity was assessed by Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) assay. Relative Telomerase Activity (RTA; sample/positive control ratio) of INVAC-1 compared to wild-type hTERT and non-treated (NT) CrFK cells are displayed (n = 3 for 2.1 µg of total protein samples) using absorbance measurements values (OD450/690 nm). Mann-Whitney non parametric test against non-treated CrFK cells, \*\*p<0.01.

**Figure 2. INVAC-1 induces hTERT specific T-cell responses in mice**

**(A)** C57BL/6 mice (6 mice per group), BALB/c mice (6-7 mice per group), HLA-B7 mice (4-6 mice per group) and HLA-A2/DR1 mice (5-6 mice per group) were immunized once. Fourteen days later, an IFN-γ ELISpot assay was performed with splenocytes stimulated with a pool of hTERT restricted peptides according to mouse MHC. IFN-γ hTERT specific CD8 or CD4 T-cells/200,000 splenocytes are represented as mean ± SD. Mann-Whitney non parametric test against mice control, \*\*p<0.01. **(B)** HLA-A2/DR1 mice (3-5 mice per group) were immunized twice (prime-boost) with INVAC-1 (D0 and D21). At D31, splenocytes were Ficoll purified and stimulated with a pool of 3 hTERT specific peptides restricted to HLA-DRB1. Supernatants from stimulated cells were recovered and tested in a cytokine binding assay in order to evaluate the concentration of Th1, Th2 and Th17 cytokines secreted by hTERT specific CD4 T-cells. Cytokine concentrations in pg/mL are represented as mean ± SD. Mann-Whitney non parametric test against mice control, \*p<0.05.

**Figure 3. Prime-boost vaccination enhanced, shortened and broadened hTERT-specific T-cell responses**

**(A)** Ten C57BL/6 mice were immunized four times with INVAC-1 (D0, D21, D123 and D144). Peripheral blood was collected before the first immunization D0, and at D7, D14, D21, D33, D40, D118, D132, D139, D154, D159 and D166. PBMCs were Ficoll purified and stimulated with a pool of 4 hTERT specific peptides restricted to the H2-Kb/Db and analyzed by an IFN-γ ELISPOT assay. Black arrows represent days of vaccination. IFN-γ hTERT specific CD8 T-cells/200,000 PBMCs are represented as mean ± SD. Mann-Whitney non parametric test against D0, \*p < 0.05. **(B)** Seven to 13-weeks-old C57BL/6 mice (6 mice per group) were immunized twice (D0 and D21). At D31, splenocytes were Ficoll purified and

stimulated with 13 pools of hTERT 15-mer overlapping peptides (10 peptides/pool) and analyzed by an IFN- $\gamma$  ELISPOT assay. IFN- $\gamma$  hTERT specific T-cells /200,000 splenocytes are represented as mean  $\pm$  SD.

**Figure 4. INVAC-1 induces hTERT specific cytotoxic T-cells**

(A) HLA-B7 mice (4-6 mice per group), were immunized twice (D0 and D21). At D31, an ELISpot granzyme B (GrB) assay was performed with splenocytes stimulated with a pool of hTERT HLA-B7 restricted peptides. GrB hTERT specific CD8 T-cells/200,000 splenocytes are represented as mean  $\pm$  SD. Mann-Whitney non parametric test against mice control, \*\*p<0.01. (B) C57BL/6 mice (8 mice per group) were immunized twice (D0 and D21). At D31, syngeneic splenocytes, pulsed with individual hTERT peptides restricted to the H2-Kb/Db (either p660 or p1034) were labeled with CFSE and injected IV to immunized mice. After 15-18 hours, the disappearance of peptide-pulsed cells in spleens was analyzed by flow cytometry. (C) Percent of killing was presented as mean  $\pm$  SD. (D) C57BL/6 mice (6 mice per group) were injected s.c. in the right flank with  $2 \times 10^5$  TC-1 cells. On day 5 (when tumors are palpable), mice were immunized with INVAC-1 or left untreated (NT). Fourteen days later, mice were sacrificed and splenocytes, tumor draining lymph nodes and tumor infiltrated lymphocytes were isolated. An ELISpot IFN- $\gamma$  was performed with H2-Kb/Db restricted peptides (p429, p660, p1021 and p1034). IFN- $\gamma$  hTERT specific CD8 T-cells/200,000 cells are represented as mean  $\pm$  SD. Mann-Whitney non parametric test \*\*p<0.01.

**Figure 5. INVAC-1 induces potent antitumor immunity**

(A) HLA-A2/DR1 mice (8-9 mice per group) were injected s.c. in the right flank with  $2 \times 10^5$  Sarc-2 cells. On days 7 (when tumors are palpable), D14 and D21, mice were immunized with INVAC-1 or left untreated (NT). Tumor sizes were measured twice a week. (B) Plots represent tumor volume growth kinetics of individual mice for both groups. (C) Tumor volumes of individual mice on day 34, when the majority of mice were still alive. Tumor volumes are represented as mean  $\pm$  SD. Mann-Whitney non parametric test \*\*p<0.01. (D) Kaplan-Meier plot of overall survival.

## Tables

**Table 1. hTERT and INVAC-1 peptides**

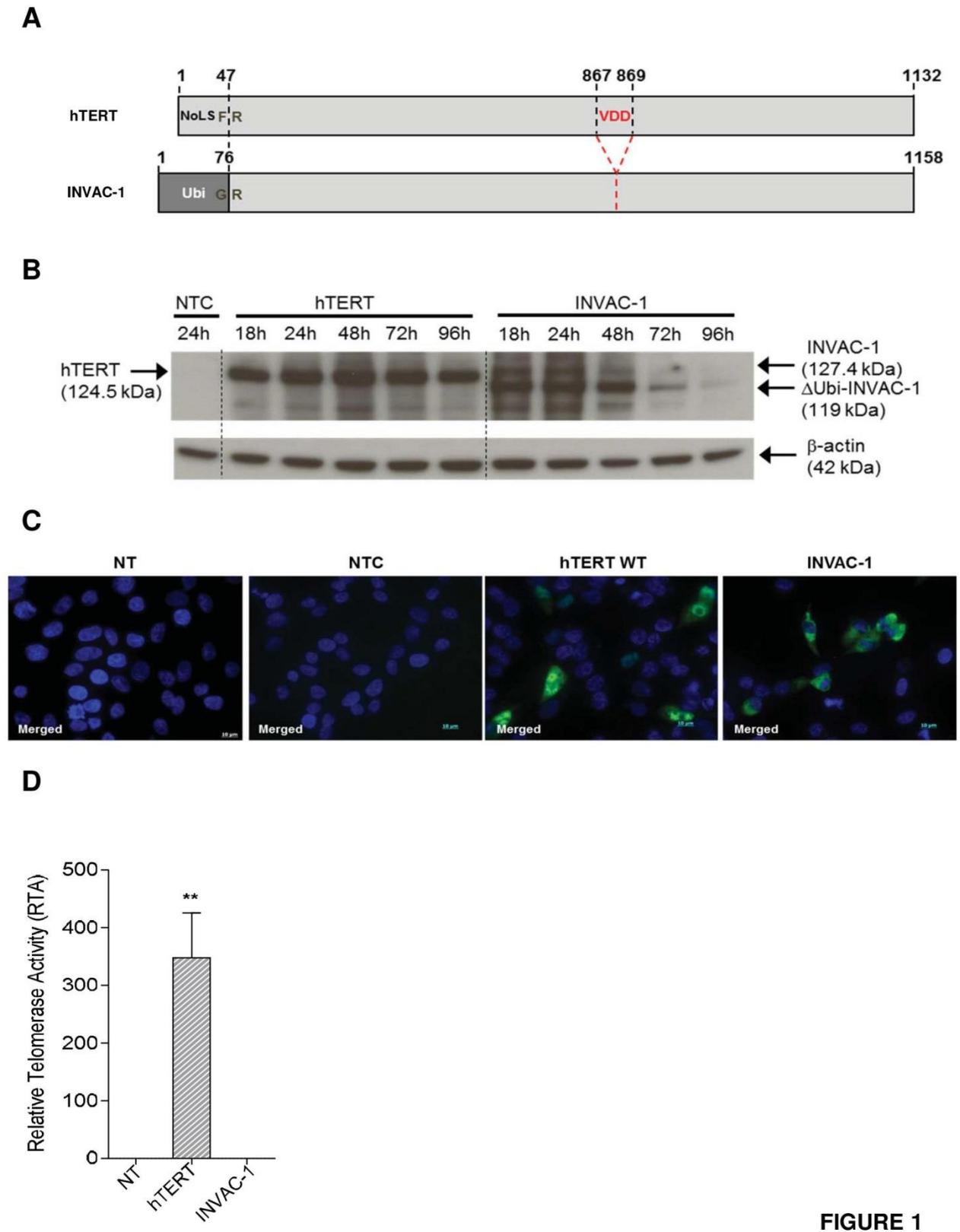
Peptide	Sequence	MHC	Numbered to	Mouse strain
p429	HAQCPYGVL	H2-Kb	INVAC-1	C57BL/6
p1034	QAYRFHACVL			
p660	RPIVNM DYV	H2-Db		
p1021	QTVCTNIYKI			
p196	AYQVCGPPL	H2-Kd	INVAC-1	BALB/c
p414	RYWQMRPL			
p853	SYVQCQGI			
p114	TYVPLLGS L			
p277 <sup>44</sup>	RPAAEATSL	HLA-B*0702	hTERT	HLA-B7
p351 <sup>44</sup>	RPSLTGARRL			
p1123 <sup>45</sup>	LPSDFK TIL			
p181	LLARCALFVL	HLA-A*0201	INVAC-1	HLA-A2/DR1
p576	WLMSVYVVEL			
p801	YMRQFVAHL			
p959	LLDTRTLEV			
UCP2 <sup>20</sup>	KSVWSKLQSIGIRQH	HLA-DR	hTERT	
UCP3 <sup>20</sup>	GTA FVQMPAHGLFPW			
UCP4 <sup>20</sup>	SLCYSILKAKNAGMS			

Following H2 and HLA-A\*0201 restricted INVAC-1 peptides have been predicted *in silico*; HLA-B\*0702 and HLA-DRB1 restricted hTERT peptides were previously described.<sup>20, 44, 45</sup> Peptides were used either in ELISpot assay, CBA or *in vivo* cytotoxicity assay according to the strains of mouse.

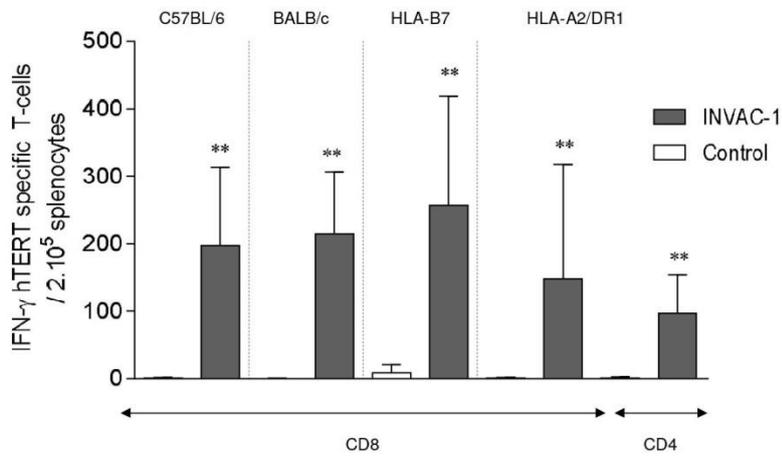
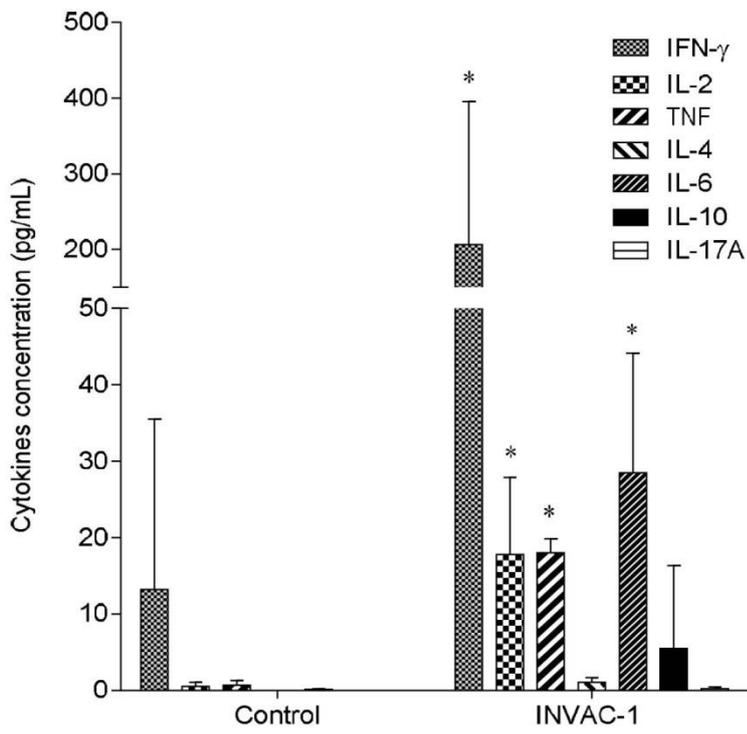
**Table 2. Pools of INVAC-1 hTERT overlapping peptides**

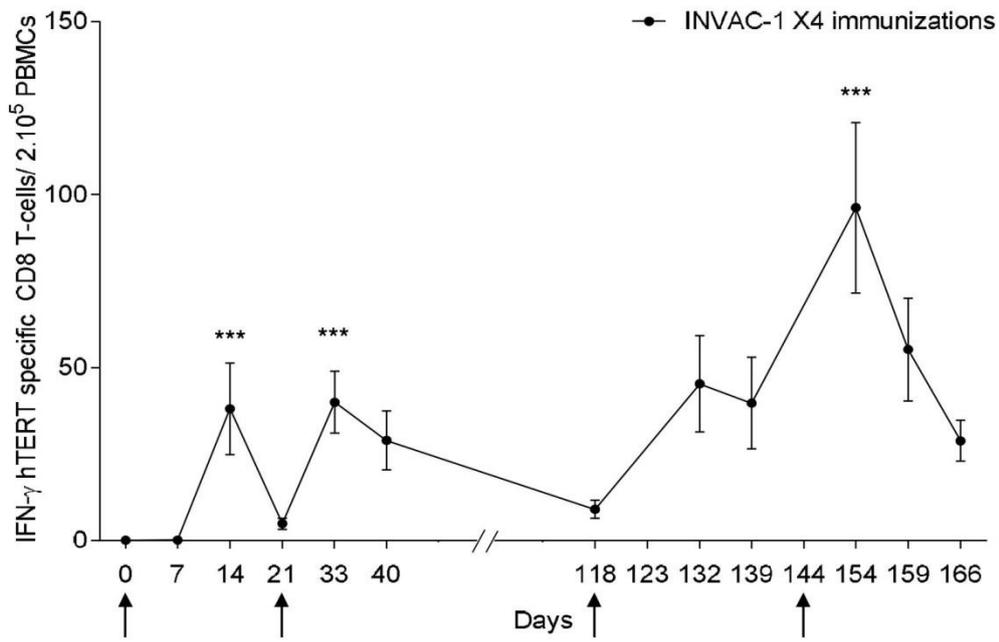
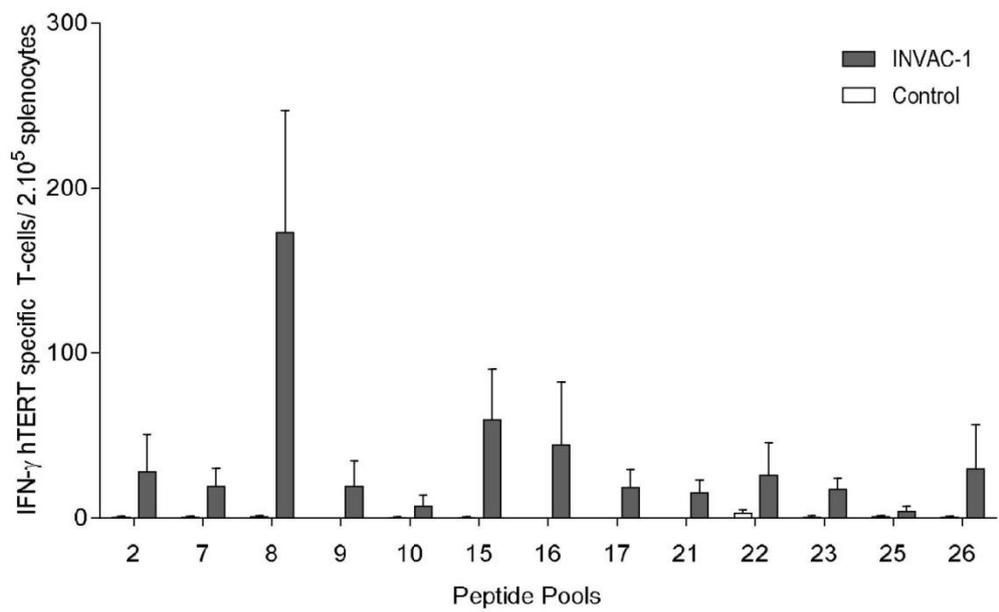
Pool	INVAC-1 hTERT sequence covered by pool	Peptides
P2	LCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWG	p11 to p20
P7	ALSGTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDK	p61 to p70
P8	TKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRR	p71 to p80
P9	SRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAA	p81 to p90
P10	LLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPOGSVAAPEEEDTDPRLVQLLRQHSSP	p91 to p100
P15	QHREARPALLETSLRFIPKPDGLRPIVNM DYVVGARTFRREKRAERLTSRV	p141 to p150
P16	EKRAERLTSRVKALFVNLNERARRPGLLGASVLGLDDIHRWRTFVLRVR	p151 to p160
P17	RAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNT	p161 to p170
P21	DMENKLFAGIRRDGLLLRLFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLR	p201 to p210
P22	VPEYGCVVNLRKTVVNFVVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLE	p211 to p220
P23	CGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGLRLK	p221 to p230
P25	RFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGA	p241 to p250
P26	NAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGSRLTAQT	p251 to p260

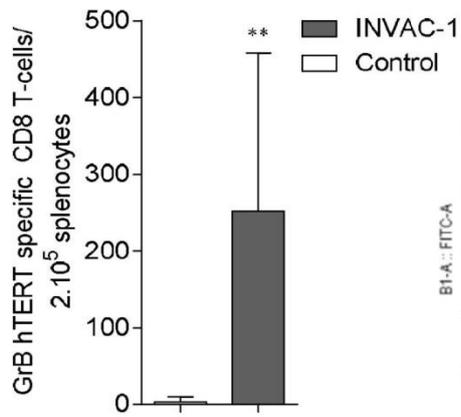
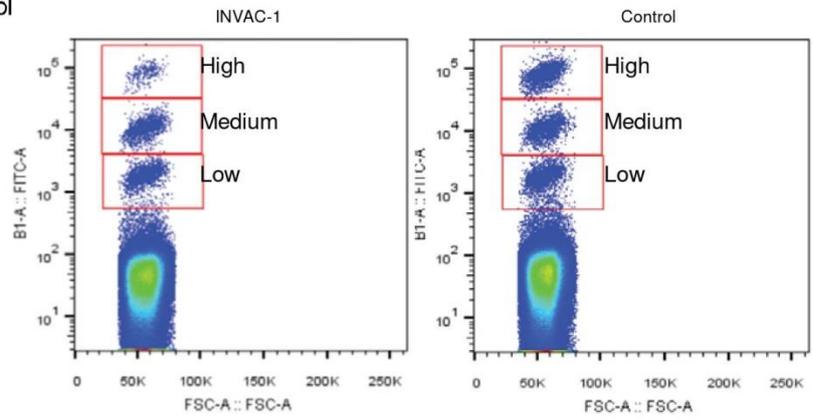
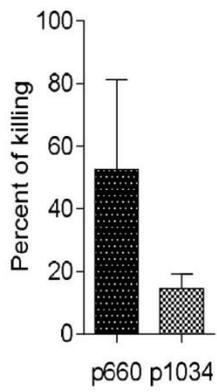
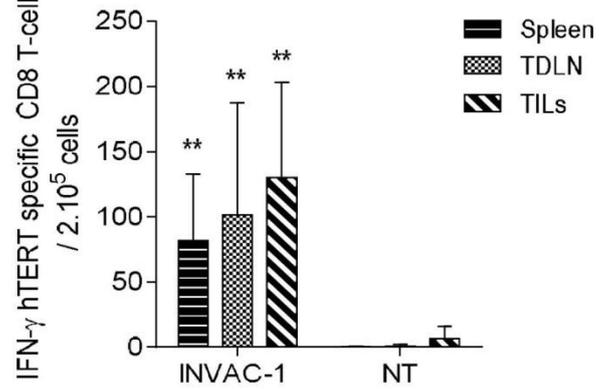
Thirteen pools of INVAC-1 hTERT peptides spanning the whole protein were used for the breadth of immune response and were composed of ten peptides of 15-mers overlapping by 11 AAs.

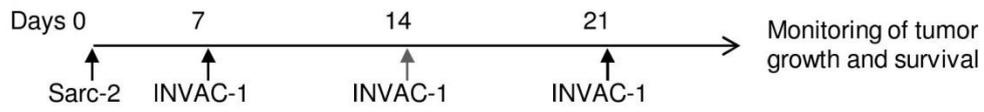
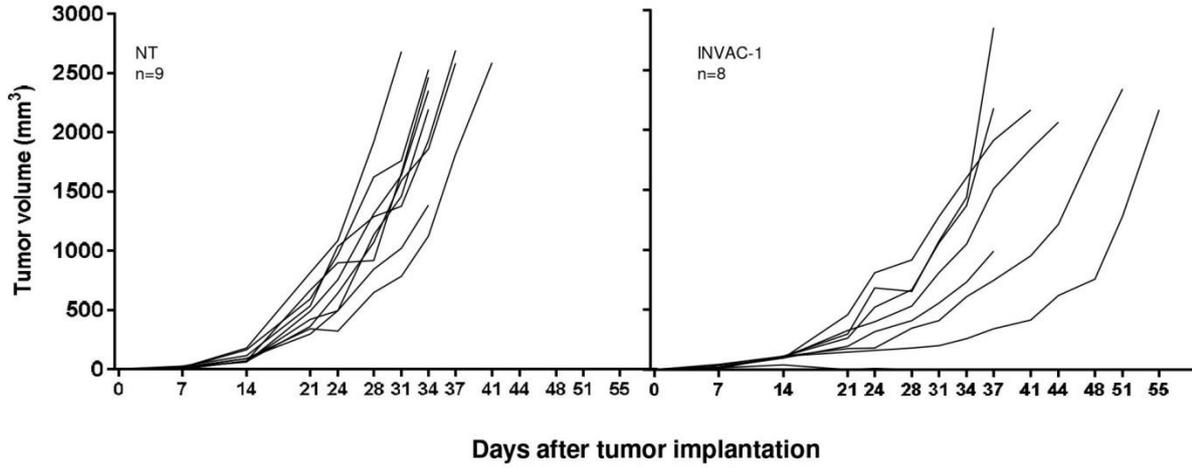
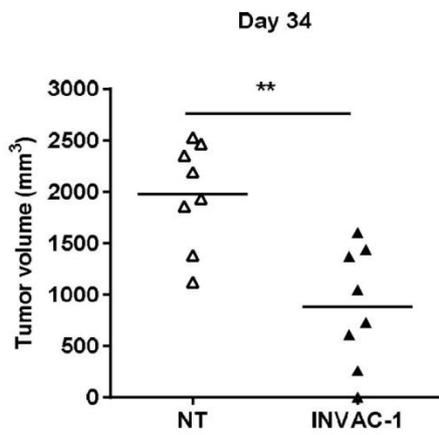
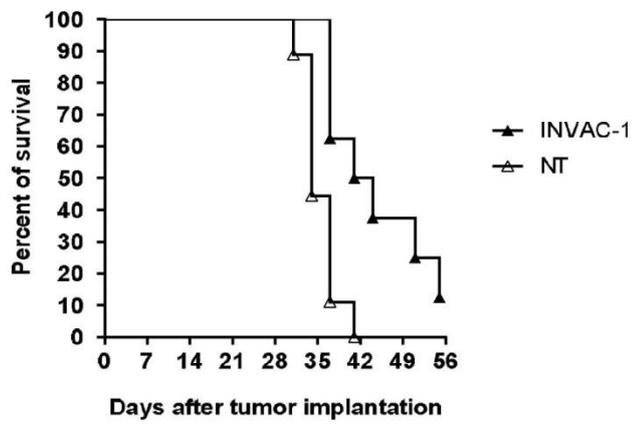


**FIGURE 1**

**A****B****FIGURE 2**

**A****B****FIGURE 3**

**A****B****C****D****FIGURE 4**

**A****B****C****D****FIGURE 5**



## 2. Vaccins réarrangés dérivés d'INVAC-1 : Scrambled et Inverted

### But :

Développer des constructions dérivées d'INVAC-1 hTERT réarrangées dans le but d'améliorer la présentation antigénique d'épitopes multiples de hTERT et démontrer leur capacité à induire des réponses cytotoxiques spécifiques de hTERT.

