

UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DE MÉDECINE ET TECHNIQUES MÉDICALES

---

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2013

04

Etude et modulation des réponses T dirigées  
contre le Mésothéliome Pleural Malin

---

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, Médecine et Santé

Spécialité : Immunologie

*Présentée*

*et soutenue publiquement par*

**David ROULOIS**

*Le 22 mars 2013, devant le jury ci –dessous*

Président du Jury : Nathalie LABARRIÈRE, Directeur de Recherche, Nantes

Rapporteurs : Bruce ACRES, Chef de Recherche Translationnelle en Oncologie,  
Transgene S.A. Strasbourg

Joëlle ROCHE, Professeur d'Université 1<sup>ère</sup> classe, Poitiers

Directeur de thèse : Jean-François FONTENEAU, Chargé de Recherche, Nantes

***Ce travail est dédié à mon père.  
C'est à lui que je dois l'essentiel de ma motivation.  
Sans lui, tout cela n'aurait sûrement jamais eu lieu.***

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Mesdames et Messieurs les membres du jury pour avoir accepté de venir évaluer mon travail.

Je souhaite ensuite remercier chaleureusement le Dr. Marc Grégoire, le papa de l'équipe 4, pour m'avoir accepté d'abord en stage de master 2, puis en thèse au sein de son équipe. Je souhaite également le remercier pour l'ambiance conviviale qu'il permet d'avoir dans son équipe ainsi que pour les chouquettes du jeudi.

Je remercie grandement mon directeur de thèse Jeff pour ces quatre années passées avec toi et pour la confiance que tu m'as accordée. Merci de m'avoir appris l'art de cultiver des lymphocytes T, et de m'avoir permis petit à petit de devenir autonome dans mon travail. Je tiens également à te remercier pour toute la rigueur qu'il m'a apprise, que ce soit au niveau de la réalisation des expériences, ou de la préparation à la rédaction d'un article et la présentation de résultats....

PS : La totalité des remerciements est à lire sur la thèse papier

## SOMMAIRE

SOMMAIRE .....	3
LISTE DES FIGURES.....	7
LISTE DES TABLEAUX .....	8
LISTE DES ABREVIATIONS .....	9
CONTEXTE : Le Mésothéliome Pleural Malin .....	11
I) Définition et localisation .....	11
II) Epidémiologie.....	12
III) Etiologie.....	13
A. L’amiante.....	13
B. Simien virus 40 .....	14
C. Autres causes.....	14
IV) Mécanismes moléculaires .....	15
A. Les gènes supresseurs de tumeur .....	16
B. Oncogènes .....	16
C. Processus inflammatoires .....	18
D. Facteurs de croissance .....	18
E. Résistance à l’apoptose.....	18
V) Diagnostic .....	19
A. Techniques d’imagerie .....	19
B. Techniques cytologiques .....	20
C. Techniques immuno-histochimiques .....	20
D. Marqueurs solubles.....	21
VI) Modalités thérapeutiques.....	22
A. Thérapies conventionnelles .....	22
1. Chirurgie .....	22
2. Chimiothérapie.....	22
3. Radiothérapie.....	23

B.	Thérapies non conventionnelles .....	23
1.	Les thérapies ciblées.....	24
2.	Virothérapie.....	24
3.	Agents épigénétiques .....	25
4.	Immunothérapie.....	25
INTRODUCTION 1 : L'immunothérapie anticancéreuse .....		27
I)	À l'origine de l'immunothérapie .....	27
II)	Les acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale.....	29
A.	L'immunité innée.....	30
1.	Les cellules dendritiques .....	30
2.	Les autres cellules du système immunitaire inné .....	32
B.	L'immunité adaptative .....	33
1.	Les lymphocytes B .....	33
2.	Les lymphocytes T .....	35
III)	La présentation antigénique .....	37
A.	Les molécules HLA ou CMH.....	38
B.	Mécanisme d'apprêtement des antigènes sur les molécules HLA de classe I et II .....	39
IV)	La synapse T : Activation du lymphocyte T .....	41
V)	Les molécules de co-stimulation .....	44
VI)	L'effecteur T activé.....	45
VII)	Les antigènes de tumeur .....	48
A.	Les méthodes d'identification d'antigènes de tumeur et de leurs épitopes .....	48
B.	Classification des antigènes de tumeur.....	51
1.	Antigènes de tumeur uniques .....	51
2.	Les antigènes spécifiques de tumeur .....	51
3.	Les antigènes de surexpression.....	52
4.	Les antigènes de différenciation .....	52

VIII) Mécanisme d'échappement au système immunitaire.....	52
A. Défaut de reconnaissance .....	52
B. Résistance à la mort induite par le lymphocyte T .....	53
C. Inactivation des lymphocytes T par anergie.....	53
D. Autres mécanismes .....	54
E. Mécanisme d'échappement tumoral dans le MPM.....	54
INTRODUCTION 2 : Epigénétique et cancer .....	55
I) A l'origine de l'épigénétique .....	55
A. La méthylation de l'ADN.....	57
B. Les modifications d'histones .....	59
1. Acétylation des histones .....	61
2. Méthylation des histones .....	62
II) Epigénétique et cancers .....	63
A. Les méthylation de l'ADN dans le cancer .....	64
B. Les modifications d'histones dans le cancer .....	64
III) Les drogues épigénétiques.....	66
A. Les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN .....	67
B. Les inhibiteurs des histones déacétylases.....	68
C. Drogues épigénétiques et réponses immunitaires anti-tumorales.....	69
INTRODUCTION 3 : Les antigènes du MPM : l'antigène MUC1.....	71
I) Les antigènes du MPM .....	71
A. La protéine MUC1.....	72
B. MUC1 et réponse lymphocytaire T.....	73
C. MUC1, modèle murin et vaccination .....	74
D. Les autres stratégies pour induire des réponses T MUC1 spécifiques.....	75
E. Essais cliniques chez l'Homme .....	77
F. MUC1, une protéine oncogénique .....	80
1. Les fonctions de la protéine MUC1 .....	80
2. MUC1 : cible pharmacologique .....	81

OBJECTIFS .....	83
RESULTATS.....	85
I) Mise en évidence <i>ex vivo</i> de réponse T dirigée contre le MPM chez l’homme .....	85
II) Immunologie inverse .....	87
III) Etude de la modulation de MUC1 par des drogues épigénétiques .....	104
DISCUSSION .....	114
BIBLIOGRAPHIE.....	123
ANNEXES.....	142
Annexe 1: The combination of CCL2, LGALS3 and soluble mesothelin related peptide biomarkers improves the diagnosis of Mesothelioma in pleural effusions .....	142
Annexe 2: MUC1-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer therapy: induction and challenge ...	150
Annexe 3: Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells.....	161

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation de la plèvre et du Mésothéliome Pleural Malin .....	11
Figure 2 : Caractéristiques moléculaires des cellules de mésothéliome.....	15
Figure 3: Voie canonique WNT/ $\beta$ -caténine.....	17
Figure 4: Formule chimique du Pemetrexed et du Cisplatine.....	23
Figure 5 : Théorie des trois E (Elimination/Equilibre/Echappement).....	29
Figure 6: Sous-populations de cellules dendritiques chez l'homme .....	31
Figure 7: Interaction du lymphocyte B avec la tumeur .....	35
Figure 8: Représentation des molécules CMH de classe I et II.....	38
Figure 9 : Voie de présentation des antigènes dans les molécules CMH de classe I et II .....	41
Figure 10: Les trois phases de la synapse T.....	44
Figure 11: Mécanismes d'induction de mort cellulaire par le lymphocyte T .....	46
Figure 12 : Voie de différenciation des lymphocytes T CD4+.....	47
Figure 13: Validation d'épitopes tumoraux par immunologie inverse .....	50
Figure 14: Contrôle de la transcription par méthylation de l'ADN ou modifications des histones .....	56
Figure 15: Mécanisme de déméthylation actif de l'AND.....	59
Figure 16: Structure du nucléosome .....	60
Figure 17: Enzymes modifiant les histones dérégulées dans les cancers. ....	66
Figure 18: Structures de la cytidine et de ses analogues non méthylables. ....	67
Figure 19: La protéine MUC1 .....	73
Figure 20 : Fonction oncogénique de MUC1.....	81
Figure 21: Test couple TIL-tumeur .....	86
Figure 22: Dose réponse des clones MSLN 20-28 (A) et MUC1 12-20 (B) aux cellules T2 chargées par différentes concentrations en peptide.....	89



## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1: Classification des fibres d'amiantes.....	12
Tableau 2 : Marqueurs couramment utilisés en immuno-histochimie.....	20
Tableau 3: Modifications post-traductionnelles des histones et leurs fonctions associées.....	61
Tableau 4: Liste des stratégies thérapeutiques en développement.....	77
Tableau 5: Liste des essais cliniques en développement.....	79

## LISTE DES ABBREVIATIONS

<b>5-aza</b> : 5-azacytidine	<b>IRM</b> : imagerie par résonance magnétique
<b>5-azaCdR</b> : 5-aza-2' déoxycytidine	<b>ITAM</b> : immunoreceptor tyrosine-based activation motif
<b>5hmC</b> : 5-hydroxyméthylcytosine	<b>LOI</b> : perte d'empreinte
<b>5hmU</b> : 5-hydroxyméthyluracile	<b>LOH</b> : perte d'hétérozygotie
<b>5mC</b> : 5-méthylcytosine	<b>LqP</b> : Liquide Pleural
<b>ADCC</b> : Antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity	<b>M-CSF</b> : macrophage colony stimulating factor
<b>ADNc</b> : ADN complémentaire	<b>MAPK</b> : mitogen-activated protein kinase
<b>AICD</b> : Programme T-cell activation-induced cell death	<b>MBP</b> : Methyl CpG Binding Protein
<b>AID</b> : Activation-induced deaminase	<b>MDSC</b> : myeloïd derived suppressor cells
<b>APC</b> : cellules présentatrices d'antigènes	<b>MICA</b> : MHC class I-related protéins A
<b>β2m</b> : β2-microglobuline	<b>MICB</b> : MHC class I-related protéins B
<b>BCR</b> : B cell receptor	<b>MPF</b> : megakaryocyte potentiating factor
<b>BER</b> : base excision repair	<b>MPM</b> : Mésothéliome Pleural Malin
<b>BGN</b> : benzyl-2-acetamido-2-deoxy-α-D galactopyranoside	<b>MSLN</b> : mésothéline
<b>Bregs</b> : lymphocytes B régulateurs	<b>MUC1</b> : mucin-1
<b>CMH</b> : complexe majeur d'histocompatibilité	<b>MUC1-C</b> : MUC1 partie C-terminale
<b>CpG</b> : cytosine-phosphate-guanine	<b>MV</b> : Measle Virus
<b>CRT</b> : calretinin	<b>NK</b> : Natural Killer
<b>CT</b> : cancers testis	<b>NKG2D</b> : Natural Killer group 2, member D
<b>CTA</b> : cancer testis antigen	<b>NY-ESO-1</b> : New York esophageal squamous cell carcinoma 1
<b>CTL</b> : lymphocyte T cytotoxique	<b>OPN</b> : osteopontine
<b>DAMP</b> : Damage Associated Molecular Pattern	<b>P/D</b> : pleurectomie avec ou sans décortication
<b>DC</b> : Cellule Dendritique	<b>PAMP</b> : pathogen associated molecular pattern
<b>DNMT</b> : DNA méthyle transférase	<b>PCy</b> : Phospholipase Cy
<b>Dsh</b> : dishevelled	<b>PD1</b> : Programmed cell death protein 1
<b>dTMP</b> : deoxythymidine-5'-monophosphate	<b>PDGF</b> : platelet derived growth factor
<b>EGF</b> : epidermal growth factor	<b>PD-L1</b> : Programmed cell death 1 ligand 1
<b>EPP</b> : pleuro-pneumonectomie extrapleurale	<b>PKCθ</b> : Protéine kinase Cθ
<b>ESCRT</b> : endosomal sorting complexe required for transport protein	<b>pSH</b> : pool de sérums humains
<b>G-CSF</b> : granulocyte colony stimulating factor	<b>RAG</b> : recombinase activating gene
<b>GM-CSF</b> : granulocyte-macrophage colony stimulating factor	<b>SAHA</b> : suberoylanilide hydroxamic acid
<b>HAT</b> : acétyl transférase d'histones	<b>SAM</b> : S'-adénosylméthionine
<b>HDAC</b> : désacétylase d'histones	<b>SEREX</b> : SErological identification of antigens by Recombinant EXpression cloning
<b>HDM</b> : déméthylase d'histones	<b>SMAC</b> : cluster d'activation supramoléculaire
<b>HGF/SF</b> : growth factor/scatter factor	<b>SMRP</b> : soluble related mesothelin peptide
<b>HLA</b> : antigène leucocytaire humain	<b>SV40</b> : Virus simien 40
<b>HMT</b> : méthyltransférase d'histones	<b>TAM</b> : Tumor Associated Macrophage
<b>IFN-γ</b> : Interferon-γ	<b>TAP</b> : transporteur associé à l'apprêtement des antigènes
<b>IGF1</b> : insuline-like growth factor-1	<b>TCF/LCF</b> : T-cell factor/lymphoid-enhancer factor
<b>IHDAC</b> : inhibiteur d'histone désacétylase	<b>TCR</b> : récepteur des cellules T
<b>IL</b> : Interleukine	<b>TDG</b> : DNA glycosylase
	<b>TEP</b> : tomographie à émission de positons
	<b>TET</b> : Ten Eleven Translocation
	<b>Tfh</b> : T follicular helper

**TGF-β:** transforming growth factor beta

**TIM-3:** T cell immunoglobulin mucin-3

**Treg :** lymphocytes T régulateurs

**TSG :** gène supprimeur de tumeur

**VEGF:** vascular endothelial growth factor

**VNTR:** Variable Number Tandem Repeat

**VPA:** valproate

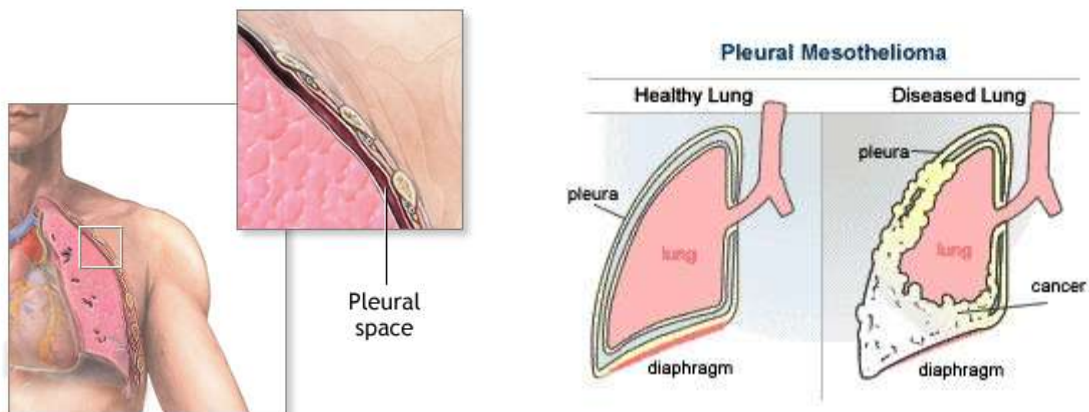
**WT1:** wilm's tumor one

**ZAP70:** ζ-chain-associated protein kinase of 70 kDa

## CONTEXTE : Le Mésothéliome Pleural Malin

### 1) Définition et localisation

Le mésothéliome malin, est une tumeur agressive des séreuses. Elle survient suite à la transformation maligne des cellules mésothéliales qui tapissent les cavités sériques telles que : la plèvre, le péritoine et le péricarde. Le mésothéliome le plus souvent rencontré est celui touchant la plèvre, appelé mésothéliome pleural malin (MPM), et représente plus de 80% des cas de MPM.



**Figure 1: Représentation de la plèvre et du Mésothéliome Pleural Malin**

A) La plèvre est un double feuillet de cellules, séparant les poumons du thorax. L'espace intra-pleural est délimité par le feuillet pariétal et viscéral. En conditions physiologiques, il est quasi inexistant. B) En condition tumorale, l'espace pleural va se retrouver envahi par les cellules tumorales. Le liquide pleural quasi inexistant en condition physiologique va se retrouver en quantité importante.

*Source: Updated by: Shabir Bhimji, MD, PhD, Specializing in General Surgery, Cardiothoracic and Vascular Surgery, Midland, TX. Review provided by VeriMed Healthcare Network. Also reviewed by David Zieve, MD, MHA, Medical Director, A.D.A.M. Health Solutions, Ebix, Inc.*

La plèvre est un double feuillet de cellules mésothéliales qui recouvre les poumons et les isole de la paroi interne du thorax. Le feuillet viscéral adhère au poumon et le feuillet pariétal, lui, adhère à la paroi thoracique. Ces deux feuillets vont alors délimiter un espace : la cavité pleurale. La plèvre va sécréter un fluide aux propriétés lubrifiantes permettant le glissement des deux feuillets l'un sur l'autre lors des mouvements respiratoires : le Liquide Pleural (LqP) (Figure 1).

Lors de l'apparition d'un MPM, la cavité pleurale se retrouve envahie à la fois par des cellules tumorales mais aussi par l'accumulation de LqP. Ce dernier est d'ailleurs la cause de troubles de la respiration ou dyspnée qui est le symptôme majeur conduisant à la découverte de ce cancer. En effet, alors que ce LqP n'est présent qu'en petite quantité (15 ml environ) chez les personnes saines, il est retrouvé en quantité importante (1 à 2 litres) chez les patients atteints d'un MPM.

## II) Epidémiologie

Le principal facteur étiologique du MPM est l'amiante. Sa mise en cause dans ce cancer a d'ailleurs été mise en évidence dès 1960 [1]. Ce n'est qu'en 1997 que l'utilisation de cette fibre est interdite en France et en 2005 au niveau Européen. L'amiante désigne un groupe de minéraux, les silicates ayant une texture fibreuse. Deux familles sont principalement mises en cause (Tableau 1):

- Le chrysolite (groupe de serpentines) ou amiante blanc
- Les amphiboles (anthrophyllite, aminosite, crocidolite, actinolite trémolite)

**Tableau 1: Classification des fibres d'amiantes**

TYPE	Sous-type	Formule chimique connue
Serpentine	Chrysolite	$Mg_3(Si_2O_5)(OH)_4$
	Amphibole	
	Crocidolite	$Na_2(Fe^{3+})_2(Fe^{2+})_3Si_8O_{22}(OH)_2$
	Tremolite	$Ca_2Mg_5Si_8O_{22}(OH)_2$
	Anthrophyllite	
	Amosite	
Actinolite		$Ca_2(Mg,Fe)_5Si_8O_{22}(OH)_2$
Fluoro-edenite		
Erionite		
Zeolite		

Après exposition à l'amiante, le risque de développer un MPM est inférieur à 10% [2] suggérant la présence d'autres facteurs de risques pouvant prédisposer à l'apparition de ce cancer. Mais ces facteurs restent à ce jour controversés (prédispositions génétiques, rayonnements ionisants ou le virus simien 40 (SV40)).

L'utilisation de cette fibre a principalement eu lieu dans le monde de l'industrie, du bâtiment, dans la construction navale, notamment pour ses propriétés isolantes, ce qui explique une plus forte incidence chez les hommes que chez les femmes. Actuellement, cette incidence est de 20 cas pour 1 million en Europe avec de grandes variations entre les pays. Elle est en constante augmentation, avec un pic annoncé pour les années 2015-2020, principalement en raison du délai de latence entre l'exposition et l'apparition de la maladie qui est en moyenne de 40 ans (écart 15-67 ans). Pour des

pays qui ont continué à l'utiliser au 21ème siècle, il est attendu que cette incidence augmente dans les 40 prochaines années.

### III) Etiologie

La relation entre les fibres minérales d'amiante et le MPM est clairement établie, cependant cette relation n'explique pas l'ensemble des cas de MPM. D'autres facteurs de risques plus ou moins controversés semblent impliqués.

#### A. L'amiante

Comme cela a déjà été mentionné précédemment, la relation entre l'exposition à amiante et le MPM est connue depuis plus de 50 ans maintenant [1]. Cette exposition peut être environnementale ou professionnelle. Dans le secteur industriel, ces fibres d'amiantes, de par leurs propriétés intéressantes (incombustibilité, imputrescibilité, résistance thermique et chimique importante, résistance mécanique et à l'usure, isolation acoustique, compatibilité avec le ciment...), ont été largement utilisées. De nombreux corps de métiers ont donc été touchés. Dans le milieu naturel, des études ont démontré une corrélation entre l'exposition à ces fibres d'amiante (ériorite) et à l'apparition d'une fréquence importante de MPM en Turquie [3].

La relation entre les fibres d'amiante et le développement de la maladie semble liée à des mécanismes directs et indirects. En effet, ces fibres peuvent transloquer du poumon à la plèvre [4]. Elles vont conduire d'une façon indirecte au relargage de facteurs inflammatoires et de facteurs de croissance dans la cavité pleurale [5]. Plusieurs mécanismes vont ensuite être impliqués dans le processus de tumorigénèse [6]:

- Ces fibres vont pouvoir se retrouver à l'intérieur des cellules mésothéliales grâce à des mécanismes de phagocytose. Cela va conduire à la dégranulation des lysosomes et l'augmentation de l'oxydation intracellulaire [7]. Ces molécules réactives vont alors être responsables de cassures de l'ADN [8] et vont donc exercer un stress génotoxique et cytotoxique, responsable d'erreurs dans le processus de mitose avec une ségrégation anormale des chromosomes [9].
- Dans des cellules en culture, l'amiante va également être responsable de l'arrêt du cycle cellulaire via l'activation de P53, un facteur de transcription essentiel dans le contrôle du cycle cellulaire, suite à des cassures de l'ADN [10]. Des proto-oncogènes vont également être retrouvés surexprimés suite à une exposition aux fibres d'amiante tels que : C-fos, C-jun ou

encore la voie des mitogen-activated protein kinases (MAPK) [11], en passant par l'activation d'une cascade de phosphorylations, comprenant par exemple la PKC ou ERK et conduisant à la production de facteurs inflammatoires.

L'ensemble de ces mécanismes va déclencher la régénération et l'activation de la prolifération des cellules mésothéliales favorisant ainsi le processus de transformation tumorale.

#### B. Simien virus 40

La mise en cause du SV40 dans l'étiologie du MPM est principalement basée sur la détection de traces d'ADN viral du SV40 chez des patients atteints de MPM [12]. Cependant, cette mise en cause est sujette à controverse [13]. Il a été proposé que ce virus puisse également agir comme cofacteur de l'amiante, augmentant la transformation tumorale et conduisant au développement d'un MPM [14-16].

#### C. Autres causes

D'autres facteurs sont également décrits comme pouvant être impliqués dans l'apparition d'un MPM :

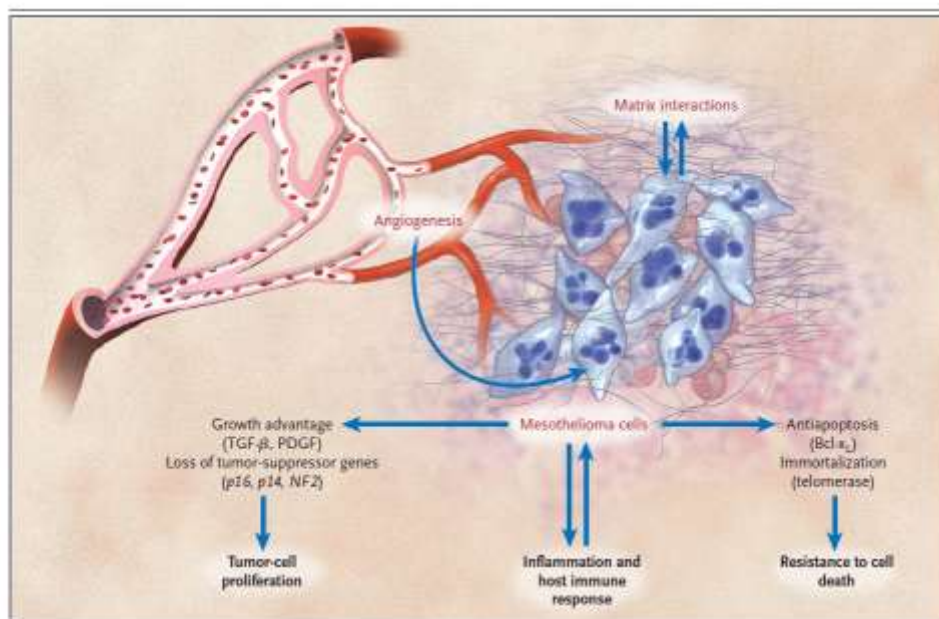
- Les rayonnements ionisants utilisés en thérapie pourraient être la cause d'un certain nombre de cas de MPM, diagnostiqués après exposition du patient à des rayonnements ionisants, en l'absence d'exposition à l'amiante [17]. Ces cas de MPM restent encore assez rares et peu d'études décrivent correctement l'effet des rayonnements ionisants sur les cellules mésothéliales. Seul l'effet des rayonnements gamma a été étudié sur ces cellules. Ils provoquent une induction de P53 et P21, deux protéines importantes dans le contrôle du cycle cellulaire [18].
- Les prédispositions génétiques sont encore relativement peu étudiées. Elles pourraient expliquer la présence d'un terrain favorable ou non au développement d'un MPM et expliquer pourquoi seulement 10% des personnes exposées à l'amiante développent un MPM. Dans la littérature, la présence d'un faible nombre de mésothéliome chez l'enfant (2 à 5% des cas), ainsi que l'étude de cas familiaux suggèrent une possible cause génétique [19].

#### IV) Mécanismes moléculaires

Que ce soient les fibres d'amiantes, le SV40, des radiations ou encore des facteurs inconnus, l'ensemble de ces facteurs vont concourir au processus de transformation tumorale des cellules mésothéliales et au développement d'un MPM. Les mécanismes mis en jeu au cours de cette transformation tumorale reposent sur :

- Une modification de l'état génétique (caryotype anormal, aneuploidie, réarrangements chromosomiques) [20-21].
- Une modification des processus moléculaires (division cellulaire plus rapide, résistance à la mort cellulaire, migration...) [13, 22].

Ces modifications vont conduire à une inhibition de l'expression des gènes suppresseurs de tumeur (TSG), à l'activation d'oncogènes et de processus inflammatoires, à l'expression de facteurs de croissances, et à la résistance à l'apoptose (Figure 2).



**Figure 2 : Caractéristiques moléculaires des cellules de mésothéliome**

Un certain nombre de caractéristiques moléculaires sont impliquées dans le processus de tumorigénèse des cellules mésothéliales. Tout d'abord, l'environnement cytokinique favorise l'inflammation et diminue la réponse cellulaire spécifique dirigée contre le MPM. Ensuite les cellules ont besoin d'un approvisionnement en nutriments. Cet approvisionnement est réalisé grâce à la présence d'un contexte favorisant l'angiogénèse et l'irrigation tumorale. La prolifération des cellules de MPM est supportée par des interactions avec la matrice extracellulaire et la production de facteurs cytokiniques. L'apparition de résistance à l'apoptose est médiée par la perte d'expression des gènes suppresseurs de tumeur et la surexpression de protéines anti-apoptotiques. L'ensemble de ces mécanismes participe à l'établissement et à la croissance de la tumeur.

**Source :** Robinson and Lake, *Advances in Malignant Mesothelioma*, 2005 [22].



### A. Les gènes suppresseurs de tumeur

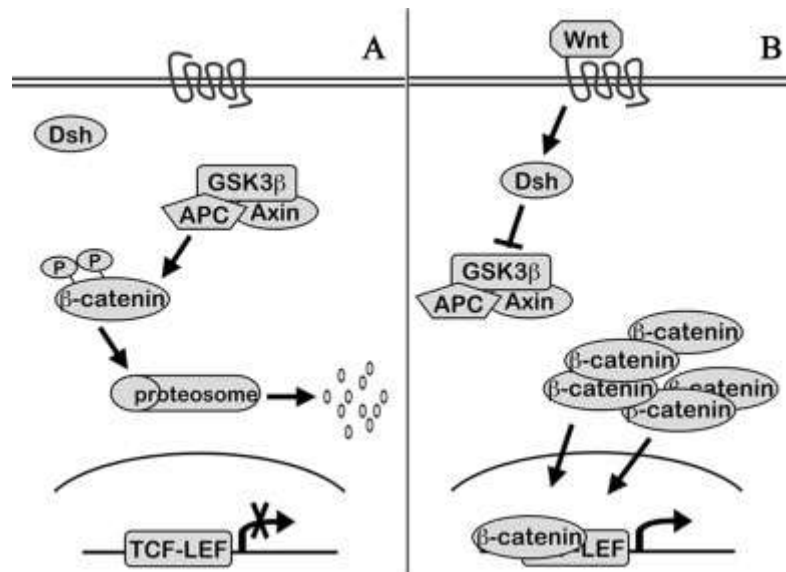
Les TSG ont un rôle primordial dans la protection contre l'apparition de cellules malignes. Ce groupe de gènes va principalement s'activer lors de dommages à l'ADN, empêchant la reprise du cycle cellulaire et activant ainsi les voies de mort cellulaire. La perte de ces gènes est donc l'une des étapes majeures dans la transformation tumorale [23]. Dans le MPM, on retrouve fréquemment des délétions de locus contenant des TSG tels que : CDKN2A (P16<sup>Ink4A</sup>/P14<sup>ARF</sup>), CDKN2B (P15) [24-25]. Des mécanismes épigénétiques sont également mis en jeu dans l'inhibition de l'activation des TSG, comme la méthylation du promoteur de RASSF1A ou encore P16<sup>Ink4A</sup> [26-27]. Cette inhibition de P16<sup>Ink4A</sup> va conduire à la dérégulation du cycle cellulaire inactivant de la même façon P53 ou encore pRB, deux autres protéines essentielles dans le contrôle du cycle cellulaire [28].

### B. Oncogènes

Les oncogènes, contrairement aux TSG en général inactivés dans les cancers, vont être activés et ainsi favoriser la croissance et la prolifération des cellules tumorales. La principale voie oncogénique activée dans le MPM est celle de la famille des facteurs de transcription AP-1 et celle de la  $\beta$ -caténine.

La voie AP-1 est régulée par un certain nombre de MAPK. Dans le MPM, on retrouve une activation de cette voie notamment par l'augmentation de Fra-1, un facteur de transcription appartenant à la famille AP-1 [29].

La  $\beta$ -caténine est un facteur de transcription régulé par des ubiquitines ligases. Sa régulation met en jeu des protéines comme WNT APC et GSK3 $\beta$  (Figure 3). Dans le MPM, la dérégulation de la  $\beta$ -caténine va conduire à son activation. La  $\beta$ -caténine est alors transloquée au niveau du noyau où elle pourra se lier à d'autres facteurs de transcription, tels que le T-cell factor/lymphoid-enhancer factor (TCF/LCF) et ainsi induire l'expression d'un certain nombre de gènes [28]. La dérégulation de la  $\beta$ -caténine dans le MPM peut être la conséquence d'une surexpression du facteur dishevelled (Dsh), ce dernier permettant la stabilisation de la  $\beta$ -caténine [30]. Un autre mécanisme d'action de l'activation de la  $\beta$ -caténine consiste en l'inhibition de ses régulateurs comme APC [31] ou l'activation des régulateurs négatifs de la voie WNT [32].