### Méthodes :

Les travaux menés sur ces dérivés ont été réalisés en suivant la même méthodologie que celle utilisée pour INVAC-1. La détection des protéines en western blot ou immunofluorescence a été réalisée en utilisant un anticorps monoclonal murin anti-V5 (GKPIPPLLGLDST, Invitrogen, Carlsbad, USA). Les études d'immunogénicité et de cytotoxicité ont été réalisées sur le modèle murin transgénique HLA-B7 et par conséquent avec les peptides hTERT restreints à HLA-B7. Le protocole de vaccination utilisé pour ces dérivés est identique à celui employé pour INVAC-1 (100 µg ADN ID + EGT).

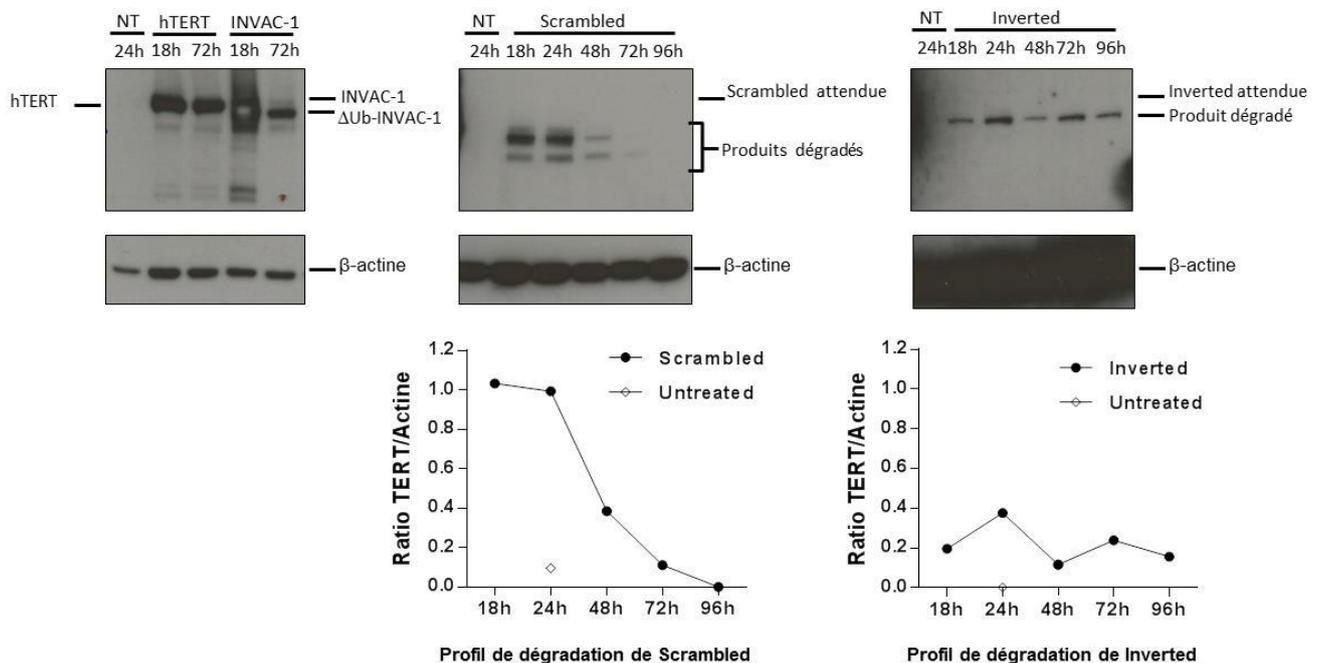
### Résultats :

Les travaux réalisés et les données obtenues sur les dérivés du vaccin ADN INVAC-1 sont aussi intégrés au brevet **A telomerase encoding DNA vaccine** ; PCT/EP2014/073164 (cf. Annexes) et sont détaillés ci-après.

### 2.1. Dégradation des dérivés réarrangés d'INVAC-1 par la voie du protéasome

L'expression des protéines Scrambled et Inverted a été mesurée entre 18 h et 96 h post-transfection dans les cellules HEK293T en comparaison des protéines hTERT naturelle et INVAC-1 (Figure 33, haut). Les bandes observées pour la protéine hTERT naturelle et la protéine INVAC-1 correspondent à leur profil attendu (expression décrite dans l'article #2), respectivement une protéine hTERT non modifiée d'approximativement 124,5 kDa avec une expression stable et deux formes protéiques pour INVAC-1 (approximativement 127,4 kDa et 119 kDa) dégradées au cours du temps. Les protéines Scrambled and Inverted ont été

détectées au cours du temps uniquement sous la forme de produits dégradés (taille inférieure à leur taille approximative attendue 130,2 kDa). En effet, entre 1 à 3 bandes spécifiques sont obtenues suggérant la dégradation très rapide des protéines juste après leur synthèse. De plus, l'intensité du signal de ces produits dégradés normalisée par rapport à l'intensité de la  $\beta$ -actine (analyse ImageJ) souligne la dégradation protéique et/ou la perte d'expression protéique au cours du temps notamment pour les produits dégradés de Scrambled (Figure 33, bas).



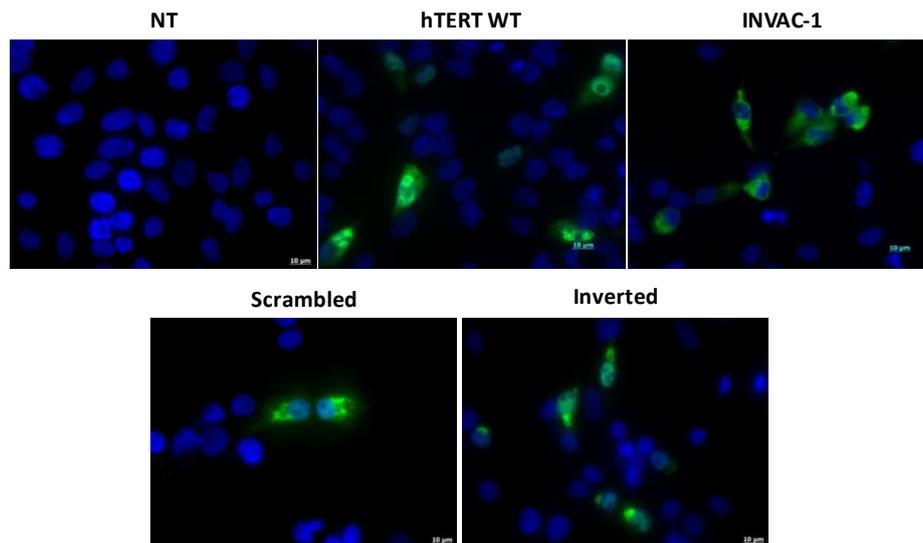
**Figure 33 : Expression in vitro de protéines hTERT, INVAC-1, Scrambled et Inverted**

Les différents plasmides ont été transfectés dans des cellules HEK293T et l'expression protéique a été évaluée de 18 h à 96 h post-transfection. (Partie haute) hTERT et INVAC-1 ont été utilisés comme contrôle d'expression protéique et ont été détectés avec un mAb de lapin anti-hTERT. Les protéines Scrambled et Inverted ont été détectées avec un mAb de souris anti-V5. Des anticorps secondaires de lapin et de souris couplés à la HRP (*horsheradish peroxidase*) et un kit ECL (chimiluminescence) ont été utilisés pour réaliser la détection des protéines sur films photographiques. La durée de transfection de chaque dépôt est indiquée au dessus de chaque puits. La  $\beta$ -actine a été utilisée comme contrôle de charge de chaque puits et a été détectée avec un mAb de souris anti- $\beta$ -actine. (Partie basse) Les intensités d'expression des protéines Scrambled et Inverted ont été normalisées par rapport à l'intensité de la  $\beta$ -actine avec le logiciel ImageJ. Des courbes permettant d'obtenir des valeurs arbitraires correspondant à l'aire sous la courbe ont été générées pour chaque puits après sélection des bandes d'intérêt ou des bandes  $\beta$ -actine. Un ratio (densité relative) est calculé en divisant les valeurs pour chaque échantillon par la valeur de la  $\beta$ -actine du même puits.

## 2.2. Profil d'exclusion nucléolaire et inactivité catalytique

Afin de vérifier que la délétion du NoLS altère la distribution cellulaire de Scrambled et Inverted, leur localisation cellulaire a été visualisée 24 h après la transfection de cellules QT6

(cellules de cailles dans lesquelles l'anti-hTERT ne reconnaît pas la TERT aviaire) en comparaison de celle de la protéine hTERT (Figure 34). Comme attendu, la protéine hTERT naturelle est principalement localisée dans le noyau et dans les nucléoles. Similairement au profil observé précédemment pour INVAC-1, les protéines Scrambled et Inverted sont distribuées dans le noyau et dans le cytoplasme avec un profil d'exclusion nucléolaire net.



**Figure 34 : Localisation intracellulaire des protéines hTERT, INVAC-1, Scrambled et Inverted**

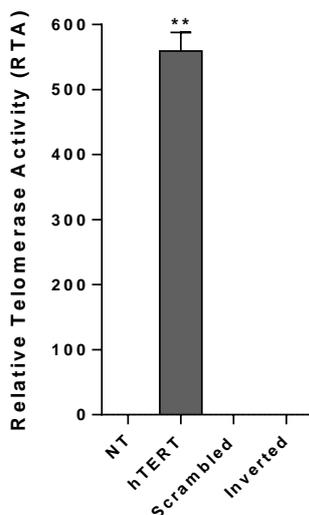
Les cellules QT6 ont été transfectées pendant 24 h avec les différentes constructions. Les cellules transfectées avec le plasmide codant le hTERT naturelle et le plasmide INVAC-1 ont été marquées avec un mAb de lapin anti-hTERT, celles transfectées avec pUTScram et pUTInv ont été marquées avec un mAb de souris anti-V5. La localisation des protéines est visualisée par microscopie à fluorescence (x63) grâce aux anticorps secondaires de chèvre anti-lapin ou anti-souris couplés à l'Alexa Fluor 488<sup>®</sup> (vert). Les noyaux cellulaires sont marqués avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, bleu). hTERT et INVAC-1 sont ici un contrôle de localisation. Les cellules non traitées ont été uniquement marquées avec du DAPI afin d'obtenir un réel signal de fluorescence négatif pour l'Alexa Fluor 488<sup>®</sup>.

Dans une démarche similaire, nous avons vérifié que la délétion VDD au niveau du site catalytique entraînait une perte de la fonction télomérase des protéines codées par pUTScram et pUTInv dans des cellules CrFK transfectées en utilisant le test TRAP (*telomeric repeat amplification protocol*). La lignée cellulaire CrFK est une lignée immortalisée sans activité télomérase et n'exprimant pas l'ARNm de TERT (Yazawa et al., 2003) et est par conséquent une lignée appropriée pour tester des activités télomérases exogènes.

Brièvement, le test TRAP est réalisé à partir des extraits protéiques des cellules transfectées. Une PCR avec des primers biotinilés est réalisée sur les extraits. Les produits PCR obtenus

sont incubés dans une microplaque pré-coatée à la streptavidine avec un anticorps anti-digoxigénine conjugué HRP et révélés en utilisant le substrat TMB (tetraméthylbenzidine). La présence d'activité télomérase est déterminée par absorbance 450/690 nm.

Le calcul de l'activité télomérase relative basé sur les données d'absorbance obtenues montre que les protéines induites par pUTScram et pUTInv présentent un niveau d'activité télomérase comparable aux cellules non-traitées et confirme que ces deux protéines sont dénuées de toute activité télomérase (Figure 35).



**Figure 35 : Neutralisation de l'activité télomérase de Scrambled et Inverted**

Après extraction des protéines cellulaires totales, l'activité télomérase est testée en utilisant le test TRAP. L'activité relative est obtenue avec la formule suivante :

$$RTA = [(AS-AS0)/AS,IS] / [(ATS8-ATS8,0)/ATS8,IS] \times 100$$

où AS: absorbance de l'échantillon ; AS0: absorbance de l'échantillon inactivé à la chaleur ; AS,IS: absorbance du standard interne ; ATS8: absorbance modèle contrôle ; ATS8,0: absorbance du tampon de lyse (TS8); ATS8,IS: absorbance IS TS8.

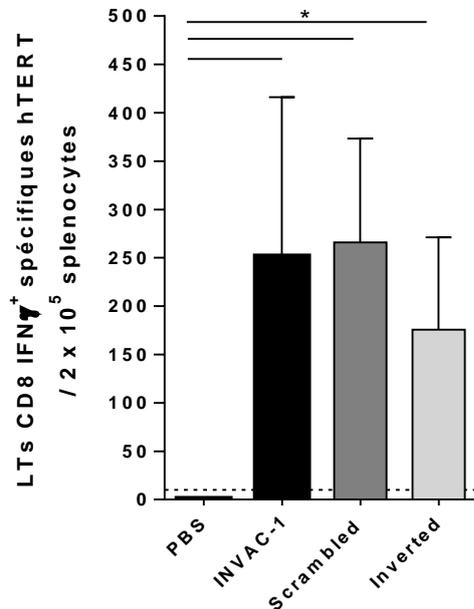
Les résultats correspondent à la moyenne  $\pm$  écart-type (SEM) Test T non apparié avec correction de Welch contre les cellules CrFK non-traités (NT), \*\*p<0,01.

### 2.3. Induction de fortes réponses CD8 hTERT spécifiques

Afin de comparer l'immunogénicité des constructions pUTScram et pUTInv à celle d'INVAC-1, des souris HLA-B7 ont été immunisées deux fois avec les différentes constructions (100  $\mu$ g ADN ID + EGT) avec un intervalle de 21 jours entre la première et la seconde immunisation (prime-boost). Dix jours après la dernière immunisation, un ELISpot IFN- $\gamma$  a été réalisé sur des lymphocytes purifiés (Ficoll) provenant de la rate en utilisant les peptides hTERT restreints à HLA-B7 (pool de peptide p277, p351 et p1123).

Une différence significative a été observée sur la fréquence des cellules CD8 spécifiques de hTERT suite à deux immunisations avec INVAC-1, pUTScram et pUTInv en comparaison des animaux contrôles (n=3-5 ; Figure 36). Par conséquent, les résultats démontrent que les constructions dérivées réarrangées pUTScram et pUTInv permettent l'induction significative de réponse LTs CD8 spécifiques de hTERT après deux cycles d'immunisation tout comme

INVAC-1. En effet, nous avons démontré dans l'article #2, que l'avantage d'une vaccination *prime-boost* est d'augmenter spécifiquement les LTs activés (mémoires) lors de la première immunisation et d'élargir la présentation épitopique afin de générer de nouveaux LTs spécifiques de hTERT impliquant de nouveaux complexes CMH/peptide/TCRs.



**Figure 36 : Induction de réponses CD8 spécifiques hTERT synthétisant de l'IFN- $\gamma$**

Après deux cycles de vaccination,  $2 \times 10^5$  splénocytes purifiés par Ficoll sont stimulés durant 19 h avec des peptides hTERT restreints HLA-B7 ou du milieu. Les spots sont révélés avec un anticorps de détection conjugué biotine suivi de la phosphatase streptavidine, alcaline et de son substrat BCIP/NBT. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $n=5$ ) et un seuil placé à 10 spots a été déterminé volontairement afin de déterminer le nombre d'animaux répondeurs (ligne en pointillé). Test non-paramétrique de Mann Whitney ; \* $p<0.05$ .

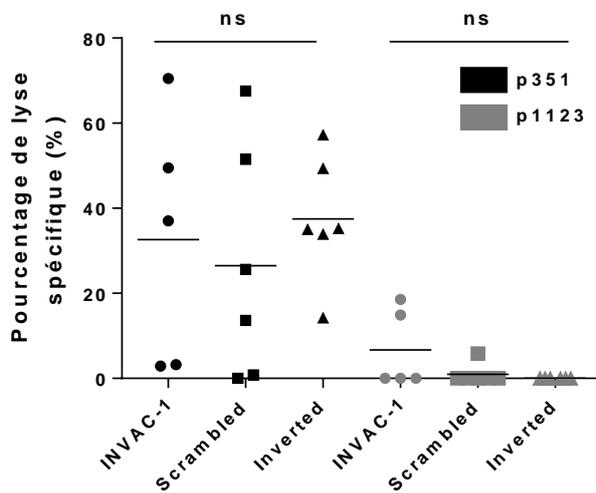
## 2.4. Cytotoxicité des réponses CD8 spécifiques de hTERT

Comme exposé dans l'introduction, lors de la réponse anti-tumorale naturelle, les CD8 avec leur activité cytotoxique ont un rôle primordial (Vesely et al., 2011). Cette dernière a donc été évaluée *in vivo* dans des souris HLA-B7 après une immunisation (ADN ID + EGT) avec INVAC-1, pUTScram et pUTInv via un test de lyse utilisant la CFSE et des splénocytes naïfs pulsés comme cible. Les cibles sont marquées avec trois concentrations de CFSE différentes. La concentration de CFSE la plus haute a été pulsée avec le p351, peptide immuno-dominant HLA-B7, la concentration intermédiaire a été pulsée avec le p1123, peptide sous-dominant et la plus faible reste non chargée comme contrôle. Un mix de ces cellules est injecté en IV aux souris précédemment immunisées. Après 15 h à 18 h, la disparition des cellules chargées dans la rate a été analysée par cytométrie de flux et le pourcentage de lyse spécifique a été évalué en comparant le ratio de cellules chargées/cellules non chargées des souris immunisées et des souris contrôles.

Les résultats démontrent que toutes les constructions induisent la génération de réponses cytotoxiques spécifiques de hTERT après une immunisation. Comme attendu, la cytotoxicité

envers le peptide immuno-dominant p351 est élevée contrairement à celle envers le peptide sous-dominant p1123. Nous avons observé que INVAC-1 et Inverted entraînent une lyse spécifique des cibles p351 d'environ 32% et que Scrambled conduit à une lyse de 26 % (Figure 37). Nous avons aussi remarqué une certaine hétérogénéité dans les résultats de lyse suggérant que plusieurs immunisations permettraient d'augmenter le nombre de souris développant une lyse spécifique contre les deux peptides (phénomène observé dans l'article #2).

En conclusion, les dérivées d'INVAC-1 génèrent des réponses CD8 spécifiques de hTERT avec une activité cytolytique.



**Figure 37 : Cytotoxicité des réponses CD8 spécifiques de hTERT induites par Scrambled et Inverted.**

Le pourcentage de lyse est représenté en moyenne (n=5). Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été réalisé et s'avère non significatif (ns).

En conclusion, les données obtenues pour les constructions dérivées d'INVAC-1, Scrambled et Inverted démontrent, similairement à INVAC-1, leur capacité à être dégradées par le protéasome, à être localisées dans le cytoplasme, à être inactives et à induire des réponses CD8 cytotoxiques élevées.

## II. Développement d'immunothérapie basée sur le vecteur recombinant rougeole

### **But :**

Développement du vecteur recombinant du virus vivant atténué de la rougeole codant l'antigène hTERT en tant que stratégie d'immunothérapie ou dans le cadre d'une stratégie de vaccination hétérologue ADN + vecteur afin d'en augmenter l'immunogénicité. Ces deux stratégies s'intègrent toutes deux dans un contexte anti-tumoral.

### **Méthodes :**

Le développement de la construction du vecteur MV-TERT est issu d'un travail collaboratif entre l'équipe du Dr. F. Tangy et INVECTYS. La méthodologie utilisée pour construire le plasmide pTM-MV-TERT est décrite dans la section Outils-Méthodes. La méthodologie employée dans les études de caractérisation fonctionnelle *in vitro* et *in vivo* du vecteur MV-TERT est assez similaire à celle employée dans les sections précédentes. Les études d'immunogénicité et de cytotoxicité ont été réalisées sur les modèles murins transgéniques IFNAR/CD46 et HHD/IFNAR/CD46 (décrits en section Outils-Méthodes). Les peptides spécifiques hTERT utilisés sont ainsi restreints au CMH classe I H2-K/Db ou HLA-A2 et au CMH classe II H2-IAb.

L'immunisation avec le vecteur MV-TERT est réalisée en intrapéritonéale (IP) à une dose de  $10^5$  TCID<sub>50</sub>. Pour démontrer l'immunogénicité du vecteur MV-TERT seul, les souris ont reçu une immunisation avec le vecteur MV-TERT éventuellement suivie d'une seconde 28 jours après. Afin d'évaluer la stratégie de vaccination hétérologue, les souris ont reçu une première immunisation avec INVAC-1 (100 µg ADN ID + EGT) suivie 21 jours plus tard d'une immunisation avec MV-TERT à une dose de  $10^5$  TCID<sub>50</sub>.

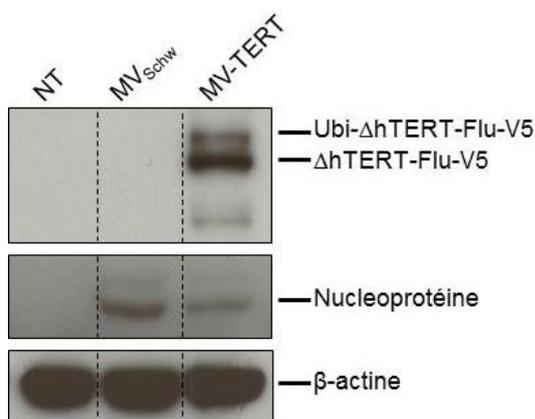
## Résultats :

Les travaux réalisés et les données obtenues sur le vecteur MV-TERT font l'objet d'un brevet commun entre l'Institut Pasteur et INVECTYS, qui est à l'heure actuelle en finalisation. Les données présentées ci-après sont donc soumises à confidentialité. Ces travaux feront aussi l'objet d'une publication, une fois le brevet déposé.

### 2.1. Expression du transgène Ubi- $\Delta$ hTERT-Flu-V5 par le vecteur MV-TERT

Des cellules Vero ont été infectées pendant 48h avec MV-TERT afin de vérifier l'expression du transgène Ubi- $\Delta$ hTERT-Flu-V5 (Figure 38). Après migration et transfert des échantillons, la partie haute de la membrane (poids moléculaire, PM > 70 kDa) a été incubée avec un mAb murin anti-V5 (Invitrogen, Carlsbad, USA). La partie du milieu (50 kDa < PM < 70 kDa) a été hybridée avec un mAb murin anti-N du MV (Abcys, Courtaboeuf, France) et la dernière partie avec un mAb murin anti- $\beta$ -actine (Sigma Aldrich SARL, Saint-Quentin Fallavier, France).

Après détection des protéines par chimioluminescence, seules les cellules infectées avec le vecteur recombinant MV-TERT et le vaccin MVSchw expriment la nucléoprotéine (PM approximatif 57,7 kDa). Contrairement aux cellules MVSchw et comme attendu, les cellules MV-TERT expriment la protéine de fusion Ubi- $\Delta$ hTERT-Flu-V5 sous deux formes dont une majoritaire ayant perdu l'ubiquitine. Ce phénomène a précédemment été démontré pour INVAC-1 et les dérivés réarrangés. En effet, cette protéine de fusion est construite de sorte à être orientée vers la voie de dégradation du protéasome afin d'augmenter les réponses spécifiques contre l'antigène.