**Figure 3: Voie canonique WNT/ β-caténine**

La voie WNT/β-caténine est impliquée dans l'expression d'un certain nombre de gènes favorisant la progression tumorale. En l'absence du ligand se fixant sur le récepteur Frizzled et stabilisant son interaction avec LRP, le complexe (GSK3β, APC, Axin) libre va être responsable de l'hyperphosphorylation de la β-caténine. Cette dernière va être ubiquitinylée et adressée au protéasome où elle sera dégradée. En présence du ligand, la protéine Dsh va pouvoir inhiber l'action du complexe (GSK3β, APC, Axin). La β-caténine va être déphosphorylée, et va pouvoir alors être adressée au noyau et ainsi activer la transcription des gènes sous son contrôle, tels que C-myc et cyclin D. Dans le MPM on trouve des mutations d'APC ou de GSK3β, responsables d'une activation constitutive de la voie WNT qui participe à l'action oncogénique de la β-caténine.

**Source:** Abutaily AS. et al, Cadherins, catenins and APC in pleural malignant mesothelioma, 2003, [31]

### C. Processus inflammatoires

Par la présence de fibres d'amiante, de radiations ou d'une infection par le SV40, mais aussi de cellules tumorales elles-mêmes, l'environnement pleural va se trouver dans un contexte très inflammatoire. On retrouve ainsi l'expression d'un grand nombre de cytokines et de facteurs pro-inflammatoires, tels que : le transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), l'interleukine-6 (IL)-6, l'IL-8, le granulocyte-macrophage-, le granulocyte-, le macrophage- colony stimulating factor (GM-CSF, G-CSF, M-CSF). Ces facteurs favoriseraient par exemple : la prolifération cellulaire [33] et la néo-angiogénèse [34].

### D. Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont nécessaires au développement tumoral. Ainsi dans le MPM, comme dans d'autres cancers, on retrouve une forte expression de ces facteurs impliqués dans la prolifération tumorale, l'invasion tumorale mais aussi l'apparition de métastases [35]. On observe une surexpression des facteurs suivants : platelet derived growth factor (PDGF), insuline-like growth factor-1 (IGF1), hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF), epidermal growth factor (EGF) et TGF- $\beta$  [13]. Certains facteurs de croissance vont également avoir un rôle dans le processus d'angiogénèse. En effet, on retrouve une forte expression du vascular endothelial growth factor (VEGF) dans le MPM [36], facteur essentiel pour le développement de nouveaux vaisseaux sanguins. La néo-vascularisation est d'ailleurs une cible dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques du MPM [37].

### E. Résistance à l'apoptose

Suite à des signaux cellulaires particuliers, les cellules peuvent entrer dans un programme de mort cellulaire programmée. Dans le MPM, en plus d'une inactivation des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (P16 et P14 mentionnées), on observe une surexpression de molécules anti-apoptotiques comme BCL-2 [28]. On observe également une réexpression de la télomérase dans près de 90% des MPM. Cette enzyme est essentielle pour échapper à la mort cellulaire induite par les divisions cellulaires successives [38].

## V) Diagnostic

Le MPM est un cancer difficile à diagnostiquer et les symptômes sont souvent aspécifiques (difficultés respiratoires, fatigue, fièvre, douleurs thoraciques, faiblesse généralisée). Partant de ce constat, le diagnostic ne peut donc se réaliser ni sur les seules manifestations cliniques, ni sur le contexte épidémiologique. Il est donc important de mettre au point des procédures techniques afin de réaliser un bon diagnostic. Les différentes techniques de diagnostic reposent sur l'utilisation 1) de l'imagerie 2) de marqueurs cytologiques et 3) de marqueurs immuno-histochimiques. L'ensemble de ces approches sont à utiliser de concert afin de pouvoir diagnostiquer clairement un MPM.

L'imagerie médicale (scanner thoracique, l'imagerie par résonance magnétique (IRM), tomographie à émission de positons (TEP)) est utile pour évaluer la dissémination de la maladie mais ne permet pas toujours de différencier un MPM d'une autre affection pneumologique. Il y a donc une nécessité de développer d'autres approches diagnostiques. Elles passent par des études immuno-cytologiques, immuno-histochimiques et des dosages de marqueurs solubles. Ces derniers sont d'une grande utilité pour différencier un MPM d'une métastase d'un autre type de cancers (poumon, sein, ovaire...), mais aussi pour différencier les sous-types de MPM. En effet, trois grands types de MPM existent : épithélioïdes, sarcomatoïdes et mixtes.

Devant la multiplicité des méthodes de diagnostic, des directives sont régulièrement actualisées afin d'aider le médecin dans le diagnostic, mais aussi dans le choix du traitement [39].

### A. Techniques d'imagerie

Le scanner thoracique à lui seul, bien que pouvant fournir des informations sur la suspicion d'un cas de MPM, n'est pas suffisant pour le diagnostic. Cette technique permet de voir la présence : d'un épaississement de la plèvre, de nodule ou encore d'un épanchement pleural. Concernant l'IRM et la TEP, ces deux techniques ne sont pas recommandées pour le diagnostic du MPM, mais peuvent éventuellement être utilisées pour le différencier d'une maladie pleurale bénigne ou maligne et dans la prise en charge clinique. La thoracoscopie peut également être utilisée à partir du moment où une suspicion de la maladie est établie. Cette dernière est actuellement l'un des meilleurs moyens pour diagnostiquer ce cancer.

Cependant, parce qu'il existe différents types de tumeurs et de pathologies avec des morphologies pouvant évoluer au cours du développement de la maladie, il est souvent nécessaire de compléter ces analyses par des analyses cytologiques et immuno-histochimiques.

## B. Techniques cytologiques

Les techniques cytologiques consistent à réaliser une analyse des cellules présentes dans le liquide pleural. Pour cela, un certains marqueurs sont décrits : wilm's tumor one (WT1), calrétinin (CRT) et CA-15-3 (une forme soluble de la protéine mucin-1 (MUC1)). Ces analyses cytologiques permettent en moyenne dans 60% (40-87%) des cas, d'effectuer un bon diagnostic [40]. Cependant, par la présence d'un fort taux d'erreur de diagnostic et l'absence dans certains liquides de cellules tumorales, cette technique n'est pas recommandée pour établir à elle seule le diagnostic d'un MP, l'approche immuno-histochimique est préférée.

## C. Techniques immuno-histochimiques

L'immuno-histochimie, lorsqu'elle est possible, reste la meilleure possibilité pour diagnostiquer un MPM. Elle nécessite de réaliser une biopsie, permettant d'avoir accès à la fois au tissu suspicieux mais aussi au tissu sain. Ces analyses immuno-histochimiques sont basées sur l'étude de deux marqueurs positifs et de deux marqueurs négatifs au minimum et permettent d'obtenir un diagnostic fiable (Tableau 2) [39, 41-42]. Dans certains cas, cette distinction entre MPM et métastase est impossible ou présente un risque de confusion avec des atteintes bénignes ou inflammatoires. C'est pour ces raisons que la recherche de biomarqueurs solubles sériques ou sanguins pourrait s'avérer être d'une aide précieuse dans le diagnostic du MPM.

**Tableau 2 : Marqueurs couramment utilisés en immuno-histochimie**

Marqueur	Positivité	
	Mésotéliome	Poumon
Calrétinin	positif (80-100%)	négatif (5-10%)
Keratine CK5/6	positif (60-100%)	négatif (2-10%)
WT1	positif (43-93%)	négatif
EMA	positif (60-100%)(membranaire)	positif (70- 100%)(cytoplasme)
Podoplanin	positif (80-100%)	négatif (7%)
CEA monoclonale	négatif (0%)	positif (50-90%)
CD15	négatif (0%)	positif (50-70%)
BER-EPA	négatifs et positif (20%)	positif (95-100%)
TTF-1	négatif (0%)	positif (70-85%)
B72.3	négatif (<1%)	positif (70-85%)

**Source:** Scherpereel et al, Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma, 2010 [39].

#### D. Marqueurs solubles

L'utilisation de marqueurs solubles à des fins diagnostiques ou prédictives nécessite d'avoir accès au LqP et/ou au sang du patient. L'épanchement pleural est en partie responsable des difficultés respiratoires du patient. Cependant cet épanchement n'est pas spécifique du MPM (métastases d'adénocarcinome, atteinte bénigne, inflammation). Afin de soulager le patient, une ponction est réalisée. La prise de sang est quant à elle une méthode non invasive facilement réalisable. Le clinicien peut donc disposer d'échantillons biologiques issus du patient, sur lesquels une recherche de marqueurs solubles est possible.

Le principal marqueur décrit dans la littérature est la mésothéline (MSLN) et plus précisément la forme soluble de cette protéine : soluble related mesothelin peptide (SMRP). La SMRP semble prometteuse puisqu'elle permet de distinguer plus de 84% des MPM, et qu'elle est exprimée dans moins de 2% des autres pathologies [43]. De plus, le niveau de SMRP augmente avec la progression de la maladie et diminue avec sa régression. Cette SMRP peut être dosée à partir du liquide pleural et du sang du patient [44], ce qui présente un atout important dans le diagnostic du MPM. Un grand nombre d'autres marqueurs solubles sont également disponibles [45]. Parmi eux, deux semblent intéressants : l'ostéopontine (OPN), une glycoprotéine impliquée dans les interactions avec la matrice extracellulaire et fortement exprimée chez les patients atteints d'un MPM [46-48] et le mégacaryocyte potentiating factor (MPF) qui est lui aussi surexprimé dans le MPM [49-50].

Cependant, bien que ces marqueurs soient surexprimés dans le MPM, leur utilisation n'est pas encore validée dans une approche clinique systématique. Les recherches s'orientent vers l'utilisation d'une combinaison de marqueurs afin de pouvoir avoir une robustesse plus importante dans le diagnostic du MPM. Ces marqueurs solubles pourraient s'avérer être également d'une aide précieuse notamment dans la détection précoce du MPM au stade T0, même s'il n'est pas encore clairement établi qu'une détection précoce pourrait améliorer le pronostic. Toutefois une prise en charge précoce des patients ne pourrait qu'être bénéfique.

En conclusion, le MPM est un cancer dont le diagnostic peut parfois être difficile à établir. De ce fait, il est important de trouver de nouveaux marqueurs, tels que les marqueurs solubles, qui bien que mis en évidence par la recherche, ne sont pas encore utilisés en clinique. Les techniques de biologie moléculaire et de séquençage haut débit seront probablement elles aussi d'une aide intéressante dans le diagnostic du MPM.

## VI) Modalités thérapeutiques

La médiane de survie des patients atteints d'un MPM est de 12 mois actuellement. Elle est de 5% à 5 ans. Les modalités thérapeutiques dépendent en grande partie de l'avancement du MPM, de son grade, et de l'état général du patient. Actuellement, il existe trois approches majeures : la chimiothérapie, la chirurgie et la radiothérapie. Cependant, la faible efficacité de ces approches souligne le besoin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

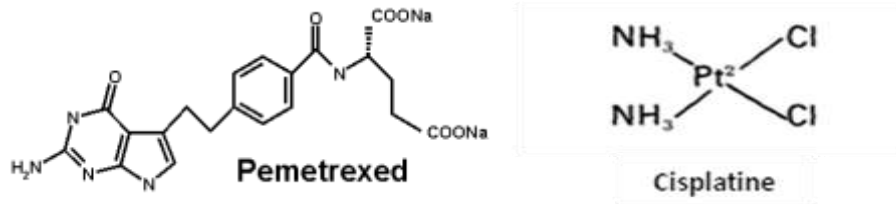
### A. Thérapies conventionnelles

#### 1. Chirurgie

La chirurgie permet dans certains cas une augmentation de la survie. Cependant le choix des patients pouvant être éligibles à cette approche thérapeutique est primordial. Ce choix s'effectue selon des critères d'âge, d'avancement de la maladie et de performance [51]. Actuellement il existe deux techniques de chirurgie : la pleuro-pneumectomie extrapleurale (EPP) et la pleurectomie avec ou sans décortication (P/D). La première consiste en l'exérèse de la plèvre pariétale et une pneumectomie intra-péricardique, la seconde en une exérèse partielle de la plèvre pariétale plus ou moins l'exérèse de la plèvre viscérale. Il semblerait toutefois que la morbidité et la mortalité suite à une P/D soient moins importantes que celles suite à une EPP en raison d'une approche beaucoup moins radicale [52-53]. Une description des techniques de chirurgie est disponible dans une revue récente [54]. Cependant la chirurgie, lorsqu'elle est réalisable, n'apporte un réel bénéfice que dans des approches multimodales.

#### 2. Chimiothérapie

Il est rapidement apparu dans la littérature que l'utilisation d'une combinaison de drogues était plus efficace que l'utilisation d'une chimiothérapie unique. En effet, une seule étude a regardé l'intérêt d'une chimiothérapie seule versus un placebo. Dans cette étude portant sur 409 patients, il apparaît qu'il n'y a pas d'augmentation de la survie significative avec l'utilisation de la chimiothérapie seule [55]. Le traitement actuel de référence en France consiste en une combinaison de cisplatine couplé à des antifolates (pemetrexed) [56]. Cette combinaison permettrait d'obtenir un gain de la moyenne de survie de 9,3 mois (cis-platine seul) à 12,1 mois (cisplatine+pemetrexed) ou 11,4 mois (cisplatine+raltitrexed) [57]. Il est à noter également le rôle d'une supplémentation en acide folique et vitamine B12 durant le traitement, permettant de réduire les effets secondaires hématologiques liés au pemetrexed.



**Figure 4: Formule chimique du Pemetrexed et du Cisplatine**

Formule chimique du Pemetrexed (A) et du Cisplatine (B) : molécules actuellement utilisées en première intention dans le traitement du MPM.

Le pemetrexed (Figure 4) est un agent inhibant un grand nombre de protéines. Parmi elles, on trouve les thymidylates synthases, enzymes impliquées dans la synthèse et la réparation de l'ADN en favorisant la production de deoxythymidine-5'-monophosphate (dTMP) [58]. Le pemetrexed va alors empêcher la production de ce dTMP et ainsi bloquer la prolifération des cellules. Cette drogue cible donc préférentiellement les cellules ayant un fort taux de prolifération [59].

Le cisplatine (Figure 4) est une molécule appartenant à la famille des dérivés du platine. Ils sont largement utilisés en chimiothérapie pour un grand nombre de cancers. Leur mécanisme d'action passe par la formation d'adduit à l'ADN, ce qui entraîne une cytotoxicité cellulaire. En effet, la formation de ces adduits va induire une courbure de l'ADN, empêchant ainsi la réplication et favorisant l'apparition de défauts de réparation de l'ADN conduisant à la mort de la cellule [60].

En dehors de la combinaison cisplatine + antifolate, qui est le traitement de première intention, d'autres combinaisons en association avec le cisplatine ont été étudiées : gemcitabine, doxorubicine, interférons ou encore l'utilisation du méthotrexate. Ces combinaisons présentent des effets intéressants, mais avec des taux de réponses plus faibles que le traitement de référence [61].

### 3. Radiothérapie

Le MPM est un cancer résistant à la radiothérapie [62]. Du fait de cette résistance, la radiothérapie intervient principalement dans des approches thérapeutiques multimodales après une chirurgie radicale (EPP) et dans une approche de désensibilisation à la douleur. Elle permet de contrôler la récurrence de la tumeur au niveau du site d'extraction [62].

#### B. Thérapies non conventionnelles

En plus des thérapies conventionnelles (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie), il existe un certain nombre d'approches non conventionnelles actuellement en phase d'essais cliniques. Ces



approches comprennent les thérapies ciblées, l'utilisation d'agents épigénétiques, l'utilisation de la thérapie génique mais aussi l'immunothérapie et la virothérapie [63].

### 1. Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées correspondent à la majorité des approches cliniques actuellement en cours de test. Elles se basent sur les propriétés moléculaires du MPM déjà citées ci-dessus. Ces thérapies vont consister en l'utilisation de molécules (molécules chimiques ou anticorps) venant inhiber principalement les voies de prolifération ou d'angiogénèse du MPM (récepteur du PDGF, VEGF, EGF). On peut noter par exemple des études cliniques sur l'utilisation du gefinitib ou de l'erlotinib, deux inhibiteurs du récepteur de l'EGF dans le traitement du MPM [64-65]. Ces thérapies spécifiques peuvent être couplées à la chimiothérapie classique comme dans cette étude de phase II/III sur l'effet d'une combinaison pemetrexed + cisplatine + bevacizumab (un anticorps dirigé contre le VEGFR), par rapport à la combinaison pemetrexed + cisplatine seule (actuellement en cours <http://clinicaltrials.gov/>). L'utilisation du sorafenib (un inhibiteur de plusieurs kinases) est actuellement en cours de test, couplé à une chimiothérapie à base de doxorubicine dans un essai de phase II, après un essai de phase I où une réponse partielle chez un patient a pu être observée [66]. Le thalidomide, un autre agent inhibant l'angiogénèse, est actuellement testé et semble avoir pour effet d'obtenir une meilleure espérance de vie des patients (+6 mois, pour 25% des patients). Un autre anticorps est actuellement en cours de développement dans le MPM : il s'agit du MORab-009, anticorps dirigé contre la mésothéline, un des marqueurs du MPM [67].

### 2. Virothérapie

La virothérapie consiste en l'utilisation de virus (modifiés ou non) dans une approche thérapeutique. Un des points importants de la virothérapie est donc la spécificité du virus vis-à-vis des cellules tumorales, avec l'objectif d'induire une mort cellulaire capable de stimuler une réponse immunitaire spécifique dirigée contre la tumeur [68]. De fait, il existe un grand nombre de virus pouvant être utilisés en virothérapie [69-70]. L'un d'eux, la souche vaccinale atténuée du virus de la rougeole (Measle Virus/MV), semble montrer des effets prometteurs contre le MPM [71]. Une étude préclinique a d'ailleurs été réalisée afin de vérifier la possibilité d'utiliser cette stratégie dans le MPM [72], et un essai clinique de phase I est actuellement en cours de recrutement (<http://clinicaltrials.gov/>). Cette approche présente de grands espoirs mais les résultats cliniques sont nécessaires afin de savoir s'il y a un réel bénéfice chez les patients traités par cette approche.

### 3. Agents épigénétiques

Les agents épigénétiques actuellement en phase de test dans le MPM sont des inhibiteurs d'histones déacétylases (iHDAC). Une partie de l'introduction leur sera d'ailleurs consacrée. Brièvement, l'une des actions principales des iHDACs est d'inhiber la désacétylation des histones, protéines associées en complexe et jouant un rôle dans la compaction de l'ADN et donc la régulation génique. Ces iHDAC agissent également sur la régulation de l'actétylation d'autres protéines, et vont avoir un potentiel cytotoxique en favorisant l'apoptose et en inhibant des molécules impliquées dans l'angiogénèse, telles que le VEGF induit lors de l'activation du VEGFR [73]. L'ensemble de ces propriétés est impliqué dans le pouvoir anticancéreux de ces agents épigénétiques [74]. Actuellement, seuls deux iHDACs ont été utilisés dans des protocoles cliniques ciblant le MPM. L'un d'eux est le suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), dont l'utilisation a été approuvée dans le lymphome T sous cutané uniquement aux Etats Unis et a été utilisé dans différents protocoles d'essais cliniques dans le MPM avec l'observation de réponses objectives [75]. Le second est le belinostat actuellement en cours d'évaluation dans une étude de phase II [76]. Plus récemment, un essai de phase II a eu lieu, utilisant le valproate (VPA) couplé à la doxorubicine et semble avoir des effets intéressants [77].

### 4. Immunothérapie

L'immunothérapie consiste en une activation du système immunitaire dirigée contre les cellules cancéreuses. A partir d'un certain nombre de résultats, cette stratégie apparaît comme une voie de recherche intéressante dans le MPM. En effet, il a été observé chez un patient une rémission partielle et spontanée associée à la présence d'un fort infiltrat lymphocytaire [78]. Des études ont également décrit la présence d'un fort taux d'anticorps dans le sérum de patients, avec dans 40% des cas des anticorps dirigés contre la mésothéline, un antigène du MPM [79]. Pour finir, un pronostic favorable et une survie plus importante chez les patients ayant un fort infiltrat lymphocytaire CD8+ sont décrits [80-81]. A l'inverse, la présence importante de lymphocytes T régulateurs (Treg) et un environnement tumoral immuno-modulateur est plutôt associée à un mauvais pronostic [82].

Partant de ces résultats et au vu du peu d'efficacité des thérapies conventionnelles, les approches immuno-thérapeutiques semblent donc être une piste de traitement intéressante [83-84]. Ces approches consistent en :

- La déplétion des lymphocytes T régulateurs et des macrophages associés aux tumeurs [83-84]
- La vaccination par les cellules dendritiques [85]
- L'injection de cytokines (INF- $\beta$ , IL-2, IL-12) ou leur blocage (CCL2, TGF- $\beta$ ) [83-84]
- Les thérapies immuno-adjuvantes (agoniste des TLR, injection de BCG) [86]

Cependant ces différentes approches, bien qu'entraînant pour certaines une réponse biologique (augmentation des effecteurs T CD8+, expression de cytokines...), semblent malheureusement avoir un effet limité sur la survie des patients. Il est donc nécessaire d'améliorer leur efficacité. Ces approches immuno-thérapeutiques, ne sont pas antigènes spécifiques. Une façon de les améliorer serait donc de développer les approches antigènes spécifiques qui sont utiles à la fois pour améliorer l'efficacité des traitements, mais également pour le suivi des réponses chez les patients. Cependant, afin de pouvoir développer des thérapies ciblées du MPM, il est important d'identifier et de rechercher des antigènes du MPM, pouvant être reconnus par des lymphocytes T. Actuellement seuls deux antigènes exprimés par des lignées de MPM ont été décrits comme pouvant être reconnus spécifiquement par des lymphocytes T : il s'agit de la MSLN [87] et de WT1 [88]. Un troisième antigène candidat a également été décrit dans le MPM et l'étude de la réponse T dirigées contre l'antigène mucin 1 (MUC1) fera l'objet de mes travaux de thèse.

## INTRODUCTION 1 : L'immunothérapie anticancéreuse

### I) À l'origine de l'immunothérapie

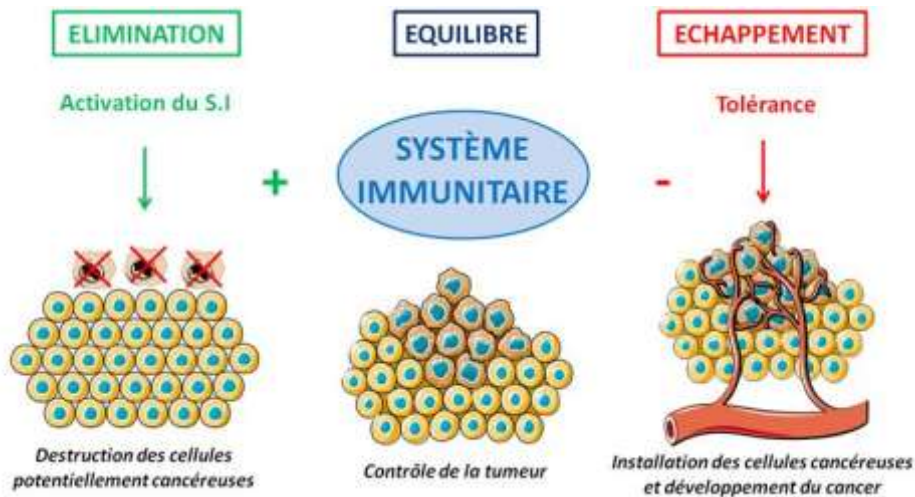
C'est en 1909 que Paul Erlich émet l'idée de l'implication du système immunitaire dans la reconnaissance et la mort des cellules tumorales [89]. Cependant, à partir des connaissances et des techniques disponibles à cette époque, ce concept n'a pas pu être vérifié de façon expérimentale. Ce n'est que 50 ans plus tard que le concept d'immunosurveillance est revenu sur le devant de la scène grâce à une meilleure compréhension de la transplantation et de l'immunité anti-tumorale [90-91]. Cette théorie de l'immunosurveillance, défendue par Thomas et Burnet repose sur le rôle des lymphocytes dans l'élimination des cellules transformées [92]. Leur hypothèse a donc été testée dans des modèles murins de souris *nude*, modèle s'approchant le plus d'un système immuno-déficient [93]. Ces études se sont révélées peu convaincantes et l'hypothèse de l'immunosurveillance des tumeurs est restée controversée. Cependant, on sait aujourd'hui que les souris *nude* ne sont pas totalement dépourvues de système immunitaire. En effet, ces souris possèdent un système immunitaire adaptatif minimum (présence d'une faible quantité de lymphocytes) [94-95] et un système immunitaire inné actif, avec notamment la présence de cellules NK qui explique les résultats peu convaincants obtenus dans ce modèle [96].

C'est dans les années 1990 que le concept d'immunosurveillance est réapparu à la suite de nouvelles études qui ont décrit plusieurs mécanismes immunitaires intervenant dans la protection tumorale. Tout d'abord l'implication de l'IFN- $\gamma$  dans la protection tumorale, en effet des souris rendues déficientes dans la voie INF- $\gamma$ , sont plus sensibles au développement de tumeur sous l'influence d'agents carcinogènes, démontrant ainsi le rôle protecteur de l'IFN- $\gamma$  [97]. Dans un autre modèle, la perte du gène codant pour la perforine chez des souris génétiquement modifiées provoque une plus forte sensibilité à l'apparition de tumeurs [98]. En effet, la perforine est une molécule présente dans les granules cytolytiques des lymphocytes T et des cellules NK. Elle joue un rôle important dans la mort induite par les lymphocytes [99]. L'implication des lymphocytes T et de la production de l'IFN- $\gamma$  dans l'immunosurveillance a été confirmée par des expériences chez des souris déficientes pour le gène de la *recombinase activating gene* (RAG)-2 [100]. Cette protéine est impliquée dans les réarrangements du récepteur reconnaissant les antigènes. Son inactivation va être responsable d'une déficience en lymphocytes T, B et NKT [101]. Des études de croisement des souris déficientes pour le gène RAG-2 avec d'autres gènes impliqués dans la réponse immunitaire (STAT1, INFGR1...) ont confirmé l'importance du système immunitaire dans la surveillance et l'élimination des cellules tumorales.

L'ensemble des études précédentes a été réalisé chez la souris, et ce concept d'immunosurveillance devait également être validé chez l'homme. Cette implication du système immunitaire a été mise en évidence notamment par l'étude de l'incidence des cancers chez des patients naturellement immuno-déficients ou sous traitement immunosuppresseur. Ces études ont permis de mettre en évidence trois preuves en faveur d'une immunosurveillance du système immunitaire chez l'homme [102]:

- Les patients transplantés et sous traitement immunosuppresseur présentent une plus grande incidence de cancer (deux à trois fois plus importante dans le mélanome) [103].
- Les patients ayant un cancer peuvent spontanément présenter des réponses immunitaires adaptatives et innées dirigées contre la tumeur [104].
- La présence de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) est dans la majorité des cancers un facteur de bon pronostic [105-106].

Partant de ces résultats, il a rapidement été établi que le terme d'immunosurveillance ne définissait pas clairement le rôle du système immunitaire dans son interaction complexe avec la tumeur. Le terme d'immuno-édition du cancer est donc apparu, prenant en compte le rôle du système immunitaire dans la protection contre le cancer, mais aussi son rôle dans l'édition et la sculpture de l'immunogénicité du cancer. En effet le système immunitaire, en protégeant notre corps de l'apparition d'une tumeur, concourt également de façon paradoxale à sélectionner des tumeurs relativement peu immunogènes, favorisant ainsi leur expansion dans l'organisme. Ce concept d'immuno-édition du cancer, proposé par Dunn en 2004 [102], se compose de trois phases : élimination, équilibre et échappement (figure 5).



**Figure 5 : Théorie des trois E (Elimination/Equilibre/Echappement)**

Selon la théorie des trois E, le Système Immunitaire (SI) est impliqué dans le contrôle de la croissance tumorale supposant l'établissement d'une immunosurveillance des tumeurs. En effet, dans les premiers stades du développement tumoral, le système immunitaire détruit les cellules tumorales, c'est la phase d'Elimination. Lorsque la tumeur se développe mais que sa croissance est contrôlée par le système immunitaire, c'est la phase d'Equilibre. Viens ensuite la phase d'Echappement, le système immunitaire n'est alors plus capable de contrôler la prolifération tumorale. La théorie de l'immuno-édition suppose qu'entre la phase d'équilibre et celle de l'échappement, la tumeur et le système immunitaire sont édités pour empêcher la reconnaissance des tumeurs par le SI mais aussi en favorisant l'immunosuppression et en favorisant l'échappement tumoral.

**Source :** D'après Dunn G.P et al, The three Es of Cancer Immunoediting, 2004 [102]

Le développement d'approches d'immunothérapies anticancéreuses doit donc s'intéresser à ces trois aspects pour tenter de contrôler et d'inverser l'échappement tumoral afin de revenir à une phase d'élimination. Cette élimination devrait empêcher la résurgence des cellules cancéreuses et donc de la maladie. Afin de pouvoir développer des approches immuno-thérapeutiques efficaces, il est nécessaire de comprendre le fonctionnement des acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale.

## II) Les acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale

Les médiateurs de ces mécanismes d'immuno-édition, pouvant être ciblés dans une approche d'immunothérapie, sont divers et multiples. Ils appartiennent aussi bien à l'immunité innée qu'à l'immunité adaptative. Mon travail de thèse a porté principalement sur la composante lymphocytaire faisant partie de l'immunité adaptative. Par conséquent, je développerai plus particulièrement cette partie en détaillant notamment la cellule T et son utilisation en immunothérapie anti-tumorale.