**Figure 38 : Expression du transgène Ubi- $\Delta$ hTERT-Flu-V5**

Les cellules Vero infectées (MOI=0,1) avec MVSchw, MV-TERT ou non traitées (NT) sont prélevées 48 h après infection. Les protéines Ubiquitin- $\Delta$ hTERT-Flu-V5, nucléoprotéine N du MV et la  $\beta$ -actine sont détectées en utilisant respectivement un anti-V5, un anti-nucléoprotéine (N) et un anti- $\beta$  actine. La protéine N sert de contrôle d'infection et la  $\beta$ -actine est utilisée comme contrôle de charge.

## 2.2. Induction de fortes réponses LTs hTERT et MV spécifiques

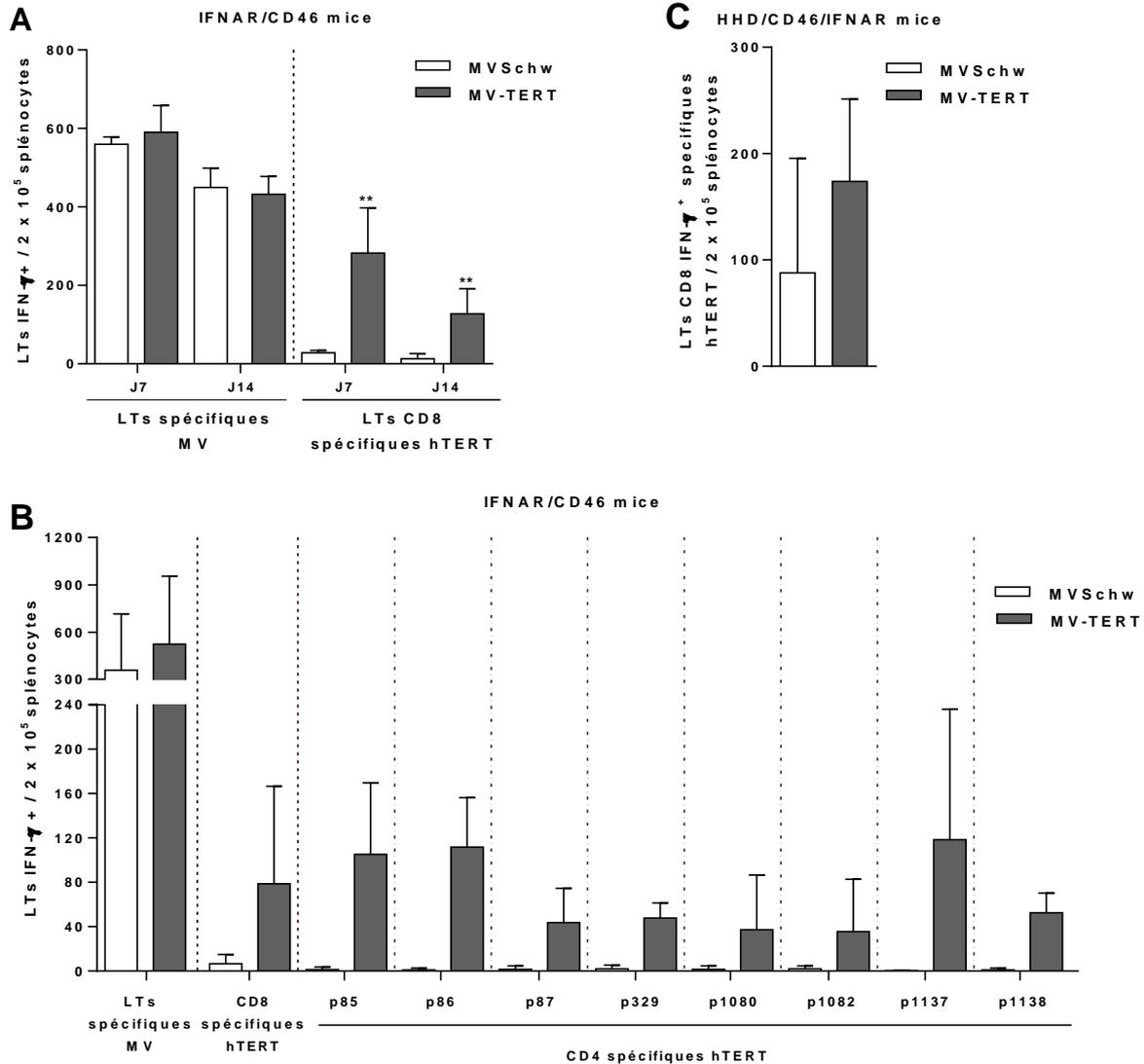
La capacité du vecteur MV-TERT à induire des réponses cellulaires spécifiques a été évaluée dans les modèles murins IFNAR/CD46 et HHD/IFNAR/CD46.

Les réponses spécifiques anti-MV et anti-hTERT ont été étudiées sur des splénocytes purifiés par Ficoll sept ou quatorze jours après immunisation par un ELISpot IFN- $\gamma$  (Figure 39 A et B) avec le vaccin MVSchw (contrôle d'immunisation) et des peptides hTERT restreints H2. Comme observé sur la Figure 39A, les souris immunisées avec MV-TERT ont généré une réponse CD8 spécifique de hTERT significativement plus élevée que les souris contrôles MVSchw sept ou quatorze jours après la dernière immunisation (moyenne # spot MV-TERT 7 / 14 jours : 282,5 / 127,8 ; moyenne # spot MVSchw 7 / 14 jours : 28,5 / 13).

Ces réponses ont aussi été évaluées sur les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs), le niveau d'induction est plus faible mais suit un profil identique (données non montrées ; moyenne # spot MV-TERT 7 jours : 115 ; moyenne # spot MV-TERT 14 jours : 29). De la même façon, des LTs CD4 spécifiques de hTERT ont été détectés dans les animaux immunisés MV-TERT contrairement à ceux vaccinés avec MVSchw (Figure 39B; moyenne minimale # spots MV-TERT p1082: 35 and moyenne maximale # spots MV-TERT p1137: 118).

Afin d'évaluer l'immunogénicité de MV-TERT dans des souris HHD/IFNAR/CD46, les splénocytes purifiés des souris immunisées ont été stimulés *in vitro* durant une semaine avec un pool de peptides hTERT restreints à HLA-A\*0201 et ont été utilisés dans un ELISpot IFN- $\gamma$  (Figure 39C). La réponse CD8 spécifique de hTERT dans les souris immunisées avec MV-TERT est détectée plus élevée que celle des souris contrôles MVSchw (moyenne # spot MV-TERT : 173,8 ; moyenne # spot MVSchw : 87,7).

Pour l'ensemble des expériences, aucune différence significative n'a été observée entre la réponse spécifique MV induite par la vaccination MVSchw et celle induite par MV-TERT soulignant que l'insertion du transgène dans le vecteur recombinant ne perturbe pas l'immunogénicité démontrée du MV.



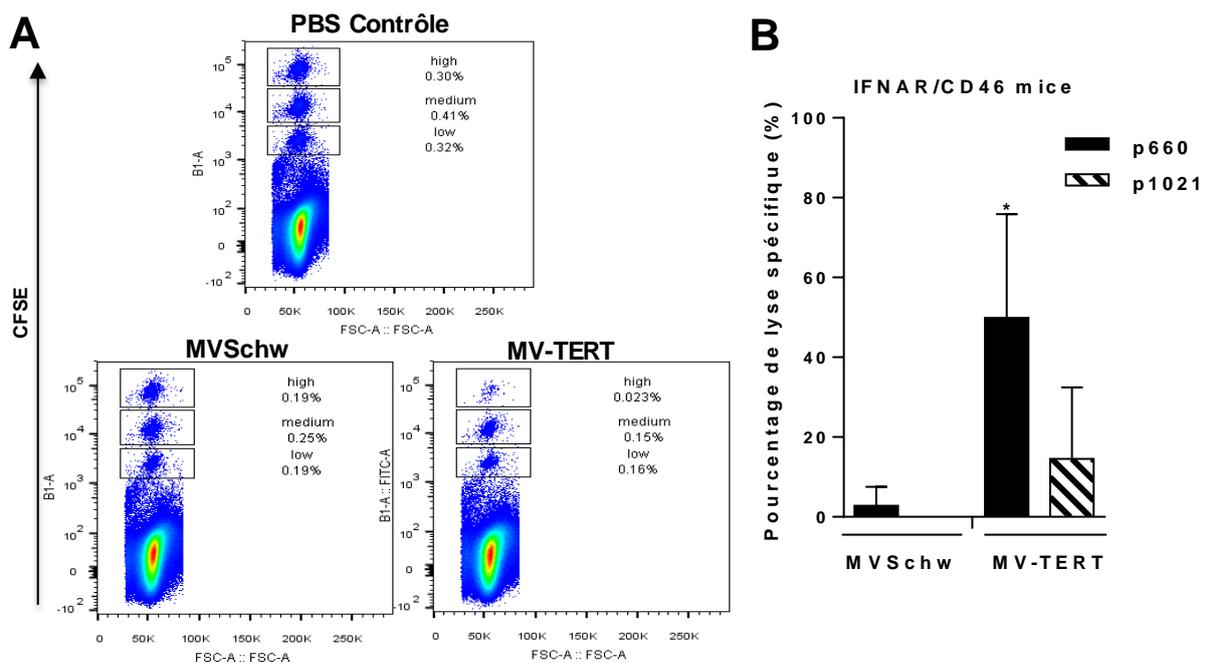
**Figure 39 : Induction de CD8 et CD4 spécifiques de hTERT en réponse à une immunisation MV-TERT**  
**A]** Evaluation des réponses induites spécifiques de MV et de hTERT (CD8) dans la rate sept ou quatorze jours post-immunisation dans des souris IFNAR/CD46. **B]** Evaluation des LTs CD4 induits spécifiques de hTERT sept jours après immunisation dans des souris IFNAR/CD46. **C]** Induction de LTs CD8 spécifiques de hTERT restreints HLA-A2 après une semaine de stimulation *in vitro* sur des splénocytes purifiés sept jours après immunisation. Pour l'ensemble des expériences, la stimulation *in vitro* avec MVSchw représente un contrôle d'immunisation. Les LTs spécifiques de MV et de hTERT /  $2 \times 10^5$  splénocytes pour MV-TERT (barres grises) et pour MVSchw (barres blanches) sont représentés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $n=3-6$ ). Test non paramétrique Mann-Whitney réalisé contre les souris contrôles MVSchw, \*\* $p < 0.01$ .

### 2.3. La vaccination MV-TERT induit des CTLs spécifiques de hTERT

Les CTLs ont été démontrés comme la population effectrice cruciale et l'une des plus puissante dans la phase d'élimination du cancer (Vesely et al., 2011). Afin de démontrer que le vecteur MV-TERT induit *in vivo* des CTLs spécifiques de hTERT, un test de cytotoxicité a été réalisé sur le modèle murin IFNAR/CD46 en utilisant comme cellules cibles des

splénocytes pulsés avec des peptides hTERT et marqués au CFSE avec trois concentrations différentes. Les cellules cibles présentent soit le peptide hTERT p660 (immuno-dominant) avec la concentration la plus élevée de CFSE, soit le p1021 (sous-dominant) avec la concentration intermédiaire ou sont laissées non pulsées et marquées avec la concentration la plus faible. Ces cibles ont été réinjectées en IV dans les souris immunisées.

L'analyse en cytométrie de flux des splénocytes récupérés 15 à 18 h après l'injection montre la diminution des cibles marquées avec les concentrations élevée et intermédiaire de CFSE (p660 et p1021) dans les souris MV-TERT en comparaison des souris MVSchw et PBS (Figure 40A). Après calcul du pourcentage de lyse, les CTLs spécifiques de hTERT générés par les souris immunisées avec MV-TERT détruisent de façon significative  $\approx 50\%$  des cellules p660<sup>+</sup> et 14% des cellules p1021<sup>+</sup> (Figure 40B).



**Figure 40 : La vaccination MV-TERT induit des CD8 spécifiques de hTERT cytotoxiques**

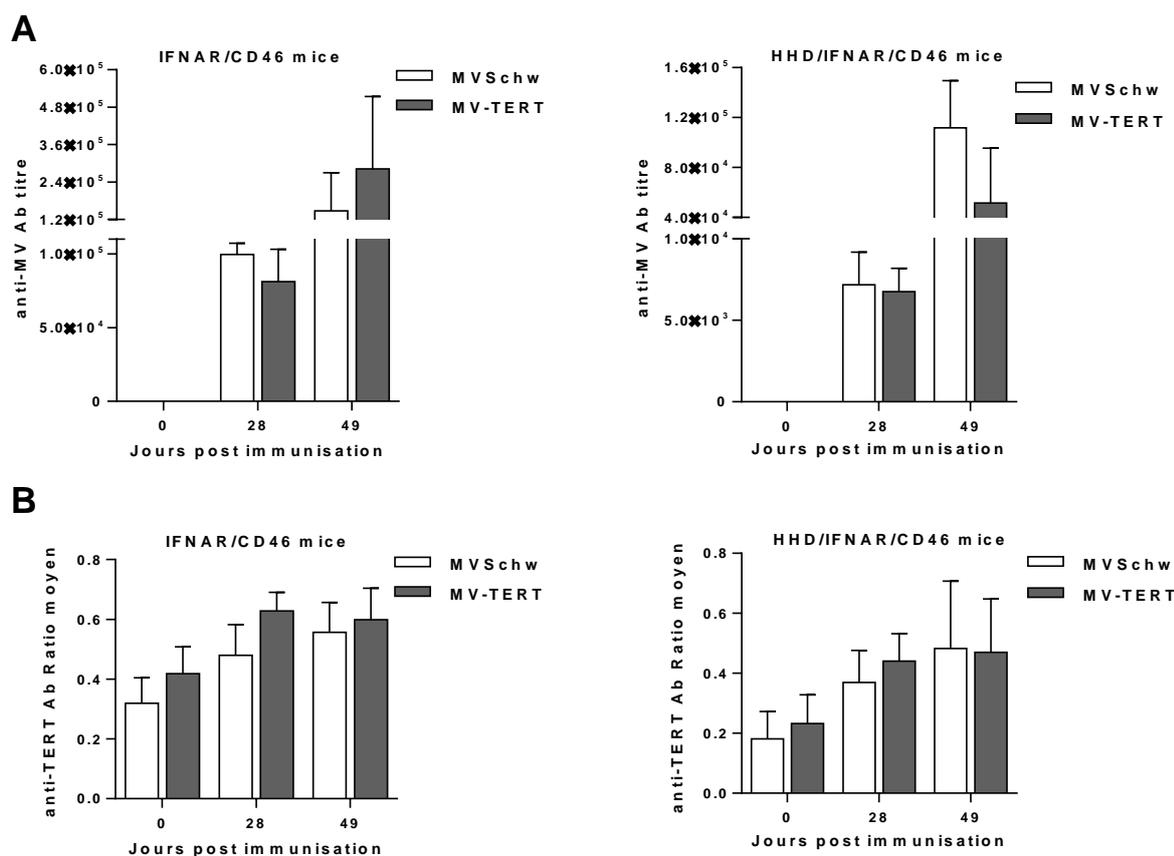
**A**| Disparition des cellules cibles pulsées dans la rate 15 à 18h après leur injection en IV, visualisée en cytométrie de flux. **B**| Le pourcentage de lyse spécifique contre p660 (barres noires) et p1021 (barres hachurées) a été calculé avec la formule suivante :

$$[1 - [\text{mean} (\% \text{CFSE}^{\text{bas}} / \text{CFSE}^{\text{haut ou medium}})_{\text{CONTROLE}} / (\% \text{CFSE}^{\text{bas}} / \text{CFSE}^{\text{haut ou medium}})_{\text{IMMUNISE}}]] \times 100.$$

Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type (MV-TERT n=6, MVSchw n=4). Test non paramétrique de Mann-Whitney réalisé contre les souris contrôles MVSchw, \*p<0.05.

## 2.4. Non détection d'anticorps anti-hTERT en réponse à MV-TERT

Afin d'évaluer les réponses humorales induites par le vecteur MV-TERT, des souris IFNAR/CD46 et HHD/IFNAR/CD46 ont été immunisées deux fois à un mois d'intervalle (J0 et J28). Des tests ELISAs (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ont été réalisés sur les sera collectés avant chaque immunisation (J0 et J28) et au moment du sacrifice (J49). La réponse humorale anti-MV a été détectée pour les deux groupes de vaccination (MV-TERT ou MVSchw) dans les deux lignées murines. Nous avons aussi observé qu'une immunisation induit des titres d'anticorps anti-MV très élevés et qu'une seconde immunisation augmente ce titre. Par exemple, le titre d'anticorps anti-MV à J28 chez les souris immunisées IFNAR/CD46 se situe autour de  $8 \times 10^4$  et à J49 approximativement à  $3 \times 10^5$  (Figure 41A). Cependant, bien que les souris répondent à MV, aucun anticorps anti-hTERT dirigé contre le long peptide p165-348 n'a été détecté après une ou deux immunisations (Figure 41B).



**Figure 41 : Evaluation de la réponse humorale induite par MV-TERT**

Les souris ont été immunisées deux fois à un mois d'intervalle J0 et J28. Les sera ont été collectés avant chaque immunisation et un mois après la dernière. **A)** Titres d'anticorps anti-MV en fonction du temps. Les titres d'anticorps anti-MV sont exprimés en moyenne ± écart-type (n=3-6). **B)** La détection des anticorps anti-hTERT a été réalisée selon une méthode ELISA quantitative validée. Les résultats sont exprimés en ratio moyen (R) ± écart-type où R = valeur de densité optique/cut off ; cut off = cut off normalisé x moyenne des huit déterminations des matrices de pool négatif. Les résultats positifs ou négatifs sont obtenus selon les ratios contrôle qualité (QC). IFNAR/CD46: R QC haut= 7,27-7,67; R QC bas= 1,46-1,50; cut-off = 0,052. HHD/IFNAR/CD46: R QC haut= 8,30-8,99; R QC bas= 1,43-1,44; cut-off = 0,279.

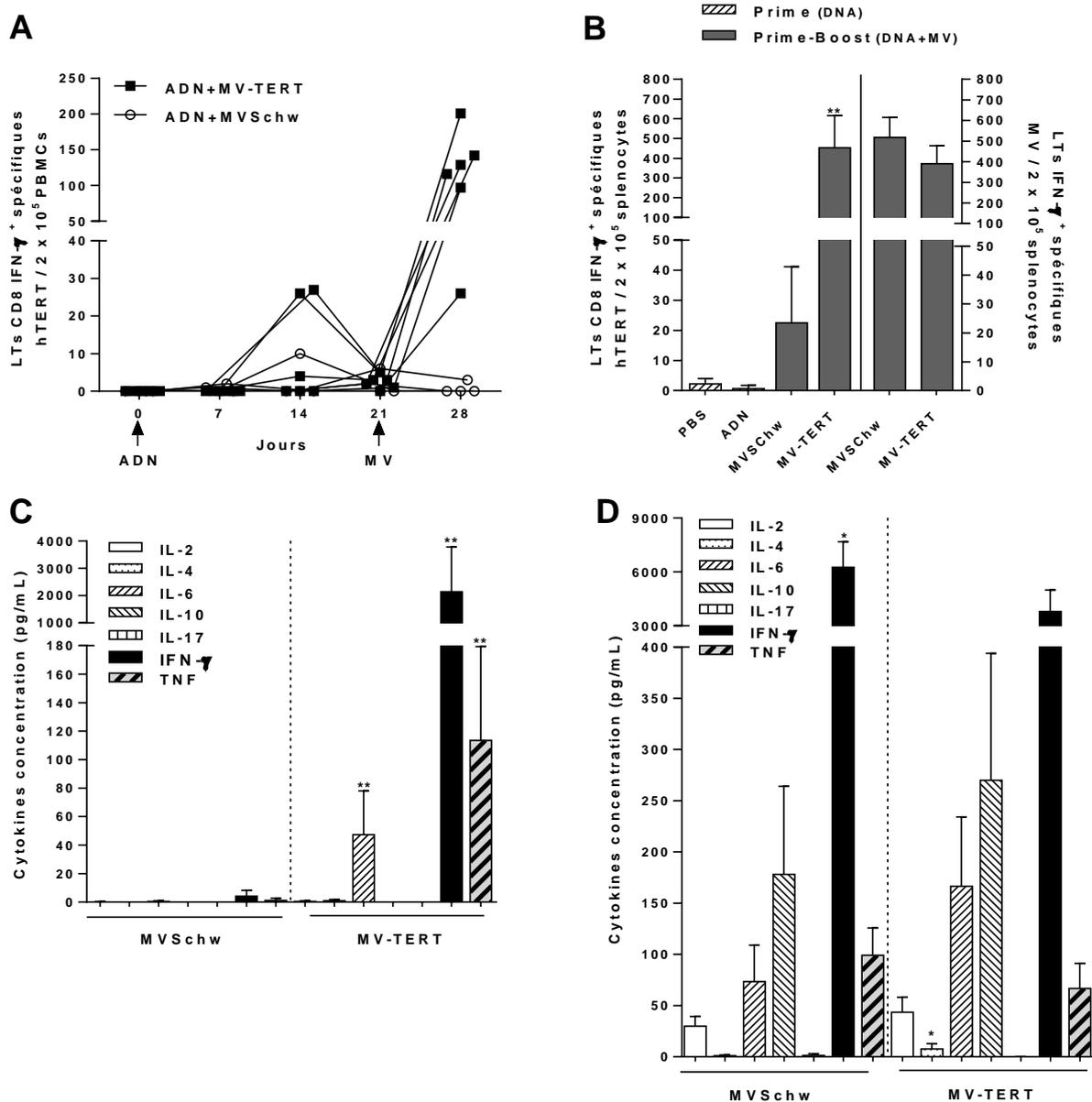
## 2.5. Vaccination hétérologue INVAC-1 + MV-TERT

Les stratégies de vaccinations hétérologues ont été décrites pour augmenter l'induction de réponses immunitaires spécifiques à l'antigène vaccinal dans différentes maladies telles que les maladies infectieuses et le cancer (Anderson and Schneider, 2007 ; Lu, 2009). Nous avons donc évalué l'impact d'une combinaison INVAC-1 (injection ID + EGT) et vecteur MV-TERT sur l'induction de la réponse CD8 spécifique de hTERT. Dans ce but, des souris IFNAR/CD46 ont été immunisées avec INVAC-1 à J0 et boostées vingt-et-un jour plus tard avec MV-TERT ou MVSchw (contrôle). La réponse CD8 hTERT spécifique a été monitorée par ELISpot IFN- $\gamma$  au cours du temps dans le sang (Figure 42A) et dans la rate au moment du sacrifice de chaque groupe (Figure 42B).

Contrairement à ce que nous observons habituellement avec INVAC-1, aucune réponse CD8 spécifique de hTERT n'a été observée quatorze jours après l'immunisation ADN dans le sang (Figure 42A, n=10). Nous avons cependant constaté que le boost MV-TERT induit une forte réponse CD8 spécifique de hTERT contrairement au groupe boosté avec MVSchw (moyenne # INVAC-1+MV-TERT spots : 118,5). De la même manière, les résultats obtenus dans la rate reproduisent ces observations, absence de réponse CD8 spécifique de hTERT avec l'ADN et induction significative d'une réponse spécifique après un boost MV-TERT (Figure 42B, mean # spots: 453.7; n=6). Nous avons comparé ce résultat avec les résultats précédemment obtenus pour une seule immunisation MV-TERT de sept jours, la combinaison hétérologue INVAC-1+MV-TERT induit une réponse CD8 spécifique de hTERT deux fois plus haute.

Nous avons aussi évalué les différentes cytokines sécrétées par les LTs induits par la vaccination hétérologue INVAC-1+MV-TERT dans le but de démontrer leur fonctionnalité. Des concentrations significatives d'IL-6, d'IFN- $\gamma$  et de TNF ont été détectées pour les CTLs spécifiques de hTERT induits par INVAC-1+MV-TERT (Figure 42C). Ces cytokines sont caractéristiques des CD8 Tc1 décrits pour sécréter de haut niveau d'IFN- $\gamma$  et de TNF ainsi qu'un faible niveau d'IL-6 (Mosmann et al., 1997). Les LTs CD4 et CD8 spécifiques de MV induits par la vaccination hétérologue (MVSchw ou MV-TERT) sécrètent les mêmes cytokines avec en plus une sécrétion d'IL-2 et d'IL-10 (Figure 42D).

Par conséquent l'ensemble de ces résultats démontre une polarisation mixée Tc1/Th1/Th2 des LTs spécifiques induits par la stratégie de vaccination hétérologue.



**Figure 42 : Stratégie de vaccination hétérologue INVAC-1+MV-TERT**

**A|** Le sang périphérique a été collecté avant la première immunisation J0, puis à J7, J14 et J21 post-prime et 7 jours après le boost (J28). Les PBMCs ont été stimulés avec un pool de 4 peptides spécifiques hTERT restreints H2-K/Db. Les flèches noires représentent les vaccinations. Les CD8 IFN- $\gamma$ + spécifiques de hTERT /  $2 \times 10^5$  PBMCs sont représentés individuellement pour chaque souris. **B|** A J28, les lymphocytes purifiés des splénocytes ont été stimulés avec le vaccin MV-Schw ou le pool de 4 peptides H2. Les CD8 spécifiques de hTERT (axe de gauche) et les LTs spécifiques de MV (axe de droite) /  $2 \times 10^5$  splénocytes pour le prime avec INVAC-1 (barres hachurées) et pour le prime-boost INVAC-1+MV-TERT (barres grises) sont représentés en moyenne  $\pm$  écart-type. La stimulation MV a été utilisée comme contrôle d'immunisation. Test non paramétrique de Mann-Whitney entre INVAC-1 seul et INVAC-1+MV-TERT, \*\* $p < 0,01$ . **C et D|** Les lymphocytes purifiés des splénocytes ont été stimulés avec les conditions précédentes durant 24h. Les suragants des cellules stimulées ont été testés par un test de liaison aux cytokines (CBA) afin d'évaluer la concentration des différentes cytokines sécrétées par **(C)** les CD8 spécifiques de hTERT et **(D)** les LTs spécifiques de MV. Les concentrations de cytokines (pg/mL) sont représentées en moyenne  $\pm$  écart-type. Test non paramétrique de Mann-Whitney contre condition contrôle MV-Schw, \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ .



# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**



Les stratégies de vaccination thérapeutique anti-cancer existantes à ce jour consistent à stimuler et/ou à renforcer l'initiation de réponses immunitaires qui cibleront spécifiquement les cellules tumorales de la tumeur primaire chez les patients (Guo et al., 2013). Selon les mécanismes immunologiques impliqués par la vaccination, ces vaccins auront aussi pour but d'induire des réponses mémoires pouvant prévenir d'éventuelles récurrences ou métastases (Pulendran and Ahmed, 2011). La spécificité de la vaccination thérapeutique repose sur un des principes de l'immuno-surveillance, la capacité du système immunitaire à distinguer les cellules tumorales des cellules saines par la présentation d'antigènes tumoraux à leur surface (Boon et al., 1997 ; Novellino et al., 2005). L'identification de ces antigènes a donc représenté une étape décisive dans le développement des immunothérapies spécifiques, permettant de créer des vaccins thérapeutiques anti-cancer ciblant ces antigènes.

Près d'un siècle de recherche aura été nécessaire, après les essais du Dr. William Coley (1891) stimulant le système immunitaire par des injections de toxines en intratumoral (McCarthy, 2006), pour que le premier vaccin thérapeutique anti-cancer soit approuvé par la FDA, le sipuleucel-T (Provenge® ; 2010). Ce vaccin basé sur l'administration de DCs autologues exprimant un antigène de la prostate fusionné avec du GM-CSF possède cependant, une efficacité modeste avec une médiane de survie des patients prolongée de 4,1 mois comparé au groupe placebo et avec une différence de survie évaluée trois ans après le traitement de 20% (Cheever and Higano, 2011). Ce type de vaccins, tout comme les vaccins basés sur les cellules tumorales autologues, nécessitent des procédures complexes de préparation et présentent l'inconvénient d'être spécifiques uniquement à certains patients (Berzofsky et al., 2004).

Les vaccins génétiques tels que les vaccins ADN et les vaccins basés sur des virus recombinants sont depuis quelques années des stratégies prometteuses pour le traitement du cancer (Draper and Heeney, 2010 ; Rice et al., 2008). Ces deux types de vaccins, faciles à produire et à manipuler, sont basés sur la présentation d'épitopes multiples par les CMH de classe I et II. Leur avantage commun réside dans leur capacité à exprimer la totalité d'une protéine permettant ainsi de couvrir toute la diversité des molécules CMH existante chez l'homme. De plus, en évitant la restriction du nombre limité de CMH, ces vaccins ne nécessitent pas la connaissance des haplotypes des patients avant la vaccination (Berzofsky et al., 2004).

Le travail de ce doctorat a consisté au développement et à la mise au point de stratégies vaccinales, utilisant les approches ADN et virus recombinant, ciblant l'antigène hTERT considéré comme un TAA universel.

## **Pertinence de l'antigène tumoral hTERT**

Parmi le large nombre d'antigènes tumoraux identifiés (Novellino et al., 2005), la hTERT est celle qui rassemble la plupart des critères de l'antigène cible tumoral idéal. Ces critères établis et décrits par Cheever et al., afin de choisir des antigènes pouvant permettre des résultats cliniques prometteurs, reposent sur leur fonction thérapeutique, leur immunogénicité, leur rôle dans l'oncogenèse, leur spécificité, leur expression dans la majorité des cellules cancéreuses y compris dans les cellules souches cancéreuses, ainsi que leur expression inexistante ou réduite dans les tissus normaux (Cheever et al., 2009).

La hTERT, sous-unité limitante de la télomérase, possède un rôle important dans le processus qui contribue à l'immortalisation cellulaire (Low and Tergaonkar, 2013). En effet, il a été démontré que l'expression ectopique *in vitro* de hTERT dans plusieurs types de cellules normales humaines (cellules épithéliales ou fibroblastes) suffit à les immortaliser en étendant leur durée de vie à travers la stabilisation de la longueur des télomères (Bodnar et al., 1998 ; Vaziri et al., 1999). Par ailleurs, il a aussi été montré que des lignées dépourvues d'activité télomérase utilisant un mécanisme alternatif de maintien des télomères (ALT), et exprimant l'oncoprotéine H-RAS induisent la transformation des cellules normales en cellules malignes uniquement si hTERT est aussi exprimée (Stewart et al., 2002). La hTERT est donc impliquée dans le processus oncogénique indépendamment de son activité d'élongation des télomères. En effet, chez la souris, la surexpression conditionnelle de mTERT dans les glandes mammaires entraîne le développement de néoplasies intra-épithéliales et de carcinomes invasifs (Artandi et al., 2002) alors que les cellules murines présentent de longs télomères qui ne subissent pas de raccourcissement durant le développement tumoral (Broccoli et al., 1996).

La plupart des cellules somatiques n'expriment pas l'ARNm de hTERT, contrairement aux cellules embryonnaires, aux cellules germinales, aux cellules souches et aux LTs activés. Néanmoins, l'expression de hTERT dans ces cellules est relativement modérée en

comparaison des cellules cancéreuses qui la surexpriment indépendamment de leur origine cellulaire à hauteur de 80-90% (Shay and Bacchetti, 1997).

Différentes études ont démontré qu'une surexpression de hTERT pouvait être associée à un mauvais pronostic clinique et à une agressivité tumorale marquée, e.g. dans le cancer du poumon non-à-petites cellules (NSCLC) (Marchetti et al., 2002 ; Zhu et al., 2006), dans le cancer du sein (Elkak et al., 2006) et dans les leucémies (Tchirkov et al., 2004). Ainsi, elle est aujourd'hui aussi utilisée comme un marqueur de diagnostic afin de distinguer les tumeurs bénignes telles que les neurinomes, les adénomes folliculaires ou papillaires, la métaplasie de Barrett, la gastrite chronique ou le tératome mature ; des tumeurs malignes comme le glioblastome, adénocarcinomes folliculaires ou papillaires, l'adénocarcinome gastrique ou encore le cancer cervical (Hiyama and Hiyama, 2003).

De plus, la hTERT est exprimée de manière héréditaire dans les cellules souches cancéreuses (CSCs) due à la capacité d'auto-renouvellement présente dans les cellules hématopoïétiques adultes normales (Morrison et al., 1996). Il a aussi été montré dans le cadre d'un modèle de cancer gastrique que l'expression de hTERT interagissant avec la  $\beta$ -caténine favorise la transition épithéliale-mésenchymateuse et l'acquisition des caractéristiques « cellules souches » par les cellules gastriques (CSCs) (Liu et al., 2013).

Un autre critère essentiel de la hTERT, en tant que TAA universel, est son immunogénicité. Il a été démontré que des réponses LTs spécifiques de hTERT naturelles pouvaient être induites chez des patients atteints d'un cancer de la prostate ou d'un cancer du poumon. Cette réponse spécifique a aussi été observée chez des individus sains soulignant l'existence de LTs spécifiques de hTERT précurseurs et d'une potentielle cassure de la tolérance (Karanikas et al., 2010 ; Vonderheide et al., 2001 ; Zanetti et al., 2005).

De plus, de précédents essais cliniques ciblant hTERT et basés sur d'autres approches vaccinales justifient d'autant plus le choix de cette cible par Invectys. Pour exemple, le peptide GV1001 combiné à du Temozolomide dans le cadre du mélanome (Kyte et al., 2011) ou le peptide p540 combiné à du GM-CSF dans le cadre du cancer du sein (Domchek et al., 2007) induisent tous deux une réponse spécifique contre hTERT chez les patients (78% contre GV1001 et 68% contre p540) et entraînent une médiane de survie globale largement améliorée (10,4 ; 30 mois).

## **Evaluation de l'efficacité de la vaccination ADN hTERT combinée à une procédure EGT optimisée**

Avant de mettre au point le protocole vaccinal de nos vaccins ADN pour leur utilisation *in vivo*, des caractérisations *in vitro* ont été réalisées afin de vérifier et de valider les différents verrous de sécurité apportés à INVAC-1 ainsi qu'à pUTScram et pUTInv.

### ***Caractérisation in vitro***

La délétion du triplet d'acides aminés VDD (Valine-Acide Aspartique-Acide Aspartique) assure une forme catalytique inactive pour les trois protéines. En effet, ce triplet hautement conservé dans la famille des polymérase (Drosopoulos and Prasad, 2007), est responsable de l'activité catalytique de l'enzyme et par conséquent de son rôle critique dans le processus de transformation maligne.

La deuxième modification concerne la délétion du signal de localisation nucléolaire, NoLS (minimum 15 premiers acides aminés N-terminaux), lieu où s'accumule aussi le composant matrice hTERC et où la hTERT peut en temps normal exercer son activité catalytique (Yang et al., 2002). Cette délétion conduit à une altération drastique de sa distribution cellulaire. En effet, la séquence de localisation nucléaire (NLS) bipartite (R222-R240) de hTERT n'ayant pas été déléetée (Chung et al., 2012), les protéines catalytiquement inactives INVAC-1, Scrambled et Inverted sont distribuées entre le noyau et le cytoplasme avec un profil d'exclusion nucléolaire très marqué en comparaison de la protéine hTERT sauvage.

De plus, ces protéines modifiées ont été fusionnées avec l'ubiquitine afin de les orienter vers la voie de dégradation dépendante du protéasome. Les résultats d'expression protéique démontrent qu'INVAC-1, en accord avec la *N-end rule*, devient une protéine instable rapidement dégradée en comparaison de la protéine hTERT naturelle. Cette stratégie est reliée à la nature et à l'exposition de l'acide aminé N-terminal situé à la jonction de la fusion ubiquitine-protéine constituant un signal spécifique de dégradation (*N-degrons*) (Tasaki et al., 2012). De nombreuses études ont montré une dégradation plus efficace des protéines fusionnées présentant un acide aminé déstabilisant, tel que des résidus chargés positivement (Arg, Lys and His: type 1) ou des résidus hydrophobes (Phe, Trp, Tyr, Leu and Ile: type 2) par rapport à une protéine présentant un acide aminé stabilisant (Val) (Andersson and Barry, 2004

; Bachmair et al., 1986 ; Cadima-Couto et al., 2009).

Contrairement à INVAC-1, les protéines Scrambled et Inverted ne présentent pas d'acides aminés déstabilisants (Asn et Cys) et sont exprimées faiblement sous la forme de produits déjà dégradés. Ces deux protéines peuvent être efficacement dégradées par le protéasome et constituent une source efficace de peptide due à leur mauvais repliement (Howarth and Elliott, 2004 ; Schubert et al., 2000).

Par conséquent, toutes ces stratégies pour cibler le protéasome ont démontré un rôle dans la dégradation protéique et subséquemment dans la présentation antigénique à travers la voie des CMH de classe I (Andersson and Barry, 2004).

### ***Procédure EGT***

La vaccination avec ces constructions ADN *in vivo* a pour but d'induire des réponses immunitaires efficaces spécifiques de hTERT grâce à la transfection et surtout à l'expression des plasmides codant l'antigène directement dans les cellules cibles (Fioretti et al., 2010). Bien que les vaccins ADN aient prouvé leur efficacité dans les modèles précliniques animaux, les données obtenues à ce jour chez l'Homme ne sont pas aussi efficaces qu'attendues. Ces études suggèrent que la méthode de délivrance classique de l'ADN nu induit une immunogénicité sous-optimale chez les patients (Donnelly et al., 2005 ; Lowe et al., 2007).

L'EGT permet d'augmenter l'immunogénicité des vaccins ADN par l'amélioration de leur transfert dans les cellules cibles favorisant la prise en charge antigénique et ainsi l'efficacité de la vaccination (Gothelf and Gehl, 2012 ; Kutzler and Weiner, 2008 ; Saade and Petrovsky, 2012). De plus, de précédents résultats avec des paramètres d'EGT non optimisés ont démontré qu'une vaccination ADN par la voie ID induit des réponses immunitaires CD4 et CD8 spécifiques de hTERT plus élevées que celles induites par la voie IM ou SC. En effet, la peau est un tissu immunogène pertinent de par son riche réseau de cellules immuno-compétentes dont les LCs et les dDCs (Combadiere and Liard, 2011 ; Nicolas and Guy, 2008).

Une procédure d'EGT avec des paramètres électriques optimisés a ainsi été mise au point en collaboration avec l'équipe du Pr. L. M. Mir pour l'injection intradermique de nos vaccins

ADN. En effet, les paramètres électriques optimaux pour l'EGT peuvent être très différents d'un tissu à un autre (Andre et al., 2008). Afin de visualiser l'efficacité de transfection induite par les différentes combinaisons d'EGT testées, des quantifications de bioluminescence après injection d'un plasmide codant la luciférase ont été réalisées (équipe du Pr. L. M. Mir). Néanmoins, l'aspect primordial à évaluer pour l'optimisation de cette procédure reste tout de même l'induction des réponses immunitaires cellulaires suite à une immunisation avec INVAC-1. En effet, l'induction des réponses CTLs et CD4 Th1 est cruciale pour l'immunité anti-tumorale (Mittal et al., 2014 ; Rice et al., 2008 ; Vesely et al., 2011).

Il a ainsi été démontré que les électrodes non-invasives utilisées avec des paramètres EGT adaptés au tissu sous-cutané (Andre et al., 2008) étaient plus efficaces à induire des réponses CD8 spécifiques, en comparaison des électrodes invasives. De plus, les électrodes non-invasives entraînent moins d'inconfort et de douleur que les électrodes invasives à cause de la pénétration des aiguilles dans la peau (Peachman et al., 2003). Il a ensuite fallu déterminer des paramètres électriques appropriés à un EGT dans le derme avec une électrode non-invasive. Une réponse immunitaire efficace ainsi qu'une expression optimale de la luciférase ont été obtenues avec une combinaison d'impulsion HV de 1400 V/cm pendant 100  $\mu$ s (perméabilisation de la membrane plasmique) suivie par une impulsion LV de 180 V/cm pendant 400 ms (mouvement électrophorétique de l'ADN). Cependant, le marquage CE du Cliniporator<sup>®</sup> impose une limite à 1000 V pour des raisons de sécurité, impliquant l'utilisation d'une impulsion HV de 1250 V/cm au lieu de 1400 V/cm qui n'a cependant pas eu de conséquence sur l'induction de la réponse immune.

Les résultats obtenus dans le cadre de la mise au point des paramètres EGT optimaux pour le derme, utilisables à la fois en préclinique et en clinique, doivent absolument tenir compte des cellules ciblées (le champ électrique EGT est inversement proportionnel au diamètre cellulaire) et ne doivent surtout pas négliger que la peau de souris et la peau humaine présentent des similarités mais aussi des différences (Pasparakis et al., 2014).

En effet, l'épiderme et le derme humain sont plus épais que ceux de la souris. L'épiderme humain est caractérisé par la présence de nombreuses couches de kératinocytes (10-12), de crêtes épidermiques et des follicules pileux. L'épiderme de souris se caractérise, quant à lui, par de faibles couches de kératinocytes (2-3) et de très nombreux follicules pileux.

Les cellules immunitaires prédominantes de l'épiderme sont les LCs et les LTs CD8 chez l'Homme, et chez la souris, s'ajoute à ces deux populations une population de LTs  $\gamma\delta$

épidermiques  $V\gamma 5^+$  (DETCs, *Dendritic epidermal T cells*). Néanmoins, bien que le derme humain et le derme de souris soient constitués des mêmes populations cellulaires, macrophages, mastocytes, LTs, ILCs et de dDCs, elles peuvent présenter des fonctionnalités différentes (Pasparakis et al., 2014).

### ***Evaluation du vaccin ADN INVAC-1 in vivo***

Avec cette procédure optimisée, l'immunisation avec INVAC-1 (100  $\mu$ g en ID) induit des réponses CD4 polarisées Th1 spécifiques de hTERT avec sécrétion de cytokine Th1 (majoritaire d'IL-2, TNF et IFN- $\gamma$ ) et de fortes réponses CTLs spécifiques de hTERT avec sécrétion d'IFN- $\gamma$ , de GrB et de TNF (données non montrées pour le TNF) dans différentes lignées de souris. Ces réponses sont observables 14 jours après une immunisation.

Ces résultats confirment tout d'abord l'implication des mécanismes de présentation croisée en accord avec la voie d'injection choisie (Radcliffe et al., 2006). Ces derniers permettent à l'antigène hTERT intracellulaire d'être dégradé par la voie du protéasome (voie endogène) et par les phagolysosomes (voie exogène) et d'être apprêté par les CMH de classe I et II, induisant ainsi les réponses immunitaires CD4 et CD8 spécifiques de hTERT (Guermonprez et al., 2003 ; Shedlock and Weiner, 2000). De plus, d'après un fait largement établi, les LTs CD4 Th1 ont un rôle primordial dans la réponse anti-tumorale en augmentant l'activation et l'expansion clonale des CTLs (Kennedy and Celis, 2008).

En effet, il est démontré que contrairement à une injection par *gene gun*, l'induction des CTLs par immunisation ID requiert l'aide des LTs CD4 Th1. Elle implique l'interaction CD40-CD40L (DC-CD4 ; *licensing*) qui augmente l'expression des molécules de co-stimulation CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) sur les DCs et favorise une activation optimale (Chan et al., 2001 ; Thaïss et al., 2011). Différentes équipes ont aussi démontré que l'IL-2 sécrétée par les LTs CD4 Th1 favorise la génération et le maintien d'une réponse CTL primaire efficace, favorise l'expression de GrB et supporte aussi l'établissement de la réponse CTL mémoire (Antony et al., 2005 ; Bos and Sherman, 2010).

La plupart des protocoles d'immunisations thérapeutiques anti-cancer sont basés sur un schéma de vaccinations multiples (*booster*) dans le but d'augmenter la fréquence des réponses immunes spécifiques du vaccin et d'étendre le pool de cellules mémoires qui s'est constitué lors de la première injection (Church et al., 2011). Dans cette étude, nous avons démontré que

deux cycles d'injection (*prime-boost* homologue) raccourcissent la durée de mise en place de la réponse immunitaire (10 jours après la seconde injection). Ces injections génèrent de nombreux LTs spécifiques (CD4 et CTLs) de hTERT secondaires ciblant de nouveaux épitopes et/ou augmentent rapidement les LTs mémoires spécifiques de hTERT induits lors de la première injection.

L'ampleur de la réponse contre hTERT évaluée avec une (données non montrées) ou avec deux immunisations (à 21 jours d'intervalle) corrobore la génération de réponses spécifiques secondaires. Elle confirme aussi l'avantage des vaccins génétiques à pouvoir encoder l'antigène tumoral entier (Berzofsky et al., 2004), comparé aux vaccins peptidiques actuellement en essais (Kotsakis et al., 2014 ; Parkhurst et al., 2004). Cet aspect des vaccins génétiques représente aussi un avantage pour contourner le mécanisme d'immuno-sélection mis en place par la tumeur qui génère des variants résistants aux cellules immunitaires (Campoli and Ferrone, 2008 ; Leone et al., 2013).

La génération de CTLs spécifiques d'un antigène, bien qu'ils soient polyfonctionnels, ne corrèle pas toujours avec un effet anti-tumoral efficace. Par exemple, dans le cadre du mélanome, aucune réponse clinique n'a été observée chez des patients vaccinés avec un plasmide encodant des peptides Melan-A/MART-1 et tyrosinase, bien qu'ils présentent une réponse immunitaire spécifique Melan-A/MART-1 (Weber et al., 2008). Dans le cadre du cancer métastatique de la prostate, aucune réponse clinique n'a été relevée sur le niveau de PSA chez des patients vaccinés avec un vaccin basé sur des DCs transfectées avec l'ARNm d'une protéine chimérique LAMP-hTERT, alors que 95% des patients développent des réponses CD4 et CD8 spécifiques de hTERT (Su et al., 2005).

Néanmoins, un aspect crucial de la réponse anti-tumorale induite par une vaccination est la capacité des effecteurs, indépendamment de leur quantité, à migrer au site tumoral. Cette migration est essentielle afin de détruire les cellules tumorales à travers leurs mécanismes de cytotoxicité et pour contrôler la progression tumorale (Fisher et al., 2006 ; Palucka et al., 2011). Des CTLs spécifiques de hTERT induits par la vaccination INVAC-1 ont été retrouvés dans les infiltrats tumoraux (TILs) suggérant cette capacité à atteindre une tumeur primaire. En effet, INVAC-1 induit un ralentissement de la pousse tumorale du léiomyosarcome murin Sarc-2 dans des souris HLA-A2/DR1 avec un taux de survie de 50% en comparaison du groupe non-traité.

L'ensemble de ces données permet aujourd'hui l'évaluation d'INVAC-1 dans un essai clinique de phase I multicentrique. Cet essai, débuté mi-Novembre 2014, inclut 18 patients immunocompétents qui seront traités pour des tumeurs solides de stades avancés afin d'évaluer la toxicité du vaccin chez l'Homme tout en espérant aussi améliorer la condition de vie des patients. Si les résultats s'avèrent concluants, une phase II sera entamée et les futures indications thérapeutiques seront déterminées.

Bien que l'essai clinique implique INVAC-1 en monothérapie, il est cependant bien établi, à l'heure actuelle, que le microenvironnement tumoral immunosuppresseur (MDSCs et Tregs) peut diminuer ou inhiber les fonctions des CTLs et impacter les bénéfices cliniques de la vaccination (Kim et al., 2007 ; Ménétrier-Caux et al., 2009 ; Mittal et al., 2014). Etant donné, la diversité des thérapies anti-cancer engageant l'immunité innée et adaptative, il est aujourd'hui classique d'utiliser une approche thérapeutique combinatoire afin d'améliorer l'efficacité des vaccins (Guo et al., 2013).