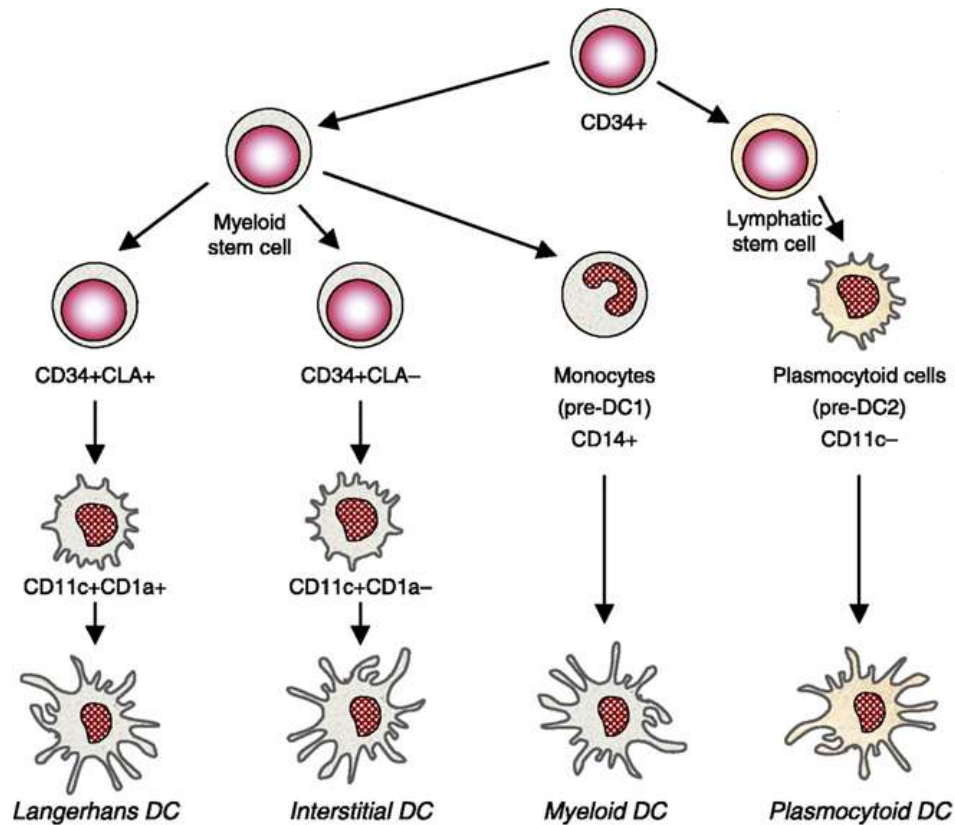
## A. L'immunité innée

L'immunité innée regroupe plusieurs types cellulaires : les Cellules Dendritiques (DC), les macrophages, les granulocytes, les Natural Killer (NK), les Myeloïd Derived Suppressor Cells (MDSC) et les monocytes. Ces cellules sont la première ligne de défense contre les agressions extérieures mais également contre les cellules cancéreuses [107-108]. Cependant, ce système inné peut jouer un double rôle. En effet, en fonction de l'orientation de la réponse, le système inné peut également favoriser l'établissement de la tumeur en favorisant par exemple la néo-angiogénèse [109]. Les Tumor Associated Macrophage (TAM) peuvent également avoir un rôle dans cette néo-angiogénèse et aussi installer un environnement immunosuppresseur, ce qui facilite la progression tumorale. Cette réponse innée est donc importante pour orienter la réponse adaptative vers une élimination des cellules cancéreuses ou au contraire une tolérance. Une des cellules centrales de cette orientation, à l'interface entre système inné et adaptatif, est la cellule dendritique [110-111].

### 1. Les cellules dendritiques

Les cellules présentatrices d'antigènes (APC) (macrophages, lymphocytes B et cellules dendritiques) sont le lien entre immunité innée et adaptative. Elles se caractérisent par leur capacité à présenter des antigènes non seulement par la voie HLA de classe I aux lymphocytes T CD8+, mais aussi par la voie HLA de classe II aux lymphocytes T CD4+. Les cellules dendritiques jouent un rôle particulièrement important à cette interface, notamment par leur capacité de capture et d'apprêtement des antigènes, de migration et de stimulation des lymphocytes T naïfs. Ces cellules sont donc une clé importante en immunothérapie.

Depuis la découverte des cellules de Langerhans en 1868, plusieurs types de cellules dendritiques ont été décrits (figure 6). Ces différentes DC vont alors avoir des fonctions communes et spécifiques et sont divisées en deux grandes familles : les DC conventionnelles et les DC plasmacytoïdes [112].



**Figure 6: Sous-populations de cellules dendritiques chez l'homme**

Origine des différents sous-types de cellules dendritiques. Deux voies d'ontogenèse principales existent : la lignée myéloïde, d'où dérivent des précurseurs CD11c+, donne naissance aux DC de Langerhans, aux DC interstitielles et aux DC myéloïdes. Les DC plasmocytoides dériveraient quant à elles d'un précurseur lymphoïde CD11c-.

**Source :** Schott, Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers, 2006 [113]

Ces cellules dendritiques sont aussi appelées cellules sentinelles, et peuvent se retrouver dans un état immature ou mature, en fonction de leur activation [114]. A l'état immature les DC résident en périphérie de l'organisme et possèdent des propriétés de phagocytose importantes. En effet, elles jouent un rôle de surveillance et de maintien de la tolérance aux auto-antigènes. Dans des conditions normales, grâce à une variété de récepteurs [115], ces DC vont pouvoir capturer un large éventail d'autoantigènes, migrer vers les organes lymphoïdes secondaires et induire la tolérance des lymphocytes spécifiques d'auto-antigènes. Dans des conditions pathogéniques (infection par virus, bactérie), des signaux de dangers sont relargués par les cellules infectées (damage associated molecular pattern, (DAMP)) mais aussi des molécules exprimées par les pathogènes (pathogen associated molecular pattern, (PAMP)). Ces signaux vont pouvoir induire la maturation des DC.

Après migration vers les organes lymphoïdes, les DC matures acquièrent de forte capacité de stimulation des lymphocytes naïfs, par l'expression de molécules de co-stimulation et la sécrétion de



cytokines (IL-12 pour les DC myéloïdes, IFN- $\alpha$  pour les pDC). Ces cellules dendritiques pourront alors présenter de façon efficace les antigènes aux lymphocytes T et les activer. En fonction du contexte environnemental de capture de l'antigène, les DC vont pouvoir orienter la réponse immunitaire vers l'activation ou la tolérance [116].

L'une des particularités majeures des DC est leur capacité à présenter des antigènes exogènes dans les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I). Ce phénomène est alors appelé « présentation croisée » et les premières évidences de ce phénomène ont été décrites par Bevan et al, [117-118], puis par Simpson et Gordon [119]. Ce mécanisme est bien décrit en ce qui concerne la présentation croisée d'antigènes viraux. Cependant, il est beaucoup plus controversé en ce qui concerne les antigènes de tumeur [120].

De par leurs capacités à activer aussi bien des populations lymphocytaires CD4+ que CD8+, les DC sont au cœur des stratégies vaccinales anti-tumorales. L'une des approches consiste à provoquer la maturation des DC et à les charger en antigènes de tumeur soit par co-culture avec des lysats tumoraux soit par un chargement en peptide d'intérêt, soit par utilisation d'un vecteur d'expression de l'antigène d'intérêt. L'objectif est de vacciner les patients de façon à stimuler le système immunitaire. Le premier essai de vaccination par DC a été réalisé par le Dr F. Nestlé dans le mélanome [121]. En ce qui concerne le MPM, un essai de phase I chez l'homme basé sur une étude pré-clinique est actuellement en cours de réalisation [85]. Cependant, les cellules dendritiques ne sont pas les seules cellules du système inné pouvant avoir un rôle dans le contrôle et l'échappement tumoral.

## 2. Les autres cellules du système immunitaire inné

En dehors des cellules dendritiques, les autres cellules du système immunitaire inné participent également à l'immunosurveillance des tumeurs. Une de ces cellules, la NK, est impliquée dans l'élimination des cellules tumorales. Les cellules NK expriment à leur surface un récepteur impliqué dans l'immunosurveillance, le Natural Killer group 2 member D (NKG2D). Ce récepteur va reconnaître principalement les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) class I-related proteins A et B (MICA et MICB) [122]. Ces ligands sont induits par les cellules tumorales suite à un stress. Ce stress peut être de nature différente, génotoxique, un choc thermique mais aussi induit par les thérapies et les agents chimiothérapeutiques [123-124]. La reconnaissance de ces ligands par les NK va conduire à la lyse des cellules cibles. Les NK sont également capables de reconnaître via ses récepteurs CD16 et CD56, la fixation d'anticorps sur les cellules tumorales et donc

induire la lyse par ADCC (Antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity) des cellules tumorales. Un dernier mode d'action des NK, est l'expression de récepteur KIR, ces molécules inhibitrices sont capables de reconnaître l'absence d'expression des molécules de l'antigène leucocytaire humain (HLA) et donc d'induire spécifiquement la lyse des cellules tumorales perdant l'expression de ces molécules HLA, comme cela peut-être observé dans les cancers hématologiques [125].

On retrouve également parmi les cellules de l'immunité innée un rôle important des macrophages dans le contrôle de la progression tumorale et dans les mécanismes d'échappement au système immunitaire. On distingue ainsi deux grands types de macrophages.

Les macrophages activés classiquement de type M1 et les macrophages activés alternativement de type M2. Ces deux catégories de macrophages vont avoir des propriétés différentes. Les macrophages de type M1 vont plutôt avoir une activité pro-inflammatoire alors que les macrophages de type M2 vont plutôt produire des cytokines anti-inflammatoires. Dans les tumeurs, on retrouve des TAM. Les TAM de type M1 vont être associés à une activité anti-tumorale, au contraire des TAM de type M2 qui seront associés aux mécanismes d'échappement tumoral, en favorisant notamment un contexte immunosuppresseur [126].

## B. L'immunité adaptative

La réponse innée, par l'intermédiaire de ses effecteurs comme les DC est capable d'activer et d'orienter l'établissement d'une réponse adaptative. Cette réponse adaptative va alors mettre en jeu les lymphocytes : cellules effectrices capables de mémoire et présentes au sein de notre organisme. Ces lymphocytes sont eux-mêmes subdivisés en deux populations bien distinctes : les lymphocytes B, effecteurs de la réponse humorale, et les lymphocytes T, effecteurs de la réponse cellulaire. Ce n'est qu'en 1960 que Max Cooper et Robert Good décrivent la distinction entre les lymphocytes B et les lymphocytes T [127-128].

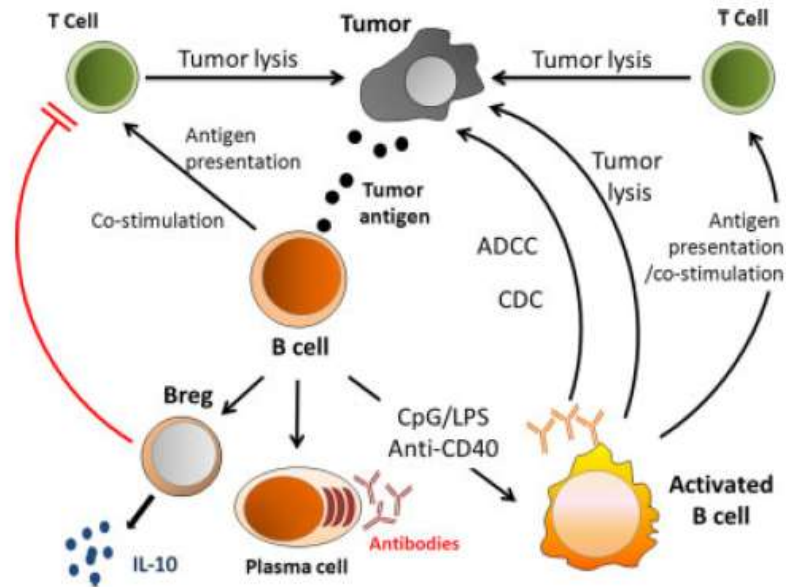
### 1. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont caractérisés par l'expression du « B cell receptor » (BCR). Ce récepteur est une immunoglobuline exprimée à la surface des cellules B et permet la reconnaissance spécifique d'épitope antigénique [129]. C'est en 1948 que les plasmocytes (stade de différenciation le plus élevé des lymphocytes B) ont été décrits pour leurs capacités à produire des anticorps [130].

Les fonctions des lymphocytes B sont assez complexes : en dehors de leur rôle de production d'anticorps dans la réponse humorale, les lymphocytes B jouent également divers rôles dans l'activation et la différenciation des lymphocytes T. En effet, en tant que APC, ces cellules vont avoir la capacité de présenter des antigènes aux lymphocytes T, rôle essentiel dans l'initiation de la réponse immunitaire T et B. L'absence de lymphocytes B conduit à des désordres dans le système immunitaire avec un déficit dans la diversité et le nombre de thymocytes. Pour finir, les lymphocytes B sont également des cellules productrices de cytokines et vont donc avoir un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire.

Etant donné le rôle important des lymphocytes B dans l'orientation et dans l'éducation de la réponse T, la question de leur rôle dans le cancer se pose (figure 7). Ce rôle semble d'ailleurs assez controversé. En effet, les lymphocytes B sont tout d'abord apparus comme étant favorables à un contexte immuno-régulateur et favorisant notamment l'établissement des Treg par la présence de lymphocytes B régulateurs (Bregs) [131]. En parallèle, des études ont décrit dans des modèles murins l'implication des lymphocytes B seuls dans la régression tumorale [132], mais aussi en lien avec l'activation des lymphocytes T, grâce à leurs propriétés de présentation antigénique [133]. Les lymphocytes B activés, ou plasmocytes, sont également responsables de la production d'anticorps. Ces anticorps sont d'ailleurs depuis quelques années largement utilisés en thérapie ciblée, tels que l'avastin (anti-VEGF), l'herceptine (HER-2/neu) ou encore l'erbitux (anti-EGFR).

A l'heure actuelle, l'utilisation et le rôle des lymphocytes B en immunothérapie anti-tumorale sont encore peu étudiés. Cependant, il semble évident que ces cellules pourraient se révéler très utiles notamment par leur capacité à activer les lymphocytes T et à produire des anticorps spécifiques d'antigènes tumoraux. Ces cellules ont donc toute leur place dans le développement de nouvelles stratégies d'immunothérapies.



**Figure 7: Interaction du lymphocyte B avec la tumeur**

Le lymphocyte B dispose d'une place importante dans la médiation de la réponse anti-tumorale. En présence de cellules tumorales, le lymphocyte B peut s'activer de différentes façons. Il peut entrer en coopération avec les lymphocytes T via des interactions directes et la sécrétion de cytokines. Il peut également favoriser l'établissement d'une tolérance en se différenciant en lymphocyte B régulateur. Pour finir, il va pouvoir participer à l'action anti-tumorale par la production d'anticorps et la médiation de mort cellulaire par ADCC mais aussi par l'activation de la voie du complément.

Source : NAMM et al, B lymphocytes as effector cells in the immunotherapy of cancer, 2012 [134]

## 2. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T sont des cellules spécialisées du Système Immunitaire, acteurs de la réponse cellulaire et jouant également un rôle dans la réponse humorale. Il existe différentes populations de lymphocytes T, spécialisées dans différents types de réponses. Cependant, l'ensemble des lymphocytes T est caractérisé par la présence d'un récepteur des cellules T (TCR), récepteur impliqué dans la reconnaissance des antigènes et composé de deux chaînes  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ .

Les lymphocytes T  $\alpha\beta$  sont eux-mêmes divisés en deux populations :

- Les T CD4-/CD8+, sont impliqués dans la reconnaissance du complexe CMH I/peptide. Une fois activés, ces lymphocytes vont se différencier en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et pourront induire la mort spécifique de leur cible.
- Les T CD4+/CD8- sont impliqués dans la reconnaissance du complexe CMH II/peptide. Une fois activés, ces lymphocytes vont se différencier en lymphocytes auxiliaires ou helper, possédant un faible pouvoir cytotoxique mais orientant et favorisant la réponse

immunitaire innée et adaptative par la production de cytokines. Les lymphocytes T CD4+ TH1 , par leur production d'IFN- $\gamma$ , vont favoriser la réponse immunitaire cellulaire, les T CD4+ TH2, par leur production d'IL-4, vont favoriser la réponse immunitaire humorale, les T CD4+ TH17, par leur production d'IL-17, vont avoir un rôle pro-inflammatoire et les CD4+/CD25+/FOXP3+/CD127<sup>low</sup> ont quant à eux un rôle immunosuppresseur et sont appelés Treg.

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont une sous-population de lymphocytes représentant 3 à 5 % des lymphocytes totaux du sang. Ces lymphocytes sont impliqués dans des mécanismes de reconnaissance d'antigènes non peptidiques surexprimés lors d'un stress cellulaire. Cette reconnaissance antigénique peut être dépendante ou non des molécules du CMH et implique une molécule de CMH particulière capable de présenter des lipides glycosylés : la protéine CD1d.

En cancérologie, les lymphocytes T sont rapidement apparus comme étant des acteurs majeurs de l'immunothérapie. En effet, en 1972, il a été démontré la possibilité d'immuniser des souris porteuses de tumeur, par un transfert dit « adoptif » de lymphocytes T provenant de souris syngéniques préalablement immunisées [135]. En 1981, l'étude de souris dites « *nude* » ou déplétées en lymphocytes T a ensuite mis en évidence l'importance des lymphocytes T dans la médiation d'une réponse immunitaire anti-tumorale [136]. Ces études chez la souris ont conduit à la recherche de réponses T chez des patients. Pour cela, dès les années 1970, une technique appelée typage autologue a été mise en place [137]. Cette technique consiste en l'établissement d'une part de la lignée tumorale (mélanome, autres types de cancers,...) comme cible antigénique, puis d'autre part à analyser la présence d'une réponse humorale ou cellulaire dirigée contre cette lignée. Grâce à cette technique, des lymphocytes T reconnaissant la tumeur ont pu être décrits notamment dans le mélanome [104]. Dans la majorité des cas, ces lymphocytes T sont des CTL capables de lyser les cellules tumorales [138]. Cependant, les CTL ne sont pas les seules cellules présentes dans les TIL. On retrouve également des lymphocytes T CD4+ [139], mais aussi des lymphocytes T $\gamma\delta$  spécifiques des cellules tumorales [140].

Ces CTL spécifiques sont capables de proliférer et de lyser les cellules tumorales autologues, mais aussi des lignées tumorales allogéniques de même restriction HLA et partageant l'antigène. Ces CTL proviennent de précurseurs cytotoxiques présents au sein de la tumeur. Cela suggère donc la présence à la fois d'une primo-stimulation mais aussi la présence d'antigènes tumoraux. Ces résultats ont abouti au développement de techniques permettant d'amplifier et d'étudier ces réponses spécifiques. En 1990, l'équipe du Dr. F Jotereau décrivit une technique de culture *in vitro* des

lymphocytes T en présence d'IL-2 à partir des TIL de patients atteints d'un mélanome [141]. Dans le même temps, l'équipe de Boon décrit pour la première fois un antigène du mélanome MAGE3 reconnu par les lymphocytes T CD8+ spécifiques [142-143]. Concernant les lymphocytes T CD4+, l'identification d'antigène CMH II restreint est arrivée plus tardivement [144]. Depuis, un grand nombre de lymphocytes T humains réactifs vis-à-vis de cellules tumorales a été décrit pour différents cancers : mélanome, ovaire, côlon... Il semble donc sortir de ces études que la présence de lymphocytes CD8+ infiltrant la tumeur est dans la majorité des cas un facteur pronostic favorable. Cependant, une étude récente suggère que plutôt que la présence des T CD8+, c'est le ratio CD8+/Treg (FoxP3+) qu'il faut utiliser comme marqueur de pronostic favorable [106].

Les lymphocytes T étant des cibles intéressantes, il est important de bien comprendre comment ils fonctionnent afin de pouvoir les utiliser en immunothérapie anti-tumorale et notamment: d'identifier les antigènes tumoraux reconnus par des lymphocytes T ; comprendre les mécanismes régissant la présentation antigénique ; comprendre les mécanismes d'activation des lymphocytes T ; comprendre les mécanismes d'échappement des tumeurs.

### III) La présentation antigénique

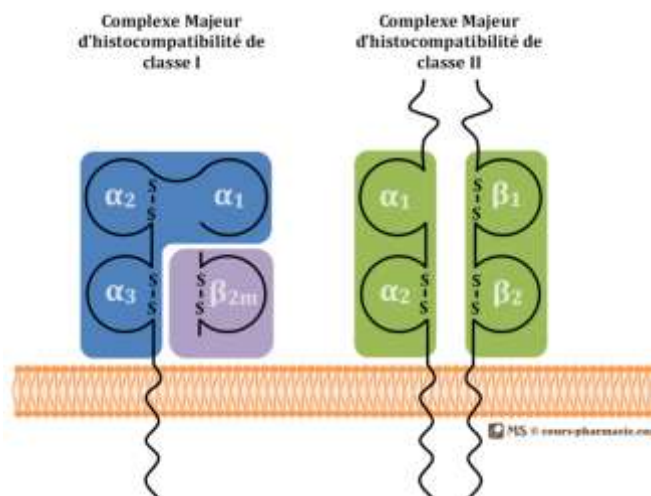
Constamment, nos cellules sont équipées de molécules capables de présenter aux lymphocytes T une image de son contenu cellulaire. Cette capacité de présentation antigénique joue un rôle important dans la surveillance de l'intégrité de notre corps. Lors d'une agression extérieure, certains pathogènes ont la capacité d'infiltrer nos cellules. Grâce à la présentation des antigènes par les molécules du CMH, la cellule est capable d'avertir le système immunitaire de la présence de pathogène à l'intérieur d'elle-même. Cette activation des lymphocytes T dirigés contre des cellules anormales est alors appelée réponse cellulaire.

Les cellules tumorales vont acquérir au cours de leur transformation maligne un phénotype tumoral conduisant à l'apparition de modifications comme la néo-expression et la surexpression de protéines ou l'expression de protéines anormales. Ces modifications peuvent conduire à la présentation d'épitopes issus de ces protéines anormales dans les molécules de CMH de classe I. Ces cellules tumorales, reconnues comme étant anormales, pourront donc être la cible de lymphocytes T cytotoxiques.

### A. Les molécules HLA ou CMH

Les molécules du CMH ou HLA de classe I et II sont composées de deux sous-unités glycoprotéiques appartenant à la famille des immunoglobulines. Les molécules CMH de classe I sont constituées d'une chaîne lourde transmembranaire de 45 kDa associée de façon non covalente à une sous-unité soluble de 12 kDa, la  $\beta$ 2-microglobuline ( $\beta$ 2m). Les molécules de CMH de classe II sont quant à elles constituées de deux chaînes transmembranaires  $\alpha$  et  $\beta$  associées de façon non covalente [145] (figure 8).

Les molécules de CMH de classe I sont exprimées de façon constitutive par l'ensemble des cellules nucléées de notre organisme. Elles vont avoir un rôle de senseur de l'intégrité cellulaire. L'expression des molécules de CMH de classe II est quant à elle restreinte à certains types cellulaires : Les APC (monocytes, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B et les lymphocytes T activés) [146]. De plus, dans certaines conditions, des cellules non-APC peuvent exprimer les HLA de classe II, lorsqu'elles sont par exemple exposées à l'IFN- $\gamma$ .



**Figure 8: Représentation des molécules CMH de classe I et II**

La molécule de CMH I est constituée d'une chaîne alpha (lourde), elle-même composée de trois domaines immunoglobuline-like (1, 2, 3). La chaîne  $\beta$ 2 microglobuline ( $\beta$ 2m) ou chaîne légère non codée par le gène du CMH I est composée d'un domaine immunoglobuline like. La molécule CMH de classe II est quant à elle constituée de deux chaînes polypeptidiques alpha et beta et présentent chacune deux domaines immunoglobuline-like. Ces deux chaînes sont associées de manière covalente et sont toutes deux codées par le locus CMH.

Source : Mathieu Simon, cours de pharmacie, <http://www.cours-pharmacie.com>.

Les molécules HLA, qu'elles soient de classe I ou II, sont polygéniques. Il existe donc plusieurs gènes codant pour les chaînes lourdes des molécules HLA de classe I (HLA-A,-B,-C..) mais également pour les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules HLA de classe II (HLA-DP ( $\alpha$  et  $\beta$ ), DQ, DR...). Ces familles de gènes sont également extrêmement polymorphes. Il existe un grand nombre d'allèles pour chaque gène, créant ainsi une sorte de carte d'identité quasiment unique pour chaque individu et impliquée notamment dans les phénomènes de rejets de greffes d'organes ou de moelle osseuse. Cependant, ces allèles présentent également une grande hétérogénéité de distribution : par exemple l'allèle HLA-A\*0201 est l'allèle le plus fréquent dans la population caucasienne (exprimé par 50% des individus). De ce fait, le contexte HLA-A\*0201 est le plus étudié pour la présentation antigénique.

Grâce aux techniques de cristallographie, il a été possible de comprendre comment ces molécules s'associaient aux peptides [147-148]. En effet, les molécules CMH de classe I par leur domaine  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  et les molécules HLA de classe II par leur domaine  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  vont former un sillon dans lequel le peptide va pouvoir venir se loger. Les molécules de CMH de classe I vont se lier avec des peptides de 8 à 10 acides aminés, tandis que les molécules de CMH de classe II vont se lier avec des peptides de 12 à 24 acides aminés [145]. La grande diversité d'allèles des molécules de CMH I et II va être responsable d'une grande hétérogénéité dans la séquence des peptides pouvant se fixer dans leur sillon. En effet, les motifs d'ancrage favorables seront différents d'un allèle à un autre. Suite à l'étude de l'éluion des peptides présents dans les molécules de CMH et de la capacité de fixation d'une banque de peptides, il a été possible de déterminer des motifs peptidiques d'ancrage spécifiques des différents allèles des molécules HLA [149]. La majorité des molécules HLA de classe I possèdent deux sites majeurs d'ancrage en position 2 et en position 9 ou 10 du peptide [150-151]. Par exemple, en ce qui concerne l'allèle HLA-A\*0201, ses motifs d'ancrage majeurs sont une leucine ou méthionine en position 2 et une valine en position 9 [149, 152-153]. La connaissance de ces motifs d'ancrage est une donnée importante dans la mise au point d'algorithme prédisant les peptides susceptibles de se fixer dans le sillon d'un allèle HLA particulier.

#### B. Mécanisme d'apprêtement des antigènes sur les molécules HLA de classe I et II

Les molécules CMH de classe I sont exprimées par l'ensemble des cellules nucléées de notre organisme. Elles sont chargées de présenter une image du contenu des cellules. Les peptides présentés sont issus de la dégradation des protéines endogènes. Ils proviennent du recyclage des protéines du cytosol mais aussi de protéines rétrotransloquées ou défectueuses. Ces protéines sont alors ubiquitinylées, et adressées au protéasome, complexe protéique chargé de la dégradation des protéines. Ces peptides issus de la dégradation des protéines par le proteasome vont alors être



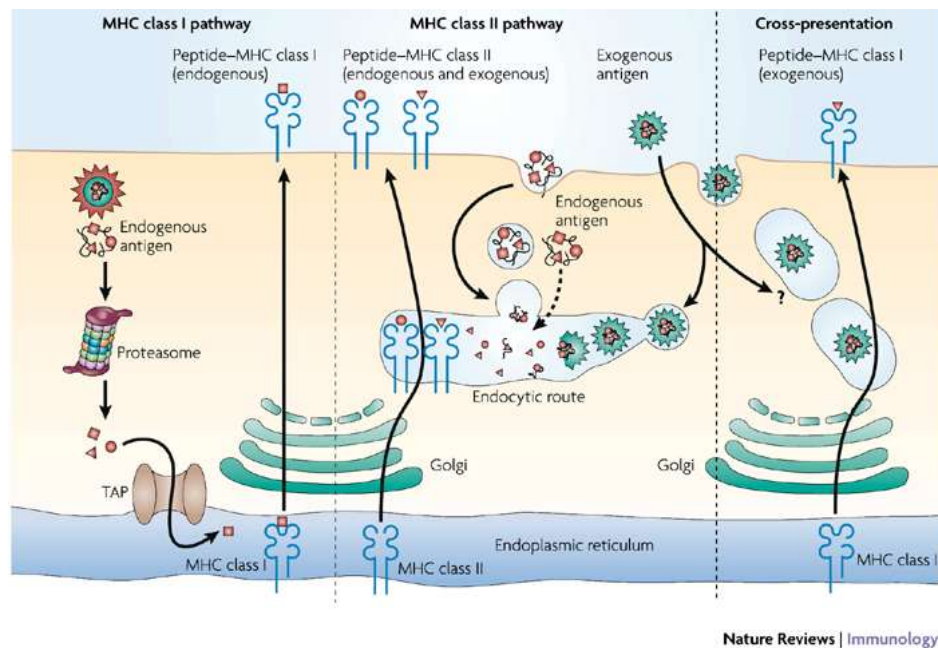
transférés dans le réticulum endoplasmique grâce aux protéines TAP (transporteur associé à l'apprêtement des antigènes) [145]. Une fois dans le réticulum endoplasmique, les molécules CMH de classe I vides sont associées à des protéines chaperonnes ( $\beta$ 2m, calnexine, calréticuline, ERp57, tapasine). Ces protéines vont assurer une conformation stable des molécules HLA en l'absence du peptide, leur rétention dans le réticulum et facilitent la rencontre entre le complexe TAP/peptide et la molécule HLA de classe I. Le peptide s'insère dans le sillon de la molécule HLA de classe I et le complexe HLA/peptide stable ainsi formé va se libérer de son association avec les protéines chaperonnes et être transporté à la surface cellulaire par exocytose pour être présenté aux lymphocytes T CD8+ (figure 9).

L'apprêtement des antigènes présentés par les molécules de HLA de classe II est quant à lui un peu différent. Tout d'abord, la source de peptides antigéniques provient d'éléments exogènes aux cellules et internalisés par les cellules exprimant la molécule HLA de classe II. Ces antigènes internalisés vont passer par les compartiments endo-lysosomiaux où ils pourront être clivés en peptides. Ces peptides seront ensuite associés à la molécule HLA de classe II en remplaçant le peptide CLIP, issu de la chaîne invariante associée aux molécules HLA de classe II. Le complexe HLA de classe II/peptide est transporté à la surface et présenté aux lymphocytes T CD4+ [154] (figure 9).

Il semble donc d'un premier abord que les antigènes exogènes ne soient pas présentés aux lymphocytes T CD8+. Cependant, certaines APC sont capables de présenter des peptides issus d'antigènes exogènes dans les molécules HLA de classe I. Ce phénomène est appelé « présentation croisée » et son mécanisme est de mieux en mieux caractérisé [155] (figure 9). En effet, la présentation croisée d'antigènes viraux est largement admise, cependant celle d'antigènes tumoraux l'est moins. En outre, certains proposent même que cette capacité de présentation croisée serait anecdotique et restreinte à un certain type d'antigènes [120]. Plusieurs hypothèses coexistent pour expliquer ce mécanisme de présentation croisée. Les antigènes phagocytés pourraient être transférés, via des vésicules, des compartiments endosomaux vers le cytoplasme et ainsi rejoindre la voie de dégradation par le protéasome et la prise en charge par les molécules TAP [156]. Ces antigènes pourraient également par transfert horizontal, passer d'une cellule à une autre et également rejoindre la voie de dégradation protéasomale [157].

Une autre hypothèse concerne la possibilité d'avoir une fusion des vésicules d'endocytose avec le réticulum endoplasmique [158]. C'est sur ces capacités à la fois de présentation et de présentation croisée que repose une grande partie des stratégies vaccinales utilisant les cellules dendritiques. D'ailleurs, récemment il a été décrit une sous-population de cellules dendritiques qui seraient

spécialisées dans les mécanismes de présentation croisée et caractérisées par l'expression des marqueurs BDCA3, XCR1 et Clec9A. Cette dernière molécule reconnaissant l'actine F exposée par les cellules en nécrose et favoriseraient la phagocytose des cellules [159-163].



**Figure 9 : Voie de présentation des antigènes dans les molécules CMH de classe I et II**

L'ensemble des cellules nucléées de notre organisme a la possibilité de présenter des peptides endogènes issus de protéines normales (mauvaise conformation, issus du réticulum endoplasmique ou dérivant de protéine provenant du cytoplasme) mais aussi d'antigènes endogènes (virus, protéines tumorales...). Ces protéines sont digérées en peptides par le protéasome. Puis, via la molécule TAP, un transporteur, ces peptides sont ensuite chargés dans le réticulum endoplasmique sur les molécules CMH de classe I. Les APC ont en plus la possibilité d'endociter des protéines ou des antigènes exogènes. Ces antigènes sont dirigés vers l'endosome tardif pour être digérés en peptides, pris en charge par des molécules chaperonnes et chargés sur les molécules du CMH de classe II. Il existe également une dernière voie de présentation antigénique, dite de « présentation croisée » et qui serait plutôt restreinte aux APC et notamment aux DC. Cette cross-présentation permet le chargement de peptides issus d'antigènes exogènes sur les molécules du CMH de classe I.