Ces approches incluent l'utilisation des thérapies ciblées afin de bloquer les voies du processus d'oncogenèse ou d'induire des mécanismes d'ADCC, e.g. le trastuzumab combiné à une vaccination spécifique HER-2/neu dans le cancer du sein induisant de hautes et larges (*epitope spreading*) réponses immunitaires spécifiques chez les patients traités (Disis et al., 2009). Il est également possible d'administrer en supplément des anticorps ciblant les molécules de co-stimulation inhibitrices (*immune checkpoint inhibitors, ICIs*) présentes sur les LTs, les DCs, avec l'anti-CTLA-4 ou l'anti-PD-1, ou les cellules tumorales, avec l'anti-PD-L1. Elles font partie des approches que nous évaluons à l'heure actuelle pour INVAC-1. Par exemple, l'ipilimumab (anti-CTLA-4) administré après le vaccin GVAX (cellules tumorales autologues modifiées pour sécréter du GM-CSF) génère une immunité anti-tumorale significative chez les patients traités atteints de mélanome métastatique (Hodi et al., 2008).

Une combinaison immunothérapie active, thérapies ciblées et mAbs ICIs pourrait aussi s'avérer très prometteuse. En effet, une combinaison anti-PD-L1 et ibrutinib a été démontrée en préclinique pour son aspect synergique à supprimer la croissance tumorale dans le cadre de lymphomes et serait applicable à d'autres tumeurs hématologiques ainsi qu'à des tumeurs solides. Cette synergie a amplifié la réponse immunitaire préexistante et a modifié la balance Th1/Th2 en inhibant l'enzyme essentielle des Th2 (Sagiv-Barfi et al., 2015).

La combinaison des vaccins anti-cancer avec des traitements conventionnels (radiation, chimiothérapie) a aussi un effet synergique en réduisant les masses tumorales volumineuses et en rendant la tumeur plus sensible à l'attaque des CTLs spécifiques (Guo et al., 2013 ; Palucka et al., 2011). Une combinaison de faibles doses de cyclophosphamide (immuno-modulateur) et de doxorubicine (chimiothérapie) augmente l'efficacité d'un vaccin basé sur des cellules tumorales sécrétant du GM-CSF à la fois dans les études précliniques et cliniques probablement par la diminution des Tregs (Emens et al., 2009).

L'autre approche combinatoire pouvant être utilisée notamment pour les vaccins ADN, afin d'améliorer leur immunogénicité et leur efficacité anti-tumorale, réside dans les stratégies de *prime-boost*. Cette stratégie consiste à injecter lors du *boost*, un vaccin lui aussi ADN mais codant la protéine d'intérêt modifiée et réarrangée (cas de Scrambled et Inverted) ou d'utiliser des virus recombinants qui sont décrits pour être plus immunogènes (vecteur viral recombinant rougeole) (Shedlock and Weiner, 2000).

### ***Evaluation des vaccins ADN réarrangés pUTScram et pUTInv in vivo***

Les constructions réarrangées pUTScram et pUTInv développées parallèlement à INVAC-1 ont pour but de favoriser la présentation d'épitopes qui pourraient être différents de ceux induits par la vaccination INVAC-1 (Howarth and Elliott, 2004). Ces deux constructions induisent des fréquences de LTs CD8 spécifiques de hTERT équivalentes à celles obtenues avec INVAC-1 après deux immunisations. Les LTs CD8 spécifiques induits par la vaccination pUTScram et pUTInv ont été démontrés cytotoxiques *in vivo* envers des cellules cibles présentant le peptide hTERT restreint HLA-B7 prédit pour être immuno-dominant sur hTERT et INVAC-1 (Adotevi et al., 2006). Comme démontré précédemment, il pourrait être envisagé ici, que des cycles multiples d'injection pourraient permettre d'augmenter le nombre d'animaux développant une lyse spécifique contre les deux peptides (Church et al., 2011).

Néanmoins, les peptides utilisés pour détecter les réponses spécifiques induites par Scrambled et Inverted sont ceux utilisés pour détecter les réponses induites par INVAC-1. D'après des prédictions *in silico*, ces peptides ne seraient pas les plus adaptés pour évaluer les réponses induites par ces constructions réarrangées. En effet, il est décrit que l'efficacité du processus de dégradation et de présentation antigénique est étroitement liée à la structure tridimensionnelle des protéines, et en particulier dans le cas de protéines potentiellement mal repliées (Ostankovitch et al., 2005). Seule une expérience sur la largeur de la réponse, comme

celle réalisée dans le cadre d'INVAC-1 sur des souris HLA-B7, permettrait de démontrer que Scrambled et Inverted induisent la présentation d'épitopes différents de ceux induits par INVAC-1. Elle démontrerait aussi l'avantage du *prime-boost* INVAC-1/constructions réarrangées dans un contexte d'immuno-sélection tumorale.

Un autre aspect plus ou moins avantageux de ces constructions, est qu'elles ne codent plus pour la hTERT, impliquant un verrou de sécurité supplémentaire. Ce genre de modifications a, par exemple, été réalisé dans le cadre du développement d'un vaccin HPV en réarrangeant l'oncogène E7 (Osen et al., 2001).

## **Evaluation de l'efficacité du vecteur recombinant MV-TERT**

Les vecteurs viraux peuvent être utilisés en tant que stratégie de vaccination à part entière et aussi en tant que stratégie combinatoire notamment avec les vaccins ADN en *prime-boost* hétérologue (Draper and Heeney, 2010 ; Shedlock and Weiner, 2000). Le vaccin vivant atténué de la rougeole, utilisé pour vacciner des millions d'enfants, est décrit pour induire de fortes réponses anticorps et des LTs spécifiques du MV après une ou deux injections avec une persistance de plus de 30 ans (Brandler and Tangy, 2008 ; Okada et al., 2001). A partir de ce vaccin et en utilisant un procédé de génétique inverse, un vecteur permettant d'insérer des transgènes d'intérêt a été créé (Combredet et al., 2003).

La collaboration entre l'équipe du Dr. F. Tangy et Invectys a résulté en la création du vecteur MV-TERT recombinant le transgène Ubi- $\Delta$ hTERT-Flu-V5. Comme attendu, le profil d'expression de la protéine Ubi- $\Delta$ hTERT-Flu-V5 codée par le vecteur est similaire à celui de la protéine INVAC-1. En effet, la protéine Ubi- $\Delta$ hTERT-Flu-V5 étant construite de la même manière que la protéine INVAC-1, elle suit aussi la *N-end rule* et est orientée vers le protéasome grâce à la fusion ubiquitine (Bachmair et al., 1986 ; Tasaki et al., 2012 ; Varshavsky, 1996).

Tout comme l'ADN, le vecteur MV-TERT permet de délivrer l'antigène hTERT aux DCs, aux LTs ainsi qu'aux macrophages qui expriment le CD46, son récepteur préférentiel (Yanagi et al., 2006). Il présente aussi l'avantage d'être naturellement immunogène en mimant

l'infection naturelle et permet l'induction de réponses significatives CD4 et CTLs spécifiques de hTERT dans différentes lignées murines transgéniques (ELISpot et CFSE). Comme attendu, le vecteur entraîne aussi une forte réponse LTs spécifiques des protéines virales de la rougeole. Le pic des réponses observées chez la souris intervient 7 jours après l'infection et apparaît plus rapidement que les pics de réponse observés pour les vaccins ADN. Ce résultat est corroboré par des données de bioluminescence (données non montrées) suggérant la clairance d'un vecteur recombinant luciférase 6 jours après l'infection. De plus, les modèles transgéniques murins utilisés permettent une réplication cytoplasmique rapide du vecteur dans un contexte dénué d'IFN de type I (Mrkic et al., 1998). En effet, les IFNs de type I représentent la première ligne de défense antivirale chez l'Homme, par un contrôle de la réplication virale (Leopardi et al., 1992) que le MV est cependant capable de bloquer (Takeuchi et al., 2003 ; Takeuchi et al., 2005). Cependant, chez la souris, le MV n'a pas cette capacité impliquant le développement de modèles transgéniques mimant ce blocage de façon permanente (IFNAR KO) (Muller et al., 1994 ; Pascolo et al., 1997 ; Yannoutsos et al., 1996).

L'immunogénicité du virus MV et du vecteur MV passe aussi par sa capacité à induire de fortes réponses humorales persistantes (Brandler et al., 2007 ; Nanche et al., 2004). Les souris transgéniques immunisées deux fois avec MV-TERT, à un mois d'intervalle (J0 et J28), développent une forte réponse humorale anti-MV augmentée après la deuxième injection. Cependant, malgré une réponse humorale spécifique de MV, aucun anticorps anti-hTERT n'a été détecté. Bien que, de nombreuses études impliquant le vecteur MV codant des protéines d'enveloppe virales (HIV, WNV, DV, HBV) démontrent l'induction de réponses humorales spécifiques contre ces protéines (Brandler et al., 2010 ; Brandler and Tangy, 2008 ; Lorin et al., 2004 ; Singh et al., 1999), ce résultat n'est pas très surprenant car il s'agit d'une protéine intracellulaire et nucléaire de surcroît. Chez l'Homme, les réponses humorales contre hTERT sont très peu décrites et il est peu probable que ces anticorps présentent un rôle thérapeutique. L'induction d'anticorps anti-hTERT a cependant été observée dans le cas d'un vaccin ADN hTERT combiné avec un agoniste TLR9 (IMO) (Dharmapuri et al., 2009). A ce jour, il n'y a qu'une seule étude démontrant que le niveau d'auto-anticorps anti-hTERT peut être corrélé avec la progression tumorale (carcinome hépatocellulaire) et pourrait représenter un marqueur tumoral pertinent (Masutomi et al., 2002).

Dans le cadre de la stratégie combinatoire ADN/vecteur MV-TERT, nous avons choisi de réaliser un *prime* avec l'ADN INVAC-1 et un *boost* avec le vecteur viral MV-TERT dans le

but d'augmenter les réponses immunitaires spécifiques de hTERT. Les résultats obtenus, ont suggéré que la vaccination ADN INVAC-1 dans des souris IFNAR KO a la capacité d'induire un répertoire CD8 spécifique de hTERT mais est incapable d'initier son expansion, rôle porté par le *boost* avec le vecteur MV-TERT. En effet, l'ADN est en général très efficace pour l'initiation et l'expansion des réponses immunitaires primaires mais est moins adapté à augmenter le niveau des réponses secondaires dû aux faibles doses administrées et/ou à ses propriétés adjuvantes (Woodland, 2004). De plus, les IFNs de type I ont été démontrés essentiels pour l'immunogénicité optimale des vaccins ADN indépendamment de la signalisation impliquée par les TLRs (Coban et al., 2011 ; Ishii et al., 2008). Par conséquent, ces résultats apparaissent complètement inhérents au modèle murin IFNAR.

La fonctionnalité des effecteurs induits est un aspect crucial dans le cadre d'une stratégie anti-cancer (Fisher et al., 2006 ; Palucka et al., 2011). La stratégie combinatoire hétérologue INVAC-1/MV-TERT induit des effecteurs spécifiques de hTERT capables de sécréter des concentrations significatives de l'IL-2, de l'IL-6, de l'IL-10, de l'IFN- $\gamma$  et du TNF, caractéristiques d'un profil CD8 Tc1 (Mosmann et al., 1997) et d'un profil CD4 mixé Th1/Th2. Ces résultats soulignent que cette stratégie pourrait être efficace dans un contexte tumoral. De plus, il ne faut pas négliger l'aspect oncolytique du vecteur rougeole, qui pourrait dans une telle stratégie avoir un effet doublement synergique par l'initiation d'une puissante réponse immunitaire anti-tumorale et par la lyse qu'il induit en infectant les tumeurs.

Les essais cliniques utilisant le vecteur rougeole recombinant un antigène de tumeur tels que le CEA concernent à l'heure actuelle les cancers ovariens (Galanis et al., 2010) et les cancers de la prostate (Msaouel et al., 2009) mais ne se concentrent que sur l'aspect oncolytique du vecteur.



# **CONCLUSION**



A ce jour, de nombreux traitements anti-cancer existent et bien qu'ils aient démontré des effets prometteurs en préclinique, les résultats cliniques sont souvent décevants avec un impact limité pour les patients. Considérant, la large variété de vaccins disponibles, il est aujourd'hui critique de déterminer des facteurs permettant de mettre au point des stratégies de vaccination idéales pouvant combiner différentes immunothérapies, y compris des traitements plus conventionnels. Les vaccins thérapeutiques anti-cancer doivent surtout faire preuve d'une efficacité rapide après une seule dose, d'innocuité, être délivrés en entraînant le moins de douleurs possibles et être économiques.

Dans ce sens, nous avons choisi d'utiliser des vaccins ADN et un vaccin basé sur le vecteur recombinant rougeole afin de cibler l'antigène universel hTERT. Un des avantages communs aux vaccins ADN et aux vaccins recombinants MV est leur capacité à exprimer la totalité d'une protéine permettant ainsi de couvrir toute la diversité des molécules CMH existantes chez l'Homme.

Selon leur mode et leur voie d'injection, toutes nos constructions induisent chez la souris de puissantes réponses immunitaires spécifiques de hTERT. Les effecteurs induits par les différentes vaccinations présentent des caractéristiques essentielles pour la réponse anti-tumorale résidant dans leur polyfonctionnalité. En effet, les LTs CD8 se doivent d'être cytotoxiques par la libération d'IFN- $\gamma$ , de GrB et de perforine et les LTs CD4 doivent principalement être polarisés Th1 afin de soutenir cette réponse et de permettre l'induction de réponses CTLs mémoires. Ces cellules possèdent aussi la capacité de migrer au site tumoral. Bien que nos résultats démontrent une certaine efficacité anti-tumorale chez la souris, les effecteurs vont être confrontés aux mécanismes d'immunosuppression mis en place par la tumeur. Des études préliminaires ont déjà démontré la présence de Tregs dans la tumeur.

Il apparaît évident que l'avantage principal des stratégies vaccinales, qu'elles reposent sur une stratégie de *prime*, *prime-boost* homologue ou hétérologue, est l'induction de puissantes réponses immunitaires anti-tumorales à la fois CD4 et CTLs. Ces stratégies vaccinales représentent d'ores et déjà un espoir pour les patients actuellement en traitement. De plus, la combinaison de leurs réponses immunitaires anti-tumorales avec des thérapies ciblées, des chimiothérapies, des ICI ou autres approches est aujourd'hui essentielle pour surpasser les mécanismes mis en place par la tumeur. Ces combinaisons vont s'avérer prometteuses en clinique pour soigner et améliorer l'état de santé des patients jusqu'à une guérison complète.



# **ANNEXES**



Brevet lié à l'article #2 **A telomerase encoding DNA vaccine.**

European Patent Application PCT/EP2014/073164

Pierre Langlade-Demoyen, Simon Wain-Hobson, Thierry Huet, Christelle Liard, **Elodie Pliquet**



Pliquet, Elodie  
32 rue Marcel Bonnet  
94230 Cachan  
FRANCE

For any questions about  
this communication:  
Tel.: +31 (0)70 340 45 00

Date	31.01.14
------	----------

Reference	Application No./Patent No. 13190547.3 - 1406
Applicant/Proprietor Invectys	

### Designation as inventor - communication under Rule 19(3) EPC

You have been designated as inventor in the above-mentioned European patent application. Below you will find the data contained in the designation of inventor and further data mentioned in Rule 143(1) EPC:

DATE OF FILING : 28.10.13  
 PRIORITY : //  
 TITLE : A telomerase encoding DNA vaccine  
 DESIGNATED STATES : AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB  
 GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO  
 PL PT RO RS SE SI SK SM TR

INVENTOR (PUBLISHED = 1, NOT PUBLISHED = 0):

1/Langlade Demoyen, Pierre/92 avenue Charles-de-Gaulle/92200 Neuilly-sur-Seine/FR  
 1/Wain-Hobson, Simon/3 rue Jean de la Fontaine/78180 Montigny-le-Bretonneux/FR  
 1/Huet, Thierry/21-23 rue Lequesne/94130 Nogent sur Marne/FR  
 1/Liard, Christelle/21 avenue Saint-Exupéry/92320 Châtillon/FR  
 1/Pliquet, Elodie/32 rue Marcel Bonnet/94230 Cachan/FR

DECLARATION UNDER ARTICLE 81 EPC:

The applicant(s) has (have) acquired the right to the European patent as employer(s).

### Receiving Section



## Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for the processing of an international application according to the Patent Cooperation Treaty as follows:

Submission number	3088488	
PCT application number	PCT/EP2014/073164	
Date of receipt	28 October 2014	
Receiving Office	European Patent Office, The Hague	
Your reference	B1698PC00	
Applicant	INVECTYS	
Number of applicants	1	
Country	FR	
Title	A TELOMERASE ENCODING DNA VACCINE	
Documents submitted	eolf-pkda.xml eolf-appb.xml eolf-fees.xml eolf-othd-000001.pdf (77 p.) eolf-appb-P000001.pdf (58 p.)	eolf-requ.xml eolf-seql.txt eolf-vlog.xml eolf-abst.txt
Submitted by	CN=Redha Sekhri 17748	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	28 October 2014, 20:14 (CET)	

Message Digest

0C:8C:07:38:49:DD:AF:CC:54:2A:26:15:9C:75:B4:AB:C6:34:57:67

**Correction by the EPO of errors in debit instructions filed by eOLF**

Errors in debit instructions filed by eOLF that are caused by the editing of Form 1038E entries or the continued use of outdated software (all forms) may be corrected automatically by the EPO, leaving the payment date unchanged (see decision T 152/82, OJ EPO 1984, 301 and point 6.3 ff ADA, Supplement to OJ EPO 10/2007).

/European Patent Office/

# **BIBLIOGRAPHIE**



Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2012). Cellular and molecular immunology, 7th edn (Philadelphia: Elsevier/Saunders).

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2014). Cellular and molecular immunology, Eighth edition. edn.

Achard, C., Boisgerault, N., Delaunay, T., Tangy, F., Grégoire, M., and Fonteneau, J.F. (2015). Induction of Immunogenic Tumor Cell Death by Attenuated Oncolytic Measles Virus. *Journal of Clinical and Cellular Immunology* 6:291.

Adams, G.P., and Weiner, L.M. (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nature Biotechnology* 23, 1147-1157.

Adotevi, O., Mollier, K., Neuveut, C., Cardinaud, S., Boulanger, E., Mignen, B., Fridman, W.H., Zanetti, M., Charneau, P., Tartour, E., *et al.* (2006). Immunogenic HLA-B\*0702-restricted epitopes derived from human telomerase reverse transcriptase that elicit antitumor cytotoxic T-cell responses. *Clinical Cancer Research* 12, 3158-3167.

Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer*. 7, 834-846.

Albini, A., and Sporn, M.B. (2007). The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nature Reviews Cancer* 7, 139-147.

Anderson, J., Gustafsson, K., Himoudi, N., Yan, M., and Heuvelink, J. (2012). Licensing of gammadeltaT cells for professional antigen presentation: A new role for antibodies in regulation of antitumor immune responses. *Oncoimmunology* 1, 1652-1654.

Anderson, R.J., and Schneider, J. (2007). Plasmid DNA and viral vector-based vaccines for the treatment of cancer. *Vaccine* 25 Suppl 2, B24-34.

Andersson, H.A., and Barry, M.A. (2004). Maximizing antigen targeting to the proteasome for gene-based vaccines. *Molecular Therapy* 10, 432-446.

Andre, F.M., Gehl, J., Sersa, G., Preat, V., Hojman, P., Eriksen, J., Golzio, M., Cemazar, M., Pavselj, N., Rols, M.P., *et al.* (2008). Efficiency of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin. *Human Gene Therapy* 19, 1261-1271.

Antony, P.A., Piccirillo, C.A., Akpınarlı, A., Finkelstein, S.E., Speiss, P.J., Surman, D.R., Palmer, D.C., Chan, C.C., Klebanoff, C.A., Overwijk, W.W., *et al.* (2005). CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *Journal of Immunology*. 174, 2591-2601.

Aranda, F., Vacchelli, E., Eggermont, A., Galon, J., Sautès-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013). Trial Watch: Peptide vaccines in cancer therapy. *Oncoimmunology* 2, e26621.

Aranda, F., Vacchelli, E., Obrist, F., Eggermont, A., Galon, J., Herve Fridman, W., Cremer, I., Tartour, E., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2014). Trial Watch: Adoptive cell transfer for anticancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 3, e28344.

Artandi, S.E., Alson, S., Tietze, M.K., Sharpless, N.E., Ye, S., Greenberg, R.A., Castrillon, D.H., Horner, J.W., Weiler, S.R., Carrasco, R.D., and DePinho, R.A. (2002). Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 8191-8196.

Artandi, S.E., and DePinho, R.A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 31, 9-18.

Aurisicchio, L., and Ciliberto, G. (2012). Genetic cancer vaccines: current status and perspectives. *Expert Opinion on Biological Therapy* 12, 1043-1058.

Bachmair, A., Finley, D., and Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234, 179-186.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Bankamp, B., Takeda, M., Zhang, Y., Xu, W., and Rota, P.A. (2011). Genetic Characterization of Measles Vaccine Strains. *Journal of Infectious Diseases* 204, S533-S548.

Barcellos-Hoff, M.H., Lyden, D., and Wang, T.C. (2013). The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* 13, 511-518.

Beatty, G.L., and Vonderheide, R.H. (2008). Telomerase as a universal tumor antigen for cancer vaccines. *Expert Review of Vaccines* 7, 881-887.

Behrens, G., Li, M., Smith, C.M., Belz, G.T., Mintern, J., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2004). Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity. *Immunology and Cell Biology* 82, 84-90.

Berger, M., Kreutz, F.T., Horst, J.L., Baldi, A.C., and Koff, W.J. (2007). Phase I study with an autologous tumor cell vaccine for locally advanced or metastatic prostate cancer. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical sciences* 10, 144-152.

Bermudez, Y., Erasso, D., Johnson, N.C., Alfonso, M.Y., Lowell, N.E., and Kruk, P.A. (2006). Telomerase confers resistance to caspase-mediated apoptosis. *Clinical Interventions in Aging* 1, 155-167.

Bernhardt, S.L., Gjertsen, M.K., Trachsel, S., Moller, M., Eriksen, J.A., Meo, M., Buanes, T., and Gaudernack, G. (2006). Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: A dose escalating phase I/II study. *British Journal of Cancer* 95, 1474-1482.

Berzofsky, J.A., Terabe, M., Oh, S., Belyakov, I.M., Ahlers, J.D., Janik, J.E., and Morris, J.C. (2004). Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *The Journal of Clinical Investigation*. *113*, 1515-1525.

Bhardwaj, N. (2007). Harnessing the immune system to treat cancer. *Journal of Clinical Investigation* *117*, 1130-1136.

Bioley, G., Guillaume, P., Luescher, I., Bhardwaj, N., Mears, G., Old, L., Valmori, D., and Ayyoub, M. (2009). Vaccination With a Recombinant Protein Encoding the Tumor-specific Antigen NY-ESO-1 Elicits an A2/157-165-specific CTL Repertoire Structurally Distinct and of Reduced Tumor Reactivity Than That Elicited by Spontaneous Immune Responses to NY-ESO-1-expressing Tumors. *Journal of Immunotherapy* *32*, 161-168.

Bjerkvig, R., Tysnes, B.B., Aboody, K.S., Najbauer, J., and Terzis, A.J. (2005). Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nature Reviews Cancer* *5*, 899-904.

Bluestone, Jeffrey A., and Small, Eric J. (2012). The Future of Cancer Treatment: Will It Include Immunotherapy? *Cancer Cell* *22*, 7-8.

Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.-P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science* *279*, 349-352.

Bolonaki, I., Kotsakis, A., Papadimitraki, E., Aggouraki, D., Konsolakis, G., Vagia, A., Christophylakis, C., Nikoloudi, I., Magganas, E., Galanis, A., *et al.* (2007). Vaccination of patients with advanced non-small-cell lung cancer with an optimized cryptic human telomerase reverse transcriptase peptide. *Journal of Clinical Oncology* *25*, 2727-2734.