**Source :** José A Villadangos and Petra Schnorrern , Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo, 2007 [115]

#### IV) La synapse T : Activation du lymphocyte T

Une fois ces complexes CMH/peptide de classe I ou II présents à la surface des cellules, ils sont disponibles pour activer les lymphocytes T spécifiques. Cette activation implique principalement le TCR. Le signal est alors ensuite relayé à l'intérieur de la cellule grâce à la molécule CD3 et à une multitude de protéines intracellulaires. L'ensemble va conduire à l'activation des fonctions du lymphocyte T : sécrétion de molécules lytiques ou de cytokines, expression de molécules à la surface cellulaire et prolifération. La formation de complexe TCR/HLA-peptide et toutes les molécules impliquées dans l'activation du lymphocyte T vont alors constituer la synapse immunologique. Cette

synapse immunologique est constituée de trois phases, chacune ayant son importance dans la médiation du signal et de la réponse T : une phase réceptrice, une phase de signalisation intracellulaire et la dernière phase impliquant le cytosquelette (figure 10) [164].

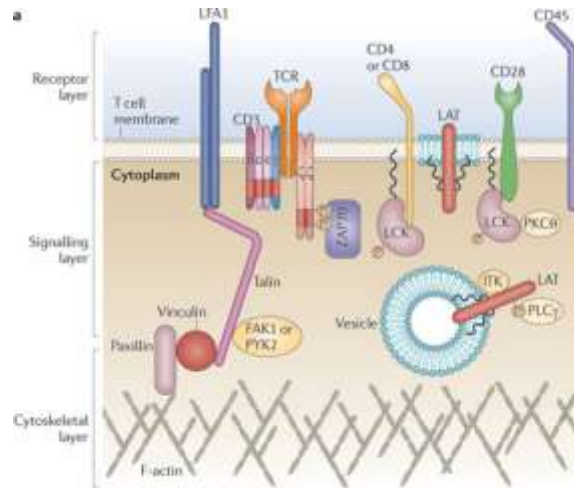
La phase réceptrice va impliquer le TCR, les molécules d'adhérences mais également les molécules de co-stimulation ou d'inhibition. Le TCR est impliqué dans la reconnaissance spécifique des complexes CMH/peptide en lien avec son corécepteur CD8 ou CD4 [165]. Les molécules d'adhérences telles que CD2 et LFA-1 sont quant à elles impliquées dans le renforcement de l'activation T en maintenant le contact entre le lymphocyte T et la cellule cible qui exprime CD58 et ICAM-I. Les molécules de co-stimulation ou inhibitrices vont jouer un rôle important dans la régulation de l'activité T. Les molécules CD28 (stimulation) et CTLA-4 (inhibition) vont se lier à leurs récepteurs CD86 et CD80 respectivement [166]. Récemment, de nouvelles molécules inhibitrices ont été découvertes : Programmed cell Death Protein 1 (PD1) et T cell immunoglobulin mucin-3 (TIM-3). Des études récentes ont d'ailleurs mis en évidence l'importance de ces molécules dans l'inhibition de l'activité des TILs chez des patients atteints d'un cancer [167-168].

La seconde phase est une phase de signalisation dans laquelle le complexe TCR/CD3 se retrouve au centre. Le TCR est un récepteur composé de deux chaînes ( $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ ). Chacune des chaînes est composée de deux domaines immunoglobulines dont la partie la plus externe ( $V\alpha$  e  $V\beta$ ) porte des régions variables (CDR1 et CDR2) et une région hypervariable (CDR3). Ces régions résultent du réarrangement des gènes les codant lors de la maturation du lymphocyte T dans le thymus [169]. Des analyses de cristallographie de l'interaction TCR/CMH/peptide ont permis de mettre en évidence un contact entre peptide et régions hypervariables CDR3, conférant ainsi la spécificité de reconnaissance du TCR [170]. Les molécules CD4 et CD8 vont avoir un rôle de co-récepteur en se liant aux molécules du CMH et du TCR, stabilisant ainsi le complexe et permettant le rapprochement des molécules nécessaires pour transmettre le signal à l'intérieur de la cellule. Le TCR va ainsi se retrouver associé à plusieurs molécules CD3 responsables de la transduction du signal à l'intérieur de la cellule. Ces complexes CD3 sont constitués de deux hétérodimères  $\epsilon\delta$  et  $\epsilon\gamma$  ainsi que d'un homodimère  $\zeta\zeta$  [171]. La partie cytoplasmique des sous-unités du CD3 possède un motif immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM), ce motif est une séquence d'acides aminés (YXX (I/L) X (6-12) Yxx (I/L)).

Suite à l'activation T et la liaison du TCR à la molécule CD3, ces motifs ITAMs vont se retrouver phosphorylés par la kinase LCK (rapprochée du CD3 par la molécule CD8 ou CD4) notamment grâce à l'exclusion de la phosphatase CD45 (inhibant la phosphorylation des ITAMs mais dont l'action est nécessaire pour l'activation de la LCK en enlevant un groupement phosphate inhibant son activité). Ces motifs ITAMs phosphorylés vont alors interagir avec la protéine  $\zeta$ -chain-associated protein kinase of 70 kDa (ZAP70) et déclencher une cascade d'activation impliquant les protéines SLP76 et LAT qui vont venir activer la phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ). Une fois activée, cette protéine va augmenter le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et conduire à l'expression d'un certain nombre de gènes cibles comme l'IL-2. De leur côté, le TCR et la molécule d'adhérence CD28 vont conduire au recrutement de la protéine kinase C $\theta$  (PKC $\theta$ ), importante dans l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B.

Ces voies d'activation vont au final conduire au recrutement du complexe ESCRT (endosomal sorting complex required for transport protein) impliqué dans la déphosphorylation du TCR et la formation de la synapse immunologique qui s'organise autour d'une structure appelée le cluster d'activation supramoléculaire (SMAC) qui regroupe : le SMAC central (cSMAC) riche en TCR, le SMAC périphérique (pSMAC) riche en molécule LFA-1, et le SMAC distal (dSMAC) riche en actine et en protéine CD45. La formation de ce SMAC, les événements impliqués dans la cascade d'activation T et leur chronologie sont encore mal compris et plusieurs modèles d'activation sont proposés [164].

La dernière phase fait intervenir le cytosquelette qui est nécessaire dans la mise en place du SMAC. Cela passe par l'intermédiaire des filaments d'actine, de myosine II et de tubuline. La coordination de ces filaments va conduire à la polarisation de la cellule et à la formation de la synapse immunologique. Le TCR va se lier à des molécules telles que l'actine grâce à des protéines adaptatrices, protéines du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP). La formation de ce SMAC va permettre le regroupement des TCR au niveau des complexes CMHM/peptides spécifiques. Ceci va permettre l'activation d'un grand nombre de TCR à partir d'un faible nombre de complexe CMH/peptide spécifique. Les TCR vont être activés en série. On va alors parler du concept de « serial triggering » : Lorsqu'un TCR est activé, ce dernier est internalisé pour laisser la place à un autre TCR et ainsi poursuivre cette activation [172]. De plus, la polarisation provoquée par le réarrangement du cytosquelette permet le relargage des granules lytiques au niveau de la cible.



**Figure 10: Les trois phases de la synapse T**

Lors de l'activation de la cellule T, trois phases d'activation sont présentes. La première concerne la phase récepteur et contient le complexe TCR-CDR3, le co-récepteur CD4 ou CD8 et les molécules de co-activation CD28 et LFA1. La phase de signalisation, contient l'ensemble des molécules permettant la transmission du signal à l'intérieur de la cellule : LCK, ζ-chain-associated protein kinase of 70 kDa (ZAP70), IL-2-inducible T cell kinase (ITK), phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) et la protéine kinase C $\theta$  (PKC $\theta$ ). La dernière phase implique le cytosquelette et contient des protéines de ce dernier telles que : l'actine, Taline, paxilline, vinculine, FAK1 et PYK2. L'ensemble de ces acteurs participe à la formation de la synapse immunologique et à l'activation du lymphocyte T.

**Source:** Dustin and Depoil, New insights into the T cell synapse from single molecule techniques, 2011 [164]

## V) Les molécules de co-stimulation

Nous avons précédemment vu l'engagement du TCR dans l'activation du lymphocyte T effecteur. Cependant l'activation du lymphocyte T naïf lors de la première rencontre avec l'antigène nécessite donc un second signal. Ce second signal est apporté par les molécules de co-stimulation exprimées par la cellule présentatrice et intervient dans l'activation du lymphocyte T via leurs interactions avec les ligands exprimés à leur surface. Ces molécules de co-stimulation appartiennent principalement à la famille B7 composée de CD80, CD86, Programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1), PD-L2, PD-L1, ICOSL, CD276 et B7S1.

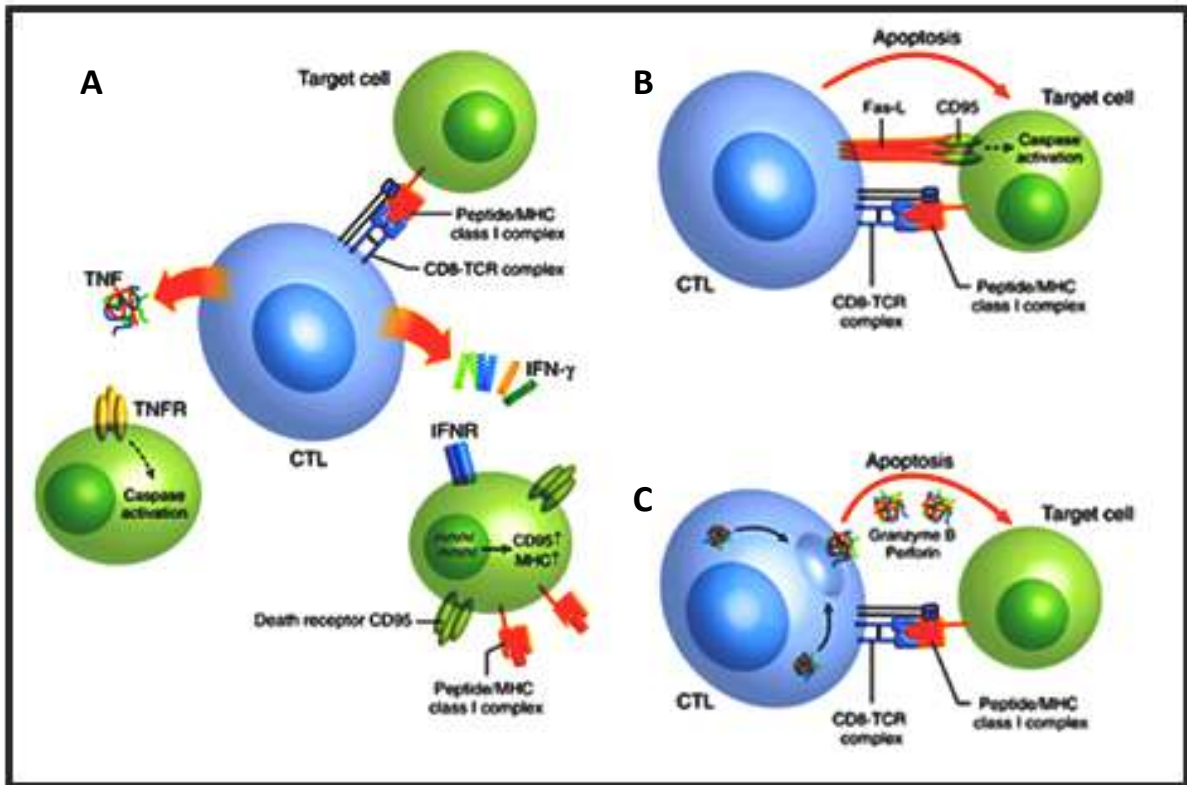
Les molécules de co-stimulation telles que CD80 et CD86 sont principalement retrouvées exprimées par les APC activées, au niveau des organes lymphoïdes secondaires, et vont reconnaître leur ligand CD28 exprimé par les lymphocytes T. L'interaction de ces molécules va apporter un signal d'activation secondaire nécessaire pour la première stimulation des lymphocytes T naïfs en prévenant notamment l'anergie ou l'apoptose du lymphocyte T. En effet, lors de la première stimulation, le contact entre un lymphocyte T et l'APC est très long, plus de 20 heures. Ceci permet la différenciation du lymphocyte T naïf en lymphocyte T effecteur.

Dans le cas d'une activation d'un lymphocyte T effecteur, ces molécules de co-stimulation ne sont plus nécessaires et l'activation se fait dans un temps plus court (1h) [173]. Dans cette famille B7, on retrouve également des molécules de co-stimulation inhibitrices telles que PDL1, PDL2 ou encore B7S1. Ce second signal d'activation n'est donc pas forcément activateur, il peut également être inhibiteur. Ce contrôle négatif du lymphocyte T va permettre d'éviter l'apparition de réponse T dirigée contre des auto-antigènes. C'est donc un moyen de contrôle de la différenciation des lymphocytes T. Cependant les cellules tumorales peuvent également exprimer ces molécules inhibitrices afin d'échapper à la lyse par des lymphocytes T spécifiques et favoriser la progression tumorale.

#### VI) L'effecteur T activé

Suite à leur activation, les lymphocytes T vont acquérir différentes fonctions : la cytotoxicité, la sécrétion de cytokines, la prolifération et la formation de lymphocytes mémoires.

La cytotoxicité des lymphocytes T implique deux voies différentes (figure 11) : la voie de la sécrétion de granules lytiques et la voie FAS-FAS-L [174]. Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques ou CTL sont celles qui possèdent cette activité lytique par dégranulation. Ces granules lytiques sont stockés dans le cytoplasme des CTL non activés et contiennent des protéines toxiques (perforine, granzyme, estérase...). Grâce aux réseaux de microtubules, ces particules lytiques vont arriver sur le site de dégranulation. Les molécules de perforine relarguées vont polymériser et former des pores dans la membrane cellulaire de la cible, déstabilisant l'homéostasie intra-cellulaire et favorisant l'entrée des autres molécules telles que les granzymes A et B qui vont activer des caspases. L'ensemble de ces événements conduit à la mort de la cellule cible [175]. La médiation de la mort cellulaire dépendante de FAS-FAS-L, fait quant à elle intervenir les lymphocytes T CD4+ via l'interaction de la molécule FAS-L, présente à la surface des lymphocytes T activés avec son récepteur FAS qui lui est exprimé par la cellule cible. Cette interaction va conduire au déclenchement d'une mort cellulaire par apoptose et est donc particulièrement efficace chez les cellules tumorales exprimant FAS [176]. FAS-FAS-L interviendrait aussi dans la résolution de la réponse immunitaire afin de réguler l'homéostasie lymphocytaire.



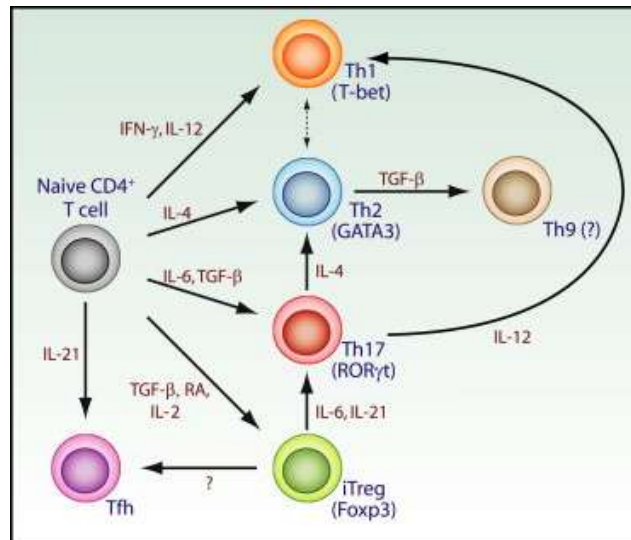
**Figure 11: Mécanismes d'induction de mort cellulaire par le lymphocyte T**

Le lymphocyte T est une cellule spécialisée dans l'induction de mort cellulaire. Cette induction peut être réalisée de plusieurs façons : A) induction indirecte par relargage de TNF $\alpha$  et TRAIL, B) induction par les récepteurs de mort cellulaire, C) induction directe par relargage au niveau de la synapse immunologique de granzyme B et de perforine.

**Source:** Andersen et al, Cytotoxique T cells, 2006 [177]

La seconde fonctionnalité des lymphocytes T est leur capacité de sécrétion. Les CTL CD8+ activés vont sécréter de l'IFN- $\gamma$  mais aussi du TNF- $\alpha$  et d'autres cytokines. Ces molécules vont avoir pour rôle de sensibiliser les cellules à la mort cellulaire, mais également d'orienter la réponse immunitaire. Il existe en effet plusieurs sous-ensembles de lymphocytes T CD8+, caractérisés par leur profil d'expression de cytokines (Tc1, Tc2, Tc17) [178]. C'est la population de lymphocytes T CD4+ qui est la plus spécialisée dans la sécrétion de cytokines. En fonction de son contexte d'activation, plusieurs profils de sécrétion définissant différents sous-ensembles de lymphocytes T CD4+ sont décrits (figure 12). Les T CD4+ TH1 produisent des cytokines orientant la réponse immunitaire vers une réponse cellulaire (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF..). Les lymphocytes T CD4+ TH2 vont quant à eux orienter la réponse vers une réponse humorale (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13). On retrouve également les Th17, principalement impliqués dans les réponses inflammatoires et les Tregs impliqués dans des mécanismes de modulation de la réponse T, notamment par la sécrétion de cytokines telles que l'IL-10, IL-6, ou

encore le TGF- $\beta$ . En plus de ces populations lymphocytaires, il existe un certain nombre d'autres populations T CD4<sup>+</sup> : les T follicular helper (Tfh) impliqués dans la formation des centres germinaux [179], mais aussi les Th0 capables d'exprimer un large éventail de cytokines [180-181]. De plus, il semblerait qu'il existe une certaine plasticité entre ces différents sous-ensembles, impliquant des mécanismes épigénétiques [182].



**Figure 12 : Voie de différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

Le lymphocyte T CD4 naif peut se différencier en Th1, Th2, Th17, iTreg, et Tfh en fonction des cytokines présentes dans le microenvironnement. Par exemple, la présence d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  va favoriser la différenciation en Th1, alors que la présence d'IL-4 est en faveur d'une différenciation en Th2. Chacun des différents effecteurs T CD4<sup>+</sup> est également caractérisé par l'expression spécifique d'un facteur de transcription comme T-bet pour la voie Th1 et Gata3 pour la voie Th2. Il apparaît également qu'il existe une certaine plasticité permettant à un effecteur de se convertir vers un autre phénotype. Les iTregs et les Th17 par exemple, peuvent se convertir de l'un vers l'autre en fonction des cytokines présentes dans l'environnement.

Source : Zhou et al, Plasticity of CD4<sup>+</sup> T cell lineage differentiation, 2009 [183]

Une troisième fonction des lymphocytes activés est leur capacité de prolifération permettant l'expansion clonale. Afin que cette prolifération soit optimale, des signaux supplémentaires portés par les cytokines ou les molécules de co-stimulation ainsi que l'expression du récepteur à l'IL-2, sont nécessaires aux lymphocytes T. La cytokine IL-2 est d'ailleurs utilisée *in vitro* pour obtenir de grandes quantités de lymphocytes.

La quatrième fonction est de former des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires après que la source d'antigènes ait disparu. En fin de réponse immunitaire, les lymphocytes T effecteurs vont mourir. Un petit nombre va survivre et former deux types de lymphocytes T mémoires :



-Les lymphocytes T mémoires périphériques CCR7-, qui vont patrouiller en périphérie à la recherche de l'antigène cible.

-Les lymphocytes T mémoires centraux CCR7+ qui résident dans les ganglions lymphatiques et qui ont une grande capacité d'expansion en cas de retour de l'antigène.

## VII) Les antigènes de tumeur

Depuis la découverte du premier antigène de tumeur, de nombreuses équipes de recherche ont mis au point des techniques pour identifier ces antigènes de tumeur. Cette recherche est primordiale dans l'établissement de stratégies d'immunothérapie, puisqu'elle définit des cibles. Ces techniques ont permis de mettre en évidence plusieurs catégories d'antigènes.

### A. Les méthodes d'identification d'antigènes de tumeur et de leurs épitopes

Notre corps compte quelques 30 000 protéines et rechercher lesquelles sont des antigènes de tumeur potentiels n'est pas forcément évident, surtout que certains antigènes sont issus de mutations, de réarrangements chromosomiques ou de réexpressions ou surexpressions de protéines dans un tissu inapproprié. Différentes techniques ont donc été mises au point afin d'identifier ces antigènes de tumeur. Ces méthodes diffèrent en fonction que l'on cherche à identifier un antigène inconnu à partir d'une population T réactive ou que l'on parte d'un antigène candidat.

La première approche développée est dite « génétique ». A partir d'un clone de lymphocyte T ou d'une population T polyclonale réactive vis-à-vis de la cellule tumorale, la spécificité pour l'antigène est testée par l'observation de production de cytokines par le lymphocyte T en réponse à une cellule cible. Cette cellule cible est co-transfectée avec la molécule HLA d'intérêt et une banque d'ADN complémentaire (ADNc) dérivée des cellules tumorales autologues reconnues. Cette approche a été décrite par l'équipe de T. Boon en 1991 et a permis la caractérisation de l'antigène MAGE-1 [143], mais aussi de ceux de la famille MAGE, BAGE, GAGE, des antigènes Melan-A/MART-1, tyrosinase et gp100. Cette technique se déroule en quatre étapes : 1) Obtention à partir d'un patient atteint d'une tumeur d'un clone T ou d'une lignée de CTL qui reconnaît de façon spécifique la lignée tumorale autologue 2) Définition de la restriction HLA de cette reconnaissance 3) Identification du gène reconnu par clonage d'une banque d'ADNc à partir des cellules tumorales autologues (utilisation de pools d'ADNc et subdivision de ces pools en fonction de la réponse du clone T, jusqu'à identification d'un gène unique reconnu) 4) Identification de la protéine et définition de l'épitope reconnu.

La seconde approche est dite « biochimique ». Les peptides présents sur les molécules HLA d'intérêts sont élués et sont purifiés par chromatographie de haute affinité. La réactivité des clones est ensuite testée vis-à-vis de ces peptides. Le peptide induisant une réaction du clone lymphocytaire est ensuite identifié par spectrométrie de masse et le gène peut ensuite être identifié. C'est de cette façon que certains épitopes de l'antigène gp100 et BAGE ont été identifiés dans le mélanome et d'autres cancers [184-185].

Les deux précédentes approches nécessitent l'obtention de CTL. L'approche SEREX (SErological identification of antigens by Recombinant EXpression cloning), quant à elle ne nécessite pas de CTL. Cette approche est basée sur la présence d'anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux dans le sérum de patients et permet donc d'identifier des antigènes dépendants des lymphocytes B mais aussi des lymphocytes T CD4+, qui sont importants dans la commutation isotypique du lymphocyte B. Cette technique (appelée SEREX) a permis de mettre en évidence des antigènes reconnus par des anticorps tels que New York esophageal squamous cell carcinoma 1 (NY-ESO-1), MAGE-1, MAGE-3 et plus récemment ANX-A2 dans le MPM [186-188].

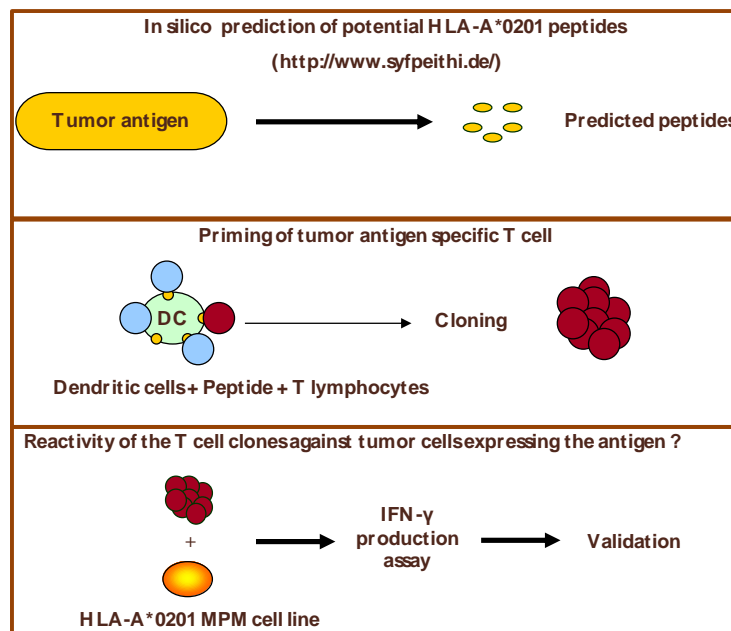
L'ensemble de ces approches nécessite donc l'utilisation d'échantillon de patients et nécessite la présence de réponses T spontanées chez ces derniers. Cependant, les techniques de séquençage haut débit et les études de puces à ADN ont permis de mettre en évidence la présence de protéines surexprimées, anormales ou dont l'expression se retrouve induite. Ces techniques ont mis en évidence l'existence d'antigènes potentiels ou candidats. Une méthode dite « d'immunologie inverse » a donc été mise au point afin de tester ces antigènes candidats (figure 13). Cette approche est basée sur une étude préalable *in silico*.

A partir de la séquence peptidique et suite à la découverte des sites de liaisons spécifiques des peptides aux molécules HLA, des algorithmes ont été mis au point prédisant la capacité de fixation de ces peptides aux molécules HLA, c'est ce que l'on appelle la phase de prédiction. Actuellement, il existe un grand nombre d'algorithmes de prédiction, tels que SYFPEITHI [189] ou BIMAS [190]. Cependant, il est vite apparu que la prédiction d'ancrage du peptide n'était pas suffisante et qu'il était également nécessaire d'intégrer des prédictions de clivage par le protéasome, tels que FragPredict/MAPP [191]. Ces algorithmes permettent d'affiner la recherche d'épitope et d'éviter d'étudier un épitope pouvant effectivement se fixer sur les molécules HLA, mais n'étant jamais produit par la cellule comme cela fut le cas pour le peptide HER-2/neu(369-377)/HLA-A\*0201 [192] et le peptide MAGE-3(271-279)/HLA-A\*0201 [193].

Après la phase *in silico* de prédiction, il faut ensuite passer à une phase de validation qui peut se faire de deux façons différentes :

-Vérification par spectrométrie de masse. Cette approche reprend le principe de la méthode biochimique, à savoir l'élution de peptides présents dans les molécules CMH des cellules exprimant l'antigène d'intérêt et la recherche du ou des peptides prédits. Cependant, cette méthode valide la présentation de ces peptides par les molécules de CMH de la cellule cible mais pas leur capacité à être reconnus par des lymphocytes T.

-La vérification par des clones T. Cette seconde approche est plus coûteuse en temps, elle consiste à sensibiliser une population de lymphocytes T (donneur sain ou TIL de patients) avec le peptide candidat chargé de façon exogène sur une cellule présentatrice d'antigènes. Lorsqu'une population de CTL spécifique du peptide est obtenue (clonale ou polyclonale), elle est ensuite testée vis-à-vis d'une cellule cible exprimant l'antigène et l'allèle HLA restreignant, afin de vérifier sa spécificité.



**Figure 13: Validation d'épitopes tumoraux par immunologie inverse**

L'approche d'immunologie dite inverse se définit en trois étapes. A) A partir d'un antigène candidat, dont la séquence peptidique est connue, des algorithmes permettent de prédire des peptides pouvant se fixer dans un contexte HLA donné. B) A partir de ces peptides une population de lymphocytes T CD8+ est sensibilisée par des cellules dendritiques autologues chargées en peptides. Après plusieurs stimulations successives, la présence d'une population T CD8+ spécifique du peptide est testée. Les clones réactifs sont ensuite isolés par clonage en dilution limite, puis amplifiés. C) Afin de vérifier que les cellules tumorales présentent cet épitope, la réactivité du clone dirigée contre des cellules tumorales exprimant l'antigène d'intérêt et la molécule HLA donnée est alors observée. Ce test consiste en l'observation de la production d'IFN-γ par le clone lorsque ce dernier est cultivé avec les cellules tumorales. La présentation de l'épitope par les cellules tumorales est ainsi validée.

Source : Roulois David

## B. Classification des antigènes de tumeur

Face à la diversité des antigènes de tumeur, de leur profil d'expression et de leur origine, ces antigènes de tumeur ont été classés en différentes catégories. Les épitopes et les contextes HLA dans lesquels ils sont décrits sont listés dans une base de données présente à cette adresse ([www.cancerimmunity.org](http://www.cancerimmunity.org)).

### 1. Antigènes de tumeur uniques

Ces antigènes de tumeur uniques résultent de mutations qui dans la majorité des cas ne sont pas partagées. Ces antigènes sont donc patient spécifique. L'utilisation de ces antigènes en thérapie n'est donc pas ou peu possible. Un tel antigène a été décrit pour la première fois pour melanoma-associated-mutated antigen-1 (MUM1) dans le mélanome [194] et d'autres exemples sont listés dans cette revue [195]. Cependant, il existe également certaines mutations partagées par plusieurs patients comme par exemple la mutation N-RAS Q 61 R [196].

### 2. Les antigènes spécifiques de tumeur

Ces antigènes sont partagés par plusieurs types tumoraux. Leur expression est restreinte aux cellules tumorales et elle n'est pas retrouvée dans les tissus sains adjacents. L'expression de ces antigènes, limitée aux cellules tumorales, en fait des cibles de choix en immunothérapie.

Parmi cette catégorie on retrouve les *Cancer Testis Antigen* (CTA), des antigènes dont l'expression est restreinte aux testicules et au placenta et qui se retrouvent réexprimés dans de nombreux types de tumeurs [197]. Les cellules germinales testiculaires sont protégées du SI par la barrière hémato-testiculaire. Ces antigènes ne sont donc pas présentés dans des conditions normales au système immunitaire. Leur expression par les cellules tumorales rend donc ces dernières visibles par le système immunitaire. Des réponses T et B spécifiques dirigées contre ces antigènes peuvent donc apparaître spontanément chez les patients, d'où leur intérêt dans le développement d'un certain nombre d'approches immuno-thérapeutiques [198]. Ces gènes sont réprimés par méthylation [199], donc l'utilisation de drogues épigénétiques est largement étudiée pour induire leur réexpression et sera abordée plus loin. Dans cette catégorie on retrouve des familles de gènes, telles que MAGE, BAGE, RAGE, XAGE, mais aussi NY-ESO-1 [198].

Il existe d'autres familles d'antigènes appartenant à cette catégorie : ce sont les onco-protéines virales comme HPV16 E6 et E7 [200], mais aussi des antigènes produits suite à des mutations

spécifiques à certains types tumoraux, comme la protéine de fusion BCR-ABL, résultant d'une translocation chromosomique [201].

### 3. Les antigènes de surexpression