Bonnet, M.C., Tartaglia, J., Verdier, F., Kourilsky, P., Lindberg, A., Klein, M., and Moingeon, P. (2000). Recombinant viruses as a tool for therapeutic vaccination against human cancers. *Immunology Letters* *74*, 11-25.

Boon, T., Coulie, P.G., and Van den Eynde, B. (1997). Tumor antigens recognized by T cells. *Immunology Today* *18*, 267-268.

Bos, R., and Sherman, L.A. (2010). CD4+ T cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Research* *70*, 8368-8377.

Bracci, L., Schiavoni, G., Sistigu, A., and Belardelli, F. (2014). Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death and Differentiation* *21*, 15-25.

Brahmer, J.R., Drake, C.G., Wollner, I., Powderly, J.D., Picus, J., Sharfman, W.H., Stankevich, E., Pons, A., Salay, T.M., McMiller, T.L., *et al.* (2010). Phase I Study of Single-Agent Anti-Programmed Death-1 (MDX-1106) in Refractory Solid Tumors: Safety, Clinical

Activity, Pharmacodynamics, and Immunologic Correlates. *Journal of Clinical Oncology* 28, 3167-3175.

Brandler, S., Lucas-Hourani, M., Moris, A., Frenkiel, M.P., Combredet, C., Fevrier, M., Bedouelle, H., Schwartz, O., Despres, P., and Tangy, F. (2007). Pediatric measles vaccine expressing a dengue antigen induces durable serotype-specific neutralizing antibodies to dengue virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 1, e96.

Brandler, S., Ruffie, C., Najburg, V., Frenkiel, M.P., Bedouelle, H., Despres, P., and Tangy, F. (2010). Pediatric measles vaccine expressing a dengue tetravalent antigen elicits neutralizing antibodies against all four dengue viruses. *Vaccine* 28, 6730-6739.

Brandler, S., and Tangy, F. (2008). Recombinant vector derived from live attenuated measles virus: potential for flavivirus vaccines. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 31, 271-291.

Brichard, V., Van Pel, A., Wölfel, T., Wölfel, C., De Plaen, E., Lethé, B., Coulie, P., and Boon, T. (1993). The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *The Journal of Experimental Medicine* 178, 489-495.

Broccoli, D., Godley, L.A., Donehower, L.A., Varmus, H.E., and de Lange, T. (1996). Telomerase activation in mouse mammary tumors: lack of detectable telomere shortening and evidence for regulation of telomerase RNA with cell proliferation. *Molecular and Cellular Biology* 16, 3765-3772.

Brunsvig, P.F., Aamdal, S., Gjertsen, M.K., Kvalheim, G., Markowski-Grimsrud, C.J., Sve, I., Dyrhaug, M., Trachsel, S., Moller, M., Eriksen, J.A., and Gaudernack, G. (2006). Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunology Immunotherapy* 55, 1553-1564.

Brunsvig, P.F., Kyte, J.A., Kersten, C., Sundstrom, S., Moller, M., Nyakas, M., Hansen, G.L., Gaudernack, G., and Aamdal, S. (2011). 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. *Clinical Cancer Research* 17, 6847-6857.

Burnet, M. (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *British Medical Journal* 1, 779-786.

Cadima-Couto, I., Freitas-Vieira, A., Nowarski, R., Britan-Rosich, E., Kotler, M., and Goncalves, J. (2009). Ubiquitin-fusion as a strategy to modulate protein half-life: A3G antiviral activity revisited. *Virology* 393, 286-294.

Campoli, M., and Ferrone, S. (2008). HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance. *Oncogene* 27, 5869-5885.

Carnes, A.E., Luke, J.M., Vincent, J.M., Anderson, S., Schukar, A., Hodgson, C.P., and Williams, J.A. (2010). Critical design criteria for minimal antibiotic-free plasmid vectors

necessary to combine robust RNA Pol II and Pol III-mediated eukaryotic expression with high bacterial production yields. *The Journal of Gene Medicine*. *12*, 818-831.

Chan, K., Lee, D.J., Schubert, A., Tang, C.M., Crain, B., Schoenberger, S.P., and Corr, M. (2001). The Roles of MHC Class II, CD40, and B7 Costimulation in CTL Induction by Plasmid DNA. *The Journal of Immunology* *166*, 3061-3066.

Chappell, W.H., Steelman, L.S., Long, J.M., Kempf, R.C., Abrams, S.L., Franklin, R.A., Bäsecke, J., Stivala, F., Donia, M., Fagone, P., *et al.* (2011). Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR Inhibitors: Rationale and Importance to Inhibiting These Pathways in Human Health. *Oncotarget* *2*, 135-164.

Cheever, M.A., Allison, J.P., Ferris, A.S., Finn, O.J., Hastings, B.M., Hecht, T.T., Mellman, I., Prindiville, S.A., Viner, J.L., Weiner, L.M., and Matrisian, L.M. (2009). The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clinical Cancer Research* *15*, 5323-5337.

Cheever, M.A., and Higano, C.S. (2011). PROVENGE (Sipuleucel-T) in Prostate Cancer: The First FDA-Approved Therapeutic Cancer Vaccine. *Clinical Cancer Research* *17*, 3520-3526.

Cheng, M., Chen, Y., Xiao, W., Sun, R., and Tian, Z. (2013). NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cellular & Molecular Immunology* *10*, 230-252.

Chung, J., Khadka, P., and Chung, I.K. (2012). Nuclear import of hTERT requires a bipartite nuclear localization signal and Akt-mediated phosphorylation. *Journal of Cell Science* *125*, 2684-2697.

Church, S.E., Jensen, S.M., Twitty, C., Bahjat, K., Hu, H.-M., Urba, W.J., and Fox, B.A. (2011). Multiple Vaccinations: Friend or Foe. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)* *17*, 379-396.

Ciavarella, S., Milano, A., Dammacco, F., and Silvestris, F. (2010). Targeted Therapies in Cancer. *BioDrugs* *24*, 77-88.

Coban, C., Kobiyama, K., Aoshi, T., Takeshita, F., Horii, T., Akira, S., and Ishii, K.J. (2011). Novel strategies to improve DNA vaccine immunogenicity. *Current Gene Therapy* *11*, 479-484.

Coley, W.B. (1991). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 3-11.

Combadiere, B., and Liard, C. (2011). Transcutaneous and intradermal vaccination. *Human Vaccines* *7*, 811-827.

Combredet, C., Labrousse, V., Mollet, L., Lorin, C., Delebecque, F., Hurtrel, B., McClure, H., Feinberg, M.B., Brahic, M., and Tangy, F. (2003). A molecularly cloned Schwarz strain of

measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *Journal of Virology* 77, 11546-11554.

Cong, Y.S., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2002). Human telomerase and its regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 407-425, table of contents.

Cortez-Gonzalez, X., Sidney, J., Adotevi, O., Sette, A., Millard, F., Lemonnier, F., Langlade-Demoyen, P., and Zanetti, M. (2006). Immunogenic HLA-B7-restricted peptides of hTERT. *International Immunology* 18, 1707-1718.

Cui, Z. (2005). DNA vaccine. *Advances in Genetics*. 54, 257-289.

Dagleish, A., and Pandha, H. (2006). Tumor Antigens as Surrogate Markers and Targets for Therapy and Vaccines. In *Advances in Cancer Research*, K.S.G.F.V.W. Garret M. Hampton, and K. George, eds. (Academic Press), pp. 175-190.

De Pas, T., Giovannini, M., Rescigno, M., Catania, C., Toffalorio, F., Spitaleri, G., Delmonte, A., Barberis, M., Spaggiari, L., Solli, P., *et al.* (2012). Vaccines in non-small cell lung cancer: rationale, combination strategies and update on clinical trials. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 83, 432-443.

Deluca, D.S., and Blasczyk, R. (2007). The immunoinformatics of cancer immunotherapy. *Tissue Antigens* 70, 265-271.

Delyon, J., Mateus, C., Lefeuvre, D., Lanoy, E., Zitvogel, L., Chaput, N., Roy, S., Eggermont, A.M.M., Routier, E., and Robert, C. (2013). Experience in daily practice with ipilimumab for the treatment of patients with metastatic melanoma: an early increase in lymphocyte and eosinophil counts is associated with improved survival. *Annals of Oncology* 24, 1697-1703.

Devaux, P., Hudacek, A.W., Hodge, G., Reyes-del Valle, J., McChesney, M.B., and Cattaneo, R. (2011). A Recombinant Measles Virus Unable To Antagonize STAT1 Function Cannot Control Inflammation and Is Attenuated in Rhesus Monkeys. *Journal of Virology* 85, 348-356.

Dharmapuri, S., Peruzzi, D., Mennuni, C., Calvaruso, F., Giampaoli, S., Barbato, G., Kandimalla, E.R., Agrawal, S., Scarselli, E., Mesiti, G., *et al.* (2009). Coadministration of telomerase genetic vaccine and a novel TLR9 agonist in nonhuman primates. *Molecular Therapy* 17, 1804-1813.

Dillman, R.O. (2011). Cancer immunotherapy. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 26, 1-64.

Dilraj, A., Cutts, F.T., Fernandez de Castro, J., Wheeler, J.G., Brown, D., Roth, C., Coovadia, H.M., and Bennett, J.V. (2000). Response to different measles vaccine strains given by aerosol and subcutaneous routes to schoolchildren: a randomised trial. *The Lancet* 355, 798-803.

- Dilraj, A., Sukhoo, R., Cutts, F.T., and Bennett, J.V. (2007). Aerosol and subcutaneous measles vaccine: Measles antibody responses 6 years after re-vaccination. *Vaccine* 25, 4170-4174.
- Disis, M.L., Wallace, D.R., Gooley, T.A., Dang, Y., Slota, M., Lu, H., Coveler, A.L., Childs, J.S., Higgins, D.M., Fintak, P.A., *et al.* (2009). Concurrent Trastuzumab and HER2/neu-Specific Vaccination in Patients With Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 27, 4685-4692.
- Dobrzanski, M.J., Reome, J.B., Hollenbaugh, J.A., and Dutton, R.W. (2004). Tc1 and Tc2 Effector Cell Therapy Elicit Long-Term Tumor Immunity by Contrasting Mechanisms That Result in Complementary Endogenous Type 1 Antitumor Responses. *The Journal of Immunology* 172, 1380-1390.
- Domchek, S.M., Recio, A., Mick, R., Clark, C.E., Carpenter, E.L., Fox, K.R., DeMichele, A., Schuchter, L.M., Leibowitz, M.S., Wexler, M.H., *et al.* (2007). Telomerase-specific T-cell immunity in breast cancer: effect of vaccination on tumor immunosurveillance. *Cancer Research* 67, 10546-10555.
- Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., *et al.* (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine* 8, 793-800.
- Donnelly, J.J., Wahren, B., and Liu, M.A. (2005). DNA vaccines: progress and challenges. *Journal of Immunology* 175, 633-639.
- Dosset, M., Godet, Y., Vauchy, C., Beziaud, L., Lone, Y.C., Sedlik, C., Liard, C., Levionnois, E., Clerc, B., Sandoval, F., *et al.* (2012). Universal cancer peptide-based therapeutic vaccine breaks tolerance against telomerase and eradicates established tumor. *Clinical Cancer Research* 18, 6284-6295.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 3, 11-22.
- Draper, S.J., and Heeney, J.L. (2010). Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nature Reviews Microbiology* 8, 62-73.
- Drosopoulos, W.C., and Prasad, V.R. (2007). The active site residue Valine 867 in human telomerase reverse transcriptase influences nucleotide incorporation and fidelity. *Nucleic Acids Research* 35, 1155-1168.
- Dudek, A.M., Martin, S., Garg, A.D., and Agostinis, P. (2013). Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. *Frontiers in Immunology* 4, 438.

Dudognon, C., Pendino, F., Hillion, J., Saumet, A., Lanotte, M., and Segal-Bendirdjian, E. (2004). Death receptor signaling regulatory function for telomerase: hTERT abolishes TRAIL-induced apoptosis, independently of telomere maintenance. *Oncogene* 23, 7469-7474.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*. 3, 991-998.

Dunn, G.P., Koebel, C.M., and Schreiber, R.D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology* 6, 836-848.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology* 22, 329-360.

Dunn, G.P., Sheehan, K.C.F., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2005). IFN Unresponsiveness in LNCaP Cells Due to the Lack of JAK1 Gene Expression. *Cancer Research* 65, 3447-3453.

Dwyer, J., Li, H., Xu, D., and Liu, J.P. (2007). Transcriptional regulation of telomerase activity: roles of the the Ets transcription factor family. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1114, 36-47.

Eggermont, A.M.M., Kroemer, G., and Zitvogel, L. (2013). Immunotherapy and the concept of a clinical cure. *European Journal of Cancer* 49, 2965-2967.

Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskd* 5, 273-290.

Elkak, A., Mokbel, R., Wilson, C., Jiang, W.G., Newbold, R.F., and Mokbel, K. (2006). hTERT mRNA expression is associated with a poor clinical outcome in human breast cancer. *Anticancer Research*. 26, 4901-4904.

Ellebaek, E., Engell-Noerregaard, L., Iversen, T.Z., Froesig, T.M., Munir, S., Hadrup, S.R., Andersen, M.H., and Svane, I.M. (2012). Metastatic melanoma patients treated with dendritic cell vaccination, Interleukin-2 and metronomic cyclophosphamide: results from a phase II trial. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 61, 1791-1804.

Ellis, L.M., and Hicklin, D.J. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature Reviews Cancer* 8, 579-591.

Ellyard, J.I., Simson, L., and Parish, C.R. (2007). Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens* 70, 1-11.

Elhekave, M., Furmanov, K., and Hovav, A.H. (2011). Intradermal naked plasmid DNA immunization: mechanisms of action. *Expert Review of Vaccines* 10, 1169-1182.

Elsedawy, N.B., and Russell, S.J. (2013). Oncolytic vaccines. *Expert Review of Vaccines* 12, 1155-1172.

Emens, L.A., Asquith, J.M., Leatherman, J.M., Kobrin, B.J., Petrik, S., Laiko, M., Levi, J., Daphtary, M.M., Biedrzycki, B., Wolff, A.C., *et al.* (2009). Timed Sequential Treatment With Cyclophosphamide, Doxorubicin, and an Allogeneic Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Secreting Breast Tumor Vaccine: A Chemotherapy Dose-Ranging Factorial Study of Safety and Immune Activation. *Journal of Clinical Oncology* 27, 5911-5918.

Endmann, A., Baden, M., Weisermann, E., Kapp, K., Schroff, M., Kleuss, C., Wittig, B., and Juhls, C. (2010). Immune response induced by a linear DNA vector: influence of dose, formulation and route of injection. *Vaccine* 28, 3642-3649.

Eriksson, F., Tötterman, T., Maltais, A.-K., Pisa, P., and Yachnin, J. (2013). DNA vaccine coding for the rhesus prostate specific antigen delivered by intradermal electroporation in patients with relapsed prostate cancer. *Vaccine* 31, 3843-3848.

Escoffre, J.-M., Portet, T., Wasungu, L., Teissié, J., Dean, D., and Rols, M.-P. (2009). What is (Still not) Known of the Mechanism by Which Electroporation Mediates Gene Transfer and Expression in Cells and Tissues. *Molecular Biotechnology* 41, 286-295.

Fioretti, D., Iurescia, S., Fazio, V.M., and Rinaldi, M. (2010). DNA vaccines: developing new strategies against cancer. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. 2010, 174378.

Fisher, D.T., Chen, Q., Appenheimer, M.M., Skitzki, J., Wang, W.C., Odunsi, K., and Evans, S.S. (2006). Hurdles to lymphocyte trafficking in the tumor microenvironment: implications for effective immunotherapy. *Immunological Investigations*. 35, 251-277.

Fotin-Mleczek, M., Zanzinger, K., Heidenreich, R., Lorenz, C., Thess, A., Duchardt, K.M., and Kallen, K.-J. (2012). Highly potent mRNA based cancer vaccines represent an attractive platform for combination therapies supporting an improved therapeutic effect. *The Journal of Gene Medicine* 14, 428-439.

Galanis, E., Hartmann, L.C., Cliby, W.A., Long, H.J., Peethambaram, P.P., Barrette, B.A., Kaur, J.S., Haluska, P.J., Jr., Aderca, I., Zollman, P.J., *et al.* (2010). Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Research* 70, 875-882.

Galluzzi, L., Senovilla, L., Vacchelli, E., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Sautes-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2012). Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. *Oncoimmunology* 1, 1111-1134.

Gehl, J. (2003). Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiologica Scandinavica* 177, 437-447.

Gerard, C., and Debruyne, C. (2009). Immunotherapy in the landscape of new targeted treatments for non-small cell lung cancer. *Molecular Oncology* 3, 409-424.

Gerber, D.E. (2008). Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American Family Physician* 77, 311-319.

Ghosh, A., Saginc, G., Leow, S.C., Khattar, E., Shin, E.M., Yan, T.D., Wong, M., Zhang, Z., Li, G., Sung, W.-K., *et al.* (2012). Telomerase directly regulates NF- $\kappa$ B-dependent transcription. *Nature Cell Biology* 14, 1270-1281.

Gladych, M., Wojtyla, A., and Rubis, B. (2011). Human telomerase expression regulation. *Biochemistry and Cell Biology* 89, 359-376.

Godet, Y., Fabre, E., Dosset, M., Lamuraglia, M., Levionnois, E., Ravel, P., Benhamouda, N., Cazes, A., Le Pimpec-Barthes, F., Gaugler, B., *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. *Clinical Cancer Research* 18, 2943-2953.

Gomez, D.L., Farina, H.G., and Gomez, D.E. (2013). Telomerase regulation: a key to inhibition? (Review). *Int J Oncol* 43, 1351-1356.

Gonzalez-Angulo, A.M., Hortobagyi, G.N., and Esteva, F.J. (2006). Adjuvant therapy with trastuzumab for HER-2/neu-positive breast cancer. *The Oncologist* 11, 857-867.

González-Suárez, E., Samper, E., Ramírez, A., Flores, J.M., Martín-Caballero, J., Jorcano, J.L., and Blasco, M.A. (2001). Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes. *The EMBO journal* 20, 2619-2630.

Gordon, L.I., Witzig, T., Molina, A., Czuczman, M., Emmanouilides, C., Joyce, R., Vo, K., Theuer, C., Pohlman, B., Bartlett, N., *et al.* (2004). Yttrium 90–Labeled Ibritumomab Tiuxetan Radioimmunotherapy Produces High Response Rates and Durable Remissions in Patients with Previously Treated B-Cell Lymphoma. *Clinical Lymphoma* 5, 98-101.

Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* 5, 953-964.

Gothelf, A., and Gehl, J. (2012). What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 8, 1694-1702.

Gothelf, A., Hojman, P., and Gehl, J. (2010). Therapeutic levels of erythropoietin (EPO) achieved after gene electrotransfer to skin in mice. *Gene Therapy* 17, 1077-1084.

Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43, 405-413.

Griffin, D.E. (2010). Measles virus-induced suppression of immune responses. *Immunological Reviews* 236, 176-189.

Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* *419*, 734-738.

Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., van Endert, P., and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* *425*, 397-402.

Guillerme, J.B., Gregoire, M., Tangy, F., and Fonteneau, J.F. (2013). Antitumor Virotherapy by Attenuated Measles Virus (MV). *Biology (Basel)* *2*, 587-602.

Guo, C., Manjili, M.H., Subjeck, J.R., Sarkar, D., Fisher, P.B., and Wang, X.Y. (2013). Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. *Advances in Cancer Research*. *119*, 421-475.

Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W., and Weinberg, R.A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* *400*, 464-468.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.

Harris, J.E., Ryan, L., Hoover, H.C., Jr., Stuart, R.K., Oken, M.M., Benson, A.B., 3rd, Mansour, E., Haller, D.G., Manola, J., and Hanna, M.G., Jr. (2000). Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283. *Journal of Clinical Oncology* *18*, 148-157.

Hayflick, L. (1980). Recent advances in the cell biology of aging. *Mechanisms of Ageing and Development* *14*, 59-79.

Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nature Reviews Immunology* *1*, 126-134.

Hernandez, J., Garcia-Pons, F., Lone, Y.C., Firat, H., Schmidt, J.D., Langlade-Demoyen, P., and Zanetti, M. (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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 12275-12280.

Herrada, A.A., Rojas-Colonelli, N., González-Figueroa, P., Roco, J., Oyarce, C., Ligtenberg, M.A., and Lladser, A. (2012). Harnessing DNA-induced immune responses for improving cancer vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* *8*, 1682-1693.

Hiyama, E., and Hiyama, K. (2002). Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene* *21*, 643-649.

Hiyama, E., and Hiyama, K. (2003). Telomerase as tumor marker. *Cancer Letters* 194, 221-233.

Hiyama, E., Yamaoka, H., Matsunaga, T., Hayashi, Y., Ando, H., Suita, S., Horie, H., Kaneko, M., Sasaki, F., Hashizume, K., *et al.* (2004). High expression of telomerase is an independent prognostic indicator of poor outcome in hepatoblastoma. *British Journal of Cancer* 91, 972-979.

Hodi, F.S., Butler, M., Oble, D.A., Seiden, M.V., Haluska, F.G., Kruse, A., MacRae, S., Nelson, M., Canning, C., Lowy, I., *et al.* (2008). Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 3005-3010.

Holt, G.E., Podack, E.R., and Raez, L.E. (2011). Immunotherapy as a strategy for the treatment of non-small-cell lung cancer. *Therapy* 8, 43-54.

Horvat, B., Rivaller, P., Varior-Krishnan, G., Cardoso, A., Gerlier, D., and Rabourdin-Combe, C. (1996). Transgenic mice expressing human measles virus (MV) receptor CD46 provide cells exhibiting different permissivities to MV infections. *Journal of Virology* 70, 6673-6681.

Howarth, M., and Elliott, T. (2004). The processing of antigens delivered as DNA vaccines. *Immunological Reviews* 199, 27-39.

Huppa, J.B., and Davis, M.M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nature Reviews Immunology* 3, 973-983.

Ishii, K.J., Kawagoe, T., Koyama, S., Matsui, K., Kumar, H., Kawai, T., Uematsu, S., Takeuchi, O., Takeshita, F., Coban, C., and Akira, S. (2008). TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* 451, 725-729.

Iurescia, S., Fioretti, D., Fazio, V.M., and Rinaldi, M. (2012). Epitope-driven DNA vaccine design employing immunoinformatics against B-cell lymphoma: a biotech's challenge. *Biotechnology Advances* 30, 372-383.

Janssen, E.M., Droin, N.M., Lemmens, E.E., Pinkoski, M.J., Bensinger, S.J., Ehst, B.D., Griffith, T.S., Green, D.R., and Schoenberger, S.P. (2005). CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434, 88-93.

Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M.G., and Schoenberger, S.P. (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421, 852-856.

Jin, X., Beck, S., Sohn, Y.-W., Kim, J.-K., Kim, S.-H., Yin, J., Pian, X., Kim, S.-C., Choi, Y.-J., and Kim, H. (2010). Human telomerase catalytic subunit (hTERT) suppresses p53-

mediated anti-apoptotic response via induction of basic fibroblast growth factor. *Experimental & Molecular Medicine* 42, 574-582.

Jon, A.W., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P.L. (1990). Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science* 247, 1465-1468.

Jones, A., Barrett-Lee, P.J., and Mason, M.D. (2004). Hormonal therapy in cancer. *Medicine* 32, 30-32.

Kantoff, P.W., Higano, C.S., Shore, N.D., Berger, E.R., Small, E.J., Penson, D.F., Redfern, C.H., Ferrari, A.C., Dreicer, R., Sims, R.B., *et al.* (2010a). Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine* 363, 411-422.

Kantoff, P.W., Schuetz, T.J., Blumenstein, B.A., Glode, L.M., Billhartz, D.L., Wyand, M., Manson, K., Panicali, D.L., Laus, R., Schlom, J., *et al.* (2010b). Overall Survival Analysis of a Phase II Randomized Controlled Trial of a Poxviral-Based PSA-Targeted Immunotherapy in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 28, 1099-1105.

Kaplan-Lefko, P.J., Graves, J.D., Zoog, S.J., Pan, Y., Wall, J., Branstetter, D.G., Moriguchi, J., Coxon, A., Huard, J.N., Xu, R., *et al.* (2010). Conatumumab, a fully human agonist antibody to death receptor 5, induces apoptosis via caspase activation in multiple tumor types. *Cancer Biology & Therapy* 9, 618-631.

Karanikas, V., Zamanakou, M., Soukou, F., Kerenidi, T., Gourgoulanis, K.I., and Germenis, A.E. (2010). Naturally occurring tumor-specific CD8<sup>+</sup> T-cell precursors in individuals with and without cancer. *Immunology and Cell Biology*. 88, 575-585.

Kärber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 162, 480-483.

Karin, M., and Greten, F.R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology* 5, 749-759.

Kass, E., Schlom, J., Thompson, J., Guadagni, F., Graziano, P., and Greiner, J.W. (1999). Induction of Protective Host Immunity to Carcinoembryonic Antigen (CEA), a Self-Antigen in CEA Transgenic Mice, by Immunizing with a Recombinant Vaccinia-CEA Virus. *Cancer Research* 59, 676-683.

Kawakami, Y., Eliyahu, S., Sakaguchi, K., Robbins, P.F., Rivoltini, L., Yannelli, J.R., Appella, E., and Rosenberg, S.A. (1994). Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 180, 347-352.

Kennedy, R., and Celis, E. (2008). Multiple roles for CD4<sup>+</sup> T cells in anti-tumor immune responses. *Immunological Reviews* 222, 129-144.

Kenney, R.T., Frech, S.A., Muenz, L.R., Villar, C.P., and Glenn, G.M. (2004). Dose Sparing with Intradermal Injection of Influenza Vaccine. *New England Journal of Medicine* 351, 2295-2301.

Khan, M.M. (2008). *Immunopharmacology*.

Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121, 1-14.

Kim, Y.C., and Prausnitz, M.R. (2011). Enabling skin vaccination using new delivery technologies. *Drug Delivery and Translational Research* 1, 7-12.

Kis, E.E., Winter, G., and Myschik, J. (2012). Devices for intradermal vaccination. *Vaccine* 30, 523-538.

Klinman, D.M., Yamshchikov, G., and Ishigatsubo, Y. (1997). Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *The Journal of Immunology* 158, 3635-3639.

Knuchel, M.C., Marty, R.R., Morin, T.N.A., Ilter, O., Zuniga, A., and Naim, H.Y. (2013). Relevance of a pre-existing measles immunity prior immunization with a recombinant measles virus vector. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 9, 599-606.

Kolumam, G.A., Thomas, S., Thompson, L.J., Sprent, J., and Murali-Krishna, K. (2005). Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *The Journal of Experimental Medicine* 202, 637-650.

Kono, H., and Rock, K.L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology* 8, 279-289.

Kosits, C., and Callaghan, M. (2000). Rituximab: a new monoclonal antibody therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Oncology Nursing Forum* 27, 51-59.

Kotsakis, A., Papadimitraki, E., Vetsika, E.K., Aggouraki, D., Dermitzaki, E.K., Hatzidaki, D., Kentepozidis, N., Mavroudis, D., and Georgoulas, V. (2014). A phase II trial evaluating the clinical and immunologic response of HLA-A2(+) non-small cell lung cancer patients vaccinated with an hTERT cryptic peptide. *Lung Cancer* 86, 59-66.

Kotsakis, A., Vetsika, E.K., Christou, S., Hatzidaki, D., Vardakis, N., Aggouraki, D., Konsolakis, G., Georgoulas, V., Christophyllakis, C., Cordopatis, P., *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. *Annals of Oncology* 23, 442-449.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., and Zitvogel, L. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annual Review of Immunology* 31, 51-72.

- Kupper, T.S., and Fuhlbrigge, R.C. (2004). Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nature Reviews Immunology* 4, 211-222.
- Kutzler, M.A., and Weiner, D.B. (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics* 9, 776-788.
- Kyte, J.A., Gaudernack, G., Dueland, S., Trachsel, S., Julsrud, L., and Aamdal, S. (2011). Telomerase peptide vaccination combined with temozolomide: a clinical trial in stage IV melanoma patients. *Clinical Cancer Research* 17, 4568-4580.
- Ladanyi, M., and Pao, W. (2008). Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond. *Modern Pathology* 21, S16-S22.
- Lambert, P.H., and Laurent, P.E. (2008). Intradermal vaccine delivery: will new delivery systems transform vaccine administration? *Vaccine* 26, 3197-3208.
- Larocca, C., and Schlom, J. (2011). Viral Vector –based Therapeutic Cancer Vaccines. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 17, 359-371.
- Laurent, P.E., Bonnet, S., Alchas, P., Regolini, P., Mikszta, J.A., Pettis, R., and Harvey, N.G. (2007). Evaluation of the clinical performance of a new intradermal vaccine administration technique and associated delivery system. *Vaccine* 25, 8833-8842.
- Leachman, S.A., Shylankevich, M., Slade, M.D., Levine, D., Sundaram, R.K., Xiao, W., Bryan, M., Zelterman, D., Tiegelaar, R.E., and Brandsma, J.L. (2002). Ubiquitin-fused and/or multiple early genes from cottontail rabbit papillomavirus as DNA vaccines. *Journal of Virology* 76, 7616-7624.
- Leone, P., Shin, E.-C., Perosa, F., Vacca, A., Dammacco, F., and Racanelli, V. (2013). MHC Class I Antigen Processing and Presenting Machinery: Organization, Function, and Defects in Tumor Cells. *Journal of the National Cancer Institute* 105, 1172-1187.
- Leopardi, R., Hyypia, T., and Vainionpaa, R. (1992). Effect of interferon-alpha on measles virus replication in human peripheral blood mononuclear cells. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 100, 125-131.
- Lin, W.-W., and Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 117, 1175-1183.
- Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., and Cech, T.R. (1997). Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase. *Science* 276, 561-567.
- Liu, M.A. (2003). DNA vaccines: a review. *Journal of Internal Medicine*. 253, 402-410.
- Liu, M.A., and Ulmer, J.B. (2005). Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Advances in Genetics* 55, 25-40.

- Liu, Z., Li, Q., Li, K., Chen, L., Li, W., Hou, M., Liu, T., Yang, J., Lindvall, C., Bjorkholm, M., *et al.* (2013). Telomerase reverse transcriptase promotes epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like traits in cancer cells. *Oncogene* 32, 4203-4213.
- Lorin, C., Mollet, L., Delebecque, F., Combredet, C., Hurtrel, B., Charneau, P., Brahic, M., and Tangy, F. (2004). A single injection of recombinant measles virus vaccines expressing human immunodeficiency virus (HIV) type 1 clade B envelope glycoproteins induces neutralizing antibodies and cellular immune responses to HIV. *Journal of Virology* 78, 146-157.
- Low, K.C., and Tergaonkar, V. (2013). Telomerase: central regulator of all of the hallmarks of cancer. *Trends in Biochemical Sciences* 38, 426-434.
- Lowe, D.B., Shearer, M.H., Jumper, C.A., and Kennedy, R.C. (2007). Towards progress on DNA vaccines for cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64, 2391-2403.
- Lü, M.-H., Deng, J.-Q., Cao, Y.-L., Fang, D.-C., Zhang, Y.A.O., and Yang, S.-M. (2012). Prognostic role of telomerase activity in gastric adenocarcinoma: A meta-analysis. *Experimental and Therapeutic Medicine* 3, 728-734.
- Lu, S. (2009). Heterologous prime-boost vaccination. *Current Opinion in Immunology* 21, 346-351.
- Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., and Xia, B. (2012). CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology* 2012, 12.
- Luke, J., Carnes, A.E., Hodgson, C.P., and Williams, J.A. (2009). Improved antibiotic-free DNA vaccine vectors utilizing a novel RNA based plasmid selection system. *Vaccine* 27, 6454-6459.
- Ly, H. (2011). Telomere dynamics in induced pluripotent stem cells: Potentials for human disease modeling. *World Journal of Stem Cells* 3, 89-95.
- Ma, Y., Shurin, G.V., Peiyuan, Z., and Shurin, M.R. (2013). Dendritic cells in the cancer microenvironment. *Journal of Cancer* 4, 36-44.
- MacGregor, R.R., Boyer, J.D., Ugen, K.E., Lacy, K.E., Gluckman, S.J., Bagarazzi, M.L., Chattergoon, M.A., Baine, Y., Higgins, T.J., Ciccarelli, R.B., *et al.* (1998). First Human Trial of a DNA-Based Vaccine for Treatment of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Safety and Host Response. *Journal of Infectious Diseases* 178, 92-100.
- MacKie, R.M., Reid, R., and Junor, B. (2003). Fatal Melanoma Transferred in a Donated Kidney 16 Years after Melanoma Surgery. *New England Journal of Medicine* 348, 567-568.
- Madan, R.A., Arlen, P.M., Mohebtash, M., Hodge, J.W., and Gulley, J.L. (2009). Prostavac-VF: a vector-based vaccine targeting PSA in prostate cancer. *Expert opinion on investigational drugs* 18, 1001-1011.

Mantoux, C. (1910). L'intradermo-reaction a la tuberculine et son interpretation clinique. *Presse Medicale* 18, 10-13.

Mantovani, A. (2014). Macrophages, Neutrophils, and Cancer: A Double Edged Sword. *New Journal of Science* 2014, 14.

March-Villalba, J.A., Martinez-Jabaloyas, J.M., Herrero, M.J., Santamaria, J., Alino, S.F., and Dasi, F. (2012). Cell-free circulating plasma hTERT mRNA is a useful marker for prostate cancer diagnosis and is associated with poor prognosis tumor characteristics. *PLoS One* 7, e43470.

Marchetti, A., Pellegrini, C., Buttitta, F., Falleni, M., Romagnoli, S., Felicioni, L., Barassi, F., Salvatore, S., Chella, A., Angeletti, C.A., *et al.* (2002). Prediction of survival in stage I lung carcinoma patients by telomerase function evaluation. *Laboratory Investigation* 82, 729-736.

Marie-Egyptienne, D.T., and Autexier, C. (2006). Anomalies du complexe de la télomérase en pathologie hématologique. *Hématologie* 12, 267-273.

Marshall, J.L., Hoyer, R.J., Toomey, M.A., Faraguna, K., Chang, P., Richmond, E., Pedicano, J.E., Gehan, E., Peck, R.A., Arlen, P., *et al.* (2000). Phase I study in advanced cancer patients of a diversified prime-and-boost vaccination protocol using recombinant vaccinia virus and recombinant nonreplicating avipox virus to elicit anti-carcinoembryonic antigen immune responses. *Journal of Clinical Oncology* 18, 3964-3973.

Marten, A., Sievers, E., Albers, P., Muller, S., Franchy, C., von Ruecker, A., Strunk, H., Schild, H.H., Schmiedel, A., Sommer, T., *et al.* (2006). Telomerase-pulsed dendritic cells: preclinical results and outcome of a clinical phase I/II trial in patients with metastatic renal cell carcinoma. *German Medical Science* 4, Doc02.

Masutomi, K., Kaneko, S., Yasukawa, M., Arai, K., Murakami, S., and Kobayashi, K. (2002). Identification of serum anti-human telomerase reverse transcriptase (hTERT) auto-antibodies during progression to hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 21, 5946-5950.

Matsushita, H., Vesely, M.D., Koboldt, D.C., Rickert, C.G., Uppaluri, R., Magrini, V.J., Arthur, C.D., White, J.M., Chen, Y.S., Shea, L.K., *et al.* (2012). Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* 482, 400-404.

Mavroudis, D., Bolonakis, I., Cornet, S., Myllaki, G., Kanellou, P., Kotsakis, A., Galanis, A., Nikoloudi, I., Spyropoulou, M., Menez, J., *et al.* (2006). A phase I study of the optimized cryptic peptide TERT(572y) in patients with advanced malignancies. *Oncology* 70, 306-314.

McCarthy, E.F. (2006). The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *The Iowa Orthopaedic Journal* 26, 154-158.

McCullough, K.D., Coleman, W.B., Ricketts, S.L., Wilson, J.W., Smith, G.J., and Grisham, J.W. (1998). Plasticity of the neoplastic phenotype in vivo is regulated by epigenetic factors.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 15333-15338.

McGraw, K., Rosenblum, M., Cheung, L., and Scheinberg, D. (1994). Characterization of murine and humanized anti-CD33, gelonin immunotoxins reactive against myeloid leukemias. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 39, 367-374.

Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480, 480-489.

Ménétrier-Caux, C., Gobert, M., and Caux, C. (2009). Differences in Tumor Regulatory T-Cell Localization and Activation Status Impact Patient Outcome. *Cancer Research* 69, 7895-7898.

Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual Review of Immunology* 31, 563-604.

Michielsen, A.J., Ryan, E.J., and O'Sullivan, J.N. (2012). Dendritic cell inhibition correlates with survival of colorectal cancer patients on bevacizumab treatment. *Oncoimmunology* 1, 1445-1447.

Millard, F.E., Gerloni, M., Darrah, D., P., F., and M., Z. (2004). Phase I study of transgenic B lymphocyte immunization (TLI) against telomerase in androgen-independent prostate cancer (PC) *Journal of Clinical Oncology* 22.

Miller, A.M., Özenci, V., Kiessling, R., and Pisa, P. (2005). Immune Monitoring in a Phase 1 Trial of a PSA DNA Vaccine in Patients with Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Journal of Immunotherapy* 28, 389-395.

Minev, B., Hipp, J., Firat, H., Schmidt, J.D., Langlade-Demoyen, P., and Zanetti, M. (2000). Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4796-4801.

Mir, L.M., Moller, P.H., André, F., and Gehl, J. (2005). Electric Pulse-Mediated Gene Delivery to Various Animal Tissues. *Advances in Genetics Volume 54*, 83-114.

Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology* 27, 16-25.

Moon, I.K., and Jarstfer, M.B. (2007). The human telomere and its relationship to human disease, therapy, and tissue engineering. *Frontiers in Bioscience* 12, 4595-4620.

Morin, G.B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59, 521-529.

- Morrison, S.J., Prowse, K.R., Ho, P., and Weissman, I.L. (1996). Telomerase Activity in Hematopoietic Cells Is Associated with Self-Renewal Potential. *Immunity* 5, 207-216.
- Mosmann, T.R., Li, L., and Sad, S. (1997). Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Seminars in Immunology* 9, 87-92.
- Moss, W.J., and Griffin, D.E. (2006). Global measles elimination. *Nature Reviews Microbiology* 4, 900-908.
- Moss, W.J., and Griffin, D.E. (2012). Measles. *Lancet* 379, 153-164.
- Motzer, R.J., Hutson, T.E., Tomczak, P., Michaelson, M.D., Bukowski, R.M., Rixe, O., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Kim, S.T., *et al.* (2007). Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* 356, 115-124.
- Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R., and Johansson, C.C. (2010). Chapter 3 - Regulatory T Cells in Cancer. In *Advances in Cancer Research*, F.V.W. George, and K. George, eds. (Academic Press), pp. 57-117.
- Mrkic, B., Pavlovic, J., Rulicke, T., Volpe, P., Buchholz, C.J., Hourcade, D., Atkinson, J.P., Aguzzi, A., and Cattaneo, R. (1998). Measles virus spread and pathogenesis in genetically modified mice. *Journal of Virology* 72, 7420-7427.
- Msaouel, P., Iankov, I.D., Allen, C., Morris, J.C., von Messling, V., Cattaneo, R., Koutsilieris, M., Russell, S.J., and Galanis, E. (2009). Engineered measles virus as a novel oncolytic therapy against prostate cancer. *Prostate* 69, 82-91.
- Muhlebach, M.D., Mateo, M., Sinn, P.L., Pruffer, S., Uhlig, K.M., Leonard, V.H.J., Navaratnarajah, C.K., Frenzke, M., Wong, X.X., Sawatsky, B., *et al.* (2011). Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* 480, 530-533.
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L.F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R.M., and Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264, 1918-1921.
- Murray, K.P., Mathure, S., Kaul, R., Khan, S., Carson, L.F., Twiggs, L.B., Martens, M.G., and Kaul, A. (2000). Expression of complement regulatory proteins-CD 35, CD 46, CD 55, and CD 59-in benign and malignant endometrial tissue. *Gynecologic Oncology* 76, 176-182.
- Naniche, D., Garenne, M., Rae, C., Manchester, M., Buchta, R., Brodine, S.K., and Oldstone, M.B.A. (2004). Decrease in Measles Virus-Specific CD4 T Cell Memory in Vaccinated Subjects. *Journal of Infectious Diseases* 190, 1387-1395.
- Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.Z., and Nickoloff, B.J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 9, 679-691.

Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P.H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal* 1, 841-845.

Nicolas, J.F., and Guy, B. (2008). Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. *Expert Reviews of Vaccines* 7, 1201-1214.

Novellino, L., Castelli, C., and Parmiani, G. (2005). A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunology Immunotherapy* 54, 187-207.

Ohno, S., Ono, N., Takeda, M., Takeuchi, K., and Yanagi, Y. (2004). Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *Journal of General Virology* 85, 2991-2999.

Okada, H., Sato, T.A., Katayama, A., Higuchi, K., Shichijo, K., Tsuchiya, T., Takayama, N., Takeuchi, Y., Abe, T., Okabe, N., and Tashiro, M. (2001). Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Archives of Virology* 146, 859-874.

Old, L.J., and Boyse, E.A. (1964). Immunology of Experimental Tumors. *Annual Review of Medicine* 15, 167-186.

Osen, W., Peiler, T., Ohlschlager, P., Caldeira, S., Faath, S., Michel, N., Muller, M., Tommasino, M., Jochmus, I., and Gissmann, L. (2001). A DNA vaccine based on a shuffled E7 oncogene of the human papillomavirus type 16 (HPV 16) induces E7-specific cytotoxic T cells but lacks transforming activity. *Vaccine* 19, 4276-4286.

Oshita, C., Takikawa, M., Kume, A., Miyata, H., Ashizawa, T., Iizuka, A., Kiyohara, Y., Yoshikawa, S., Tanosaki, R., Yamazaki, N., *et al.* (2012). Dendritic cell-based vaccination in metastatic melanoma patients: Phase II clinical trial. *Oncology Reports* 28, 1131-1138.

Ostankovitch, M., Robila, V., and Engelhard, V.H. (2005). Regulated Folding of Tyrosinase in the Endoplasmic Reticulum Demonstrates That Misfolded Full-Length Proteins Are Efficient Substrates for Class I Processing and Presentation. *The Journal of Immunology* 174, 2544-2551.

Osterborg, A., Dyer, M.J., Bunjes, D., Pangalis, G.A., Bastion, Y., Catovsky, D., and Mellstedt, H. (1997). Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leukemia. European Study Group of CAMPATH-1H Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 15, 1567-1574.

Oudard, S., Rixe, O., Beuselink, B., Linassier, C., Banu, E., Machiels, J.-P., Baudard, M., Ringeisen, F., Velu, T., Lefrere-Belda, M.-A., *et al.* (2011). A phase II study of the cancer vaccine TG4010 alone and in combination with cytokines in patients with metastatic renal clear-cell carcinoma: clinical and immunological findings. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 60, 261-271.

Pajot, A., Michel, M.L., Fazilleau, N., Pancre, V., Auriault, C., Ojcius, D.M., Lemonnier, F.A., and Lone, Y.C. (2004). A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1/HLA-DR1-transgenic H-2 class I/class II-knockout mice. *European Journal of Immunology* 34, 3060-3069.

Palucka, K., Ueno, H., and Banchereau, J. (2011). Recent developments in cancer vaccines. *Journal of Immunology* 186, 1325-1331.

Pardoll, D.M. (2002). Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 2, 227-238.

Park, J.-I., Venteicher, A.S., Hong, J.Y., Choi, J., Jun, S., Shkreli, M., Chang, W., Meng, Z., Cheung, P., Ji, H., *et al.* (2009). Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature* 460, 66-72.

Park, N.H., Guo, W., Kim, H.R., Kang, M.K., and Park, N.H. (2001). c-Myc and Sp1/3 are required for transactivation of hamster telomerase catalytic subunit gene promoter. *International Journal of Oncology* 19, 755-761.

Parkhurst, M.R., Riley, J.P., Igarashi, T., Li, Y., Robbins, P.F., and Rosenberg, S.A. (2004). Immunization of patients with the hTERT:540-548 peptide induces peptide-reactive T lymphocytes that do not recognize tumors endogenously expressing telomerase. *Clinical Cancer Research* 10, 4688-4698.

Parks, C.L., Lerch, R.A., Walpita, P., Sidhu, M.S., and Udem, S.A. (1999). Enhanced measles virus cDNA rescue and gene expression after heat shock. *Journal of Virology* 73, 3560-3566.

Pascolo, S., Bervas, N., Ure, J.M., Smith, A.G., Lemonnier, F.A., and Perarnau, B. (1997). 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. *The Journal of Experimental Medicine* 185, 2043-2051.

Pasparakis, M., Haase, I., and Nestle, F.O. (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 14, 289-301.

Patel, R.R., and Arthur, D.W. (2006). The emergence of advanced brachytherapy techniques for common malignancies. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 20, 97-118.

PATH (2009). *Intradermal Delivery of Vaccines: A review of the literature and the potential for development for use in low- and middle-income countries*. Seattle: Program for Appropriate Technology in Health (PATH).

Peachman, K.K., Rao, M., and Alving, C.R. (2003). Immunization with DNA through the skin. *Methods* 31, 232-242.

Pitot, H.C. (1993). The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer* 72, 962-970.

Prlic, M., Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2007). Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance. *Current Opinion in Immunology* 19, 315-319.

Pukac, L., Kanakaraj, P., Humphreys, R., Alderson, R., Bloom, M., Sung, C., Riccobene, T., Johnson, R., Fiscella, M., Mahoney, A., *et al.* (2005). HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. *British Journal of Cancer* 92, 1430-1441.

Pulendran, B., and Ahmed, R. (2011). Immunological mechanisms of vaccination. *Nature Immunology* 12, 509-517.

Radcliffe, J.N., Roddick, J.S., Friedmann, P.S., Stevenson, F.K., and Thirdborough, S.M. (2006). Prime-Boost with Alternating DNA Vaccines Designed to Engage Different Antigen Presentation Pathways Generates High Frequencies of Peptide-Specific CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology* 177, 6626-6633.

Radecke, F., Spielhofer, P., Schneider, H., Kaelin, K., Huber, M., Dotsch, C., Christiansen, G., and Billeter, M.A. (1995). Rescue of measles viruses from cloned DNA. *The EMBO Journal* 14, 5773-5784.

Ramanathan, S., and Jagannathan, N. (2014). Tumor associated macrophage: a review on the phenotypes, traits and functions. *Iranian Journal of Cancer Prevention* 7, 1-8.

Ravindranath, N.M., and Shuler, C. (2006). Expression of complement restriction factors (CD46, CD55 & CD59) in head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 35, 560-567.

Restifo, N.P., Dudley, M.E., and Rosenberg, S.A. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature Reviews Immunology* 12, 269-281.

Riberdy, J.M., Christensen, J.P., Branum, K., and Doherty, P.C. (2000). Diminished Primary and Secondary Influenza Virus-Specific CD8(+) T-Cell Responses in CD4-Depleted Ig(-/-) Mice. *Journal of Virology* 74, 9762-9765.

Rice, J., Ottensmeier, C.H., and Stevenson, F.K. (2008). DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nature Reviews Cancer* 8, 108-120.

Riether, C., Schurch, C., and Ochsenbein, A.F. (2013). From "magic bullets" to specific cancer immunotherapy. *Swiss Medical Weekly* 143, w13734.

Rohrlich, P.S., Cardinaud, S., Firat, H., Lamari, M., Briand, P., Escriou, N., and Lemonnier, F.A. (2003). HLA-B\*0702 transgenic, H-2KbDb double-knockout mice: phenotypical and functional characterization in response to influenza virus. *International Immunology*. 15, 765-772.

Rosenberg, S.A., Yang, J.C., and Restifo, N.P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature Medicine* 10, 909-915.

Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Phan, G.Q., Citrin, D.E., Restifo, N.P., Robbins, P.F., Wunderlich, J.R., *et al.* (2011). Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T Cell Transfer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 17, 4550-4557.

Rotzschke, O., Falk, K., Stevanovic, S., Jung, G., Walden, P., and Rammensee, H.G. (1991). Exact prediction of a natural T cell epitope. *European Journal of Immunology* 21, 2891-2894.

Saade, F., and Petrovsky, N. (2012). Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Review of Vaccines* 11, 189-209.

Sagiv-Barfi, I., Kohrt, H.E.K., Czerwinski, D.K., Ng, P.P., Chang, B.Y., and Levy, R. (2015). Therapeutic antitumor immunity by checkpoint blockade is enhanced by ibrutinib, an inhibitor of both BTK and ITK. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, E966-E972.

Sangare, L., Manhart, L., Zehrung, D., and Wang, C.C. (2009). Intradermal hepatitis B vaccination: a systematic review and meta-analysis. *Vaccine* 27, 1777-1786.

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565-1570.

Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.

Schwarz, A.F. (1962). Preliminary tests of a highly attenuated measles vaccine. *American Journal of Diseases of Children* 103, 386-389.

Scott, A.M., Wiseman, G., Welt, S., Adjei, A., Lee, F.-T., Hopkins, W., Divgi, C.R., Hanson, L.H., Mitchell, P., Gansen, D.N., *et al.* (2003). A Phase I Dose-Escalation Study of Sibrutumab in Patients with Advanced or Metastatic Fibroblast Activation Protein-positive Cancer. *Clinical Cancer Research* 9, 1639-1647.

Scott, S.D. (1998). Rituximab: a new therapeutic monoclonal antibody for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Practice* 6, 195-197.

Seimetz, D. (2011). Novel Monoclonal Antibodies for Cancer Treatment: The Trifunctional Antibody Catumaxomab (Removab®). *Journal of Cancer* 2, 309-316.

Senovilla, L., Vacchelli, E., Garcia, P., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013). Trial watch: DNA vaccines for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2, e23803.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.

Sharma, R.K., Yolcu, E.S., Srivastava, A.K., and Shirwan, H. (2013). CD4(+) T Cells Play a Critical Role in the Generation of Primary and Memory Antitumor Immune Responses Elicited by SA-4-1BBL and TAA-Based Vaccines in Mouse Tumor Models. *PLoS ONE* 8, e73145.

Shay, J.W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer* 33, 787-791.

Shedlock, D.J., and Weiner, D.B. (2000). DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *Journal of Leukocyte Biology* 68, 793-806.

Shin, M.S., Kim, H.S., Lee, S.H., Park, W.S., Kim, S.Y., Park, J.Y., Lee, J.H., Lee, S.K., Lee, S.N., Jung, S.S., *et al.* (2001). Mutations of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Receptor 1 (TRAIL-R1) and Receptor 2 (TRAIL-R2) Genes in Metastatic Breast Cancers. *Cancer Research* 61, 4942-4946.

Shirota, H., Petrenko, L., Hong, C., and Klinman, D.M. (2007). Potential of Transfected Muscle Cells to Contribute to DNA Vaccine Immunogenicity. *The Journal of Immunology* 179, 329-336.

Singh, M., Cattaneo, R., and Billeter, M.A. (1999). A Recombinant Measles Virus Expressing Hepatitis B Virus Surface Antigen Induces Humoral Immune Responses in Genetically Modified Mice. *Journal of Virology* 73, 4823-4828.

Smith, L.L., Coller, H.A., and Roberts, J.M. (2003). Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nature Cell Biology* 5, 474-479.

Smyth, M.J., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology* 2, 293-299.

Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., Cretney, E., Trapani, J.A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S.B., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2000). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *The Journal of Experimental Medicine* 191, 661-668.

Stevenson, F.K., Ottensmeier, C.H., and Rice, J. (2010). DNA vaccines against cancer come of age. *Current Opinion in Immunology* 22, 264-270.

Stewart, S.A., Hahn, W.C., O'Connor, B.F., Banner, E.N., Lundberg, A.S., Modha, P., Mizuno, H., Brooks, M.W., Fleming, M., Zimonjic, D.B., *et al.* (2002). Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 12606-12611.

Street, S.E., Trapani, J.A., MacGregor, D., and Smyth, M.J. (2002). Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *The Journal of Experimental Medicine* 196, 129-134.

Su, Z., Dannull, J., Yang, B.K., Dahm, P., Coleman, D., Yancey, D., Sichi, S., Niedzwiecki, D., Boczkowski, D., Gilboa, E., and Vieweg, J. (2005). Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *Journal of Immunology*. 174, 3798-3807.

Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy* 1, 1-4.

Swann, J., Crowe, N.Y., Hayakawa, Y., Godfrey, D.I., and Smyth, M.J. (2004). Regulation of antitumour immunity by CD1d-restricted NKT cells. *Immunology and Cell Biology* 82, 323-331.

Taieb, J., Chaput, N., Menard, C., Apetoh, L., Ullrich, E., Bonmort, M., Pequignot, M., Casares, N., Terme, M., Flament, C., *et al.* (2006). A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nature Medicine* 12, 214-219.

Takeuchi, K., Kadota, S.I., Takeda, M., Miyajima, N., and Nagata, K. (2003). Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Letters* 545, 177-182.

Takeuchi, K., Takeda, M., Miyajima, N., Ami, Y., Nagata, N., Suzuki, Y., Shahnewaz, J., Kadota, S., and Nagata, K. (2005). Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques. *Journal of Virology* 79, 7838-7844.

Tang, D.-c., DeVit, M., and Johnston, S.A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356, 152-154.

Tasaki, T., Sriram, S.M., Park, K.S., and Kwon, Y.T. (2012). The N-end rule pathway. *Annual Review of Biochemistry* 81, 261-289.

Tchirkov, A., Chaleteix, C., Magnac, C., Vasconcelos, Y., Davi, F., Michel, A., Kwiatkowski, F., Tournilhac, O., Dighiero, G., and Travade, P. (2004). hTERT expression and prognosis in B-chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Oncology* 15, 1476-1480.

Thaiss, C.A., Semmling, V., Franken, L., Wagner, H., and Kurts, C. (2011). Chemokines: a new dendritic cell signal for T cell activation. *Frontiers in Immunology* 2, 31.

Thompson, L.J., Kolumam, G.A., Thomas, S., and Murali-Krishna, K. (2006). Innate Inflammatory Signals Induced by Various Pathogens Differentially Dictate the IFN-I Dependence of CD8 T Cells for Clonal Expansion and Memory Formation. *The Journal of Immunology* 177, 1746-1754.

Thundimadathil, J. (2012). Cancer Treatment Using Peptides: Current Therapies and Future Prospects. *Journal of Amino Acids* 2012, 13.

Todorova, K., Ignatova, I., Tchakarov, S., Altankova, I., Zoubak, S., Kyurkchiev, S., and Mincheff, M. (2005). Humoral immune response in prostate cancer patients after

immunization with gene-based vaccines that encode for a protein that is proteasomally degraded. *Cancer Immunity* 5, 1.

Topalian, S.L., Weiner, G.J., and Pardoll, D.M. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Journal of Clinical Oncology* 29, 4828-4836.

Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 3, 133-146.

Tripathi, P., and Agrawal, S. (2006). Non-Classical HLA-G Antigen and Its Role in the Cancer Progression. *Cancer Investigation* 24, 178-186.

Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwariki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A., *et al.* (1993). Heterologous Protection Against Influenza by Injection of DNA Encoding a Viral Protein. *Science* 259, 1745-1749.

Vacchelli, E., Aranda, F., Eggermont, A., Galon, J., Sautes-Fridman, C., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2014). Trial Watch: Tumor-targeting monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* 3, e27048.

Vacchelli, E., Eggermont, A., Sautes-Fridman, C., Galon, J., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013a). Trial Watch: Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2, e25238.

Vacchelli, E., Galluzzi, L., Eggermont, A., Galon, J., Tartour, E., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2012a). Trial Watch: Immunostimulatory cytokines. *Oncoimmunology* 1, 493-506.

Vacchelli, E., Martins, I., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Sautes-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2012b). Trial watch: Peptide vaccines in cancer therapy. *Oncoimmunology* 1, 1557-1576.

Vacchelli, E., Vitale, I., Eggermont, A., Fridman, W.H., Fučíková, J., Cremer, I., Galon, J., Tartour, E., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013b). Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2, e25771.

Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 12142-12149.

Vaziri, H., Squire, J.A., Pandita, T.K., Bradley, G., Kuba, R.M., Zhang, H., Gulyas, S., Hill, R.P., Nolan, G.P., and Benchimol, S. (1999). Analysis of Genomic Integrity and p53-Dependent G1Checkpoint in Telomerase-Induced Extended-Life-Span Human Fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 19, 2373-2379.

Venteicher, A.S., Abreu, E.B., Meng, Z., McCann, K.E., Terns, R.M., Veenstra, T.D., Terns, M.P., and Artandi, S.E. (2009). A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science* 323, 644-648.

- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual Review of Immunology* 29, 235-271.
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., and Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology* 12, 239-252.
- Vonderheide, R.H., Domchek, S.M., Schultze, J.L., George, D.J., Hoar, K.M., Chen, D.Y., Stephans, K.F., Masutomi, K., Loda, M., Xia, Z., *et al.* (2004). Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Clinical Cancer Research* 10, 828-839.
- Vonderheide, R.H., Schultze, J.L., Anderson, K.S., Maecker, B., Butler, M.O., Xia, Z., Kuroda, M.J., von Bergwelt-Baildon, M.S., Bedor, M.M., Hoar, K.M., *et al.* (2001). Equivalent induction of telomerase-specific cytotoxic T lymphocytes from tumor-bearing patients and healthy individuals. *Cancer Research* 61, 8366-8370.
- Vukmanovic-Stejcic, M., Vyas, B., Gorak-Stolinska, P., Noble, A., and Kemeny, D.M. (2000). Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 95, 231-240.
- Waldhauer, I., and Steinle, A. (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 27, 5932-5943.
- Waldmann, T.A. (2006). The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nature Reviews Immunology* 6, 595-601.
- Walsh, S.R., and Dolin, R. (2011). Vaccinia viruses: vaccines against smallpox and vectors against infectious diseases and tumors. *Expert review of vaccines* 10, 1221-1240.
- Wang, B., Ugen, K.E., Srikantan, V., Agadjanyan, M.G., Dang, K., Refaeli, Y., Sato, A.I., Boyer, J., Williams, W.V., and Weiner, D.B. (1993). Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 4156-4160.
- Wang, Q., Lei, C., Wan, H., and Liu, Q. (2012). Improved cellular immune response elicited by a ubiquitin-fused DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis*. *DNA and Cell Biology* 31, 489-495.
- Wang, Z., Hangartner, L., Cornu, T.I., Martin, L.R., Zuniga, A., Billeter, M.A., and Naim, H.Y. (2001). Recombinant measles viruses expressing heterologous antigens of mumps and simian immunodeficiency viruses. *Vaccine* 19, 2329-2336.
- Weber, J., Boswell, W., Smith, J., Hersh, E., Snively, J., Diaz, M., Miles, S., Liu, X., Obrocea, M., Qiu, Z., and Bot, A. (2008). Phase 1 Trial of Intranodal Injection of a Melan-A/MART-1 DNA Plasmid Vaccine in Patients With Stage IV Melanoma. *Journal of Immunotherapy* 31, 215-223.

Weide, B., Pascolo, S., Scheel, B., Derhovanessian, E., Pflugfelder, A., Eigentler, T.K., Pawelec, G., Hoerr, I., Rammensee, H.-G., and Garbe, C. (2009). Direct Injection of Protamine-protected mRNA: Results of a Phase 1/2 Vaccination Trial in Metastatic Melanoma Patients. *Journal of Immunotherapy* 32, 498-507.

Weiner, L.M., Beldegrun, A.S., Crawford, J., Tolcher, A.W., Lockbaum, P., Arends, R.H., Navale, L., Amado, R.G., Schwab, G., and Figlin, R.A. (2008). Dose and Schedule Study of Panitumumab Monotherapy in Patients with Advanced Solid Malignancies. *Clinical Cancer Research* 14, 502-508.

Weinrich, S.L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V.M., Holt, S.E., Bodnar, A.G., Lichtsteiner, S., Kim, N.W., Trager, J.B., *et al.* (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nature Genetics* 17, 498-502.

Wesolowski, R., Markowitz, J., and Carson, W.E. (2013). Myeloid derived suppressor cells – a new therapeutic target in the treatment of cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 1, 10-10.

Woodland, D.L. (2004). Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends in Immunology* 25, 98-104.

Wrzesinski, S.H., Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). Transforming Growth Factor- $\beta$  and the Immune Response: Implications for Anticancer Therapy. *Clinical Cancer Research* 13, 5262-5270.

Wu, Y.L., Ding, Y.P., Tanaka, Y., Shen, L.W., Wei, C.H., Minato, N., and Zhang, W. (2014).  $\gamma\delta$  T cells and their potential for immunotherapy. *International Journal of Biological Sciences* 10, 119-135.

Yan, J., Pankhong, P., Shin, T.H., Obeng-Adjei, N., Morrow, M.P., Walters, J.N., Khan, A.S., Sardesai, N.Y., and Weiner, D.B. (2013). Highly optimized DNA vaccine targeting human telomerase reverse transcriptase stimulates potent antitumor immunity. *Cancer Immunology Research* 1, 179-189.

Yanagi, Y., Takeda, M., and Ohno, S. (2006). Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *Journal of General Virology* 87, 2767-2779.

Yang, Y., Chen, Y., Zhang, C., Huang, H., and Weissman, S.M. (2002). Nucleolar localization of hTERT protein is associated with telomerase function. *Experimental Cell Research* 277, 201-209.

Yannoutsos, N., Ijzermans, J.N., Harkes, C., Bonthuis, F., Zhou, C.Y., White, D., Marquet, R.L., and Grosveld, F. (1996). A membrane cofactor protein transgenic mouse model for the study of discordant xenograft rejection. *Genes Cells* 1, 409-419.

Yazawa, M., Okuda, M., Uyama, R., Nakagawa, T., Kanaya, N., Nishimura, R., Sasaki, N., Masuda, K., Ohno, K., and Tsujimoto, H. (2003). Molecular cloning of the feline telomerase reverse transcriptase (TERT) gene and its expression in cell lines and normal tissues. *The Journal of Veterinary Medical Science* 65, 573-577.

Zanetti, M., Hernandez, X., and Langlade-Demoyen, P. (2005). Telomerase reverse transcriptase as target for anti-tumor T cell responses in humans. *Springer Seminars in Immunopathology* 27, 87-104.

Zhang, L., Li, L., Hoffmann, G.A., and Hoffman, R.M. (1996). Depth-Targeted Efficient Gene Delivery and Expression in the Skin by Pulsed Electric Fields: An Approach to Gene Therapy of Skin Aging and Other Diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 220, 633-636.

Zhu, C.Q., Cutz, J.C., Liu, N., Lau, D., Shepherd, F.A., Squire, J.A., and Tsao, M.S. (2006). Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer*. 94, 1452-1459.

Zhu, J., Martinez, J., Huang, X., and Yang, Y. (2007). Innate immunity against vaccinia virus is mediated by TLR2 and requires TLR-independent production of IFN- $\beta$ . *Blood* 109, 619-625.

Zhu, M., Marshall, J., Cole, D., Schlom, J., and Tsang, K.Y. (2000). Specific Cytolytic T-Cell Responses to Human CEA from Patients Immunized with Recombinant Avipox-CEA Vaccine. *Clinical Cancer Research* 6, 24-33.

Zhu, Y., Tomlinson, R.L., Lukowiak, A.A., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2004). Telomerase RNA Accumulates in Cajal Bodies in Human Cancer Cells. *Molecular Biology of the Cell* 15, 81-90.

Zitvogel, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2010). Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* 140, 798-804.

Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006a). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 6, 715-727.

Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006b). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews Immunology* 6, 715-727.



# Table des illustrations

Figure 1 : GLOBOCAN 2012 Nombre de nouveaux cas et de décès par genre pour les principaux cancers .....	20
Figure 2 : Etapes de la cancérogenèse.....	22
Figure 3 : Les caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales .....	24
Figure 4 : Les cellules du microenvironnement tumoral.....	26
Figure 5 : Mécanismes des thérapies ciblées .....	30
Figure 6 : Concept de l'immuno-édition.....	36
Figure 7 : Voies de présentation antigénique pour les CMH classe I et II.....	41
Figure 8 : Synapse immunologique et molécules de co-stimulation.....	42
Figure 9 : Différenciation et polarisation des LTs CD4.....	44
Figure 10 : Activation des LTs CD8 via un complexe DC-Th1 ou DC-NK.....	45
Figure 11 : Immuno-surveillance du cancer.....	47
Figure 12 : Immuno-subversion du cancer.....	52
Figure 13 : Théorie de Hayflick ou horloge télomérique.....	54
Figure 14 : Représentation linéaire de hTERT et du complexe télomérase.....	56
Figure 15 : Rôle de la TERT dans la cancérogenèse.....	57
Figure 16 : Régulation transcriptionnelle de hTERT .....	59
Figure 17 : Schéma général des approches d'immunothérapies .....	63
Figure 18 : Exemples de molécules de co-stimulation and co-inhibition sur les LTs .....	66
Figure 19 : Approches de vaccination anti-tumorale .....	70
Figure 20 : Voies de présentation des antigènes .....	77
Figure 21 : Mécanisme général de la vaccination basée sur les ADN et sur les vecteurs viraux .....	79
Figure 22 : Anatomie de la peau et effecteurs cellulaires .....	83
Figure 23 : Voies d'immunisation dans la peau et diffusion dans les différentes zones.....	84
Figure 24 : Principe de l'EGT dans le cadre d'une vaccination ADN .....	86
Figure 25 : Générateur Cliniporator <sup>®</sup> et électrodes disponibles pour les applications anti-cancer .....	87
Figure 26 : Le virus de la rougeole .....	92
Figure 27 : Stratégies d'immunothérapies développées et évaluées par INVECTYS .....	99

Figure 28 : Sélection du plasmide INVAC-1 .....	103
Figure 29 : Alignement schématique entre la hTERT naturelle et les protéines codées par INVAC-1, pUTScram et pUTInv .....	105
Figure 30 : Système de génétique inverse .....	107
Figure 31 : Schéma du plasmide pTM-MV Schw et de l'ATU2 .....	109
Figure 32 : Schéma de production du virus recombinant MV-TERT à partir du pTM-MV-TERT .....	111
Figure 33 : Expression in vitro de protéines hTERT, INVAC-1, Scrambled et Inverted .....	163
Figure 34 : Localisation intracellulaire des protéines hTERT, INVAC-1, Scrambled et Inverted .....	164
Figure 35 : Neutralisation de l'activité télomérase de Scrambled et Inverted .....	165
Figure 36 : Induction de réponses CD8 spécifiques hTERT synthétisant de l'IFN- $\gamma$ .....	166
Figure 37 : Cytotoxicité des réponses CD8 spécifiques de hTERT induites par Scrambled et Inverted .....	167
Figure 38 : Expression du transgène Ubi- $\Delta$ hTERT-Flu-V5 .....	169
Figure 39 : Induction de CD8 et CD4 spécifiques de hTERT en réponse à une immunisation MV-TERT .....	171
Figure 40 : La vaccination MV-TERT induit des CD8 spécifiques de hTERT cytotoxiques .....	172
Figure 41 : Evaluation de la réponse humorale induite par MV-TERT .....	174
Figure 42 : Stratégie de vaccination hétérologue INVAC-1+MV-TERT .....	176

# Table des tableaux

Tableau 1 : Exemple de petites molécules inhibitrices en thérapie ciblée dans le cancer .....	31
Tableau 2 : Classification moderne des antigènes tumoraux .....	35
Tableau 3 : Exemple d'expression de l'activité télomérase et de la hTERT ARNm dans différents cancers chez l'Homme .....	58
Tableau 4 : Liste des essais cliniques clôturés ciblant hTERT .....	61
Tableau 5 : Liste des essais cliniques en cours ciblant hTERT .....	62
Tableau 6 : mAbs ciblant les tumeurs approuvés par la FDA.....	66
Tableau 7 : Caractéristiques des vaccins basés sur des cellules tumorales autologues.....	71
Tableau 8 : Caractéristiques des vaccins basés sur des cellules tumorales génétiquement modifiées .....	71
Tableau 9 : Caractéristiques des vaccins basés sur les DCs.....	72
Tableau 10 : Caractéristiques des vaccins basés sur les peptides ou protéines recombinantes	73
Tableau 11 : Avantages des vaccins ADN .....	80
Tableau 12 : Inconvénients des vaccins ADN .....	81
Tableau 13 : Principaux vecteurs viraux utilisés et leurs caractéristiques .....	90
Tableau 14 : Listes des peptides identifiés et utilisés pour évaluer l'immunogénicité des vaccins hTERT.....	115

## RESUME

Le cancer est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. L'étude de ses mécanismes a mis en évidence des interactions particulières entre la tumeur et l'immunité adaptative. Les cellules cancéreuses suite à leur transformation maligne expriment des antigènes tumoraux reconnus par les LTs. Ce fondement constitue la base des immunothérapies ciblant les antigènes associés aux tumeurs (TAAs). Parmi les TAAs identifiés, la hTERT apparaît comme un antigène universel, par son implication dans le processus d'oncogenèse et sa surexpression dans 80 à 90% des cancers. Les réponses anti-hTERT trouvées chez des individus sains et des patients cancéreux, témoin d'un répertoire T spécifique préexistant et d'une cassure naturelle de la tolérance, ont orienté nos stratégies vaccinales sur ce TAA. Durant ce doctorat, des stratégies d'immunothérapies basées sur différents produits codant une forme inactive de la hTERT ont été développées.

Le premier axe a constitué au développement de vaccins ADN thérapeutiques optimisés à la fois dans leur construction (délétions, réarrangements) et dans leur mode de délivrance. Une procédure d'électroporation a été mise au point afin de les délivrer efficacement dans le derme. Deuxièmement, dans l'optique d'augmenter l'immunogénicité de l'ADN par la réalisation de vaccinations hétérologues ou de créer un produit dérivé, un vecteur rougeole recombinant la hTERT a aussi été développé.

Au cours de ce projet, l'immunogénicité et la cytotoxicité des réponses induites par la vaccination pour l'ensemble des constructions ont été démontrées *in vivo* dans des souris conventionnelles ou transgéniques HLA. De plus, un effet anti-tumoral a aussi été démontré pour le premier produit clinique d'Invectys.

Mots clés: hTERT, vaccins ADN, électroporation, virus de la rougeole, cancer, immunothérapie

## ABSTRACT

Cancer is one of the main causes of morbidity and mortality worldwide. Studies of the cancer process have highlighted specific interactions between tumor and adaptive immune system. Following their malignant transformation, cancer cells express tumor antigens which are recognized by T-cells. This foundation is the basis of immunotherapy strategies targeting tumor associated-antigens (TAA). Among all identified TAAs, hTERT appears as a universal antigen which is also involved in oncogenesis and is overexpressed in 80 to 90% of cancer regardless of their histological origin.

The hTERT specific immune response found in healthy volunteers and in cancer patients suggests a preexisting hTERT specific T repertoire and a natural break down of tolerance. In view of this, we focused our vaccine strategy on this TAA. During this PhD, immunotherapy strategies were developed based on different constructions which encoded modified inactive forms of hTERT.

Firstly, we developed therapeutic DNA vaccines optimized both in nucleotide and amino acid sequence and for their delivery route. Nucleic or protein sequences were deleted or shuffled while retaining the predicted immunogenic parts of hTERT. A specific and safe electrogene transfer procedure has been established in order to deliver efficiently DNA vaccine in the dermis. Secondly with the aim of boosting vaccination to increase DNA immunogenicity, or to develop a derivative, a live-attenuated measles vaccine strains recombinant for hTERT was designed.

For all constructs, we demonstrated the induction of specific hTERT immune responses which present cytolytic strength *in vivo* in wild-type or HLA transgenic mice. We also demonstrated the anti-tumor effect of Invectys' first clinical product.

Key words: hTERT, DNA vaccines, electroporation, measles virus, cancer, immunotherapy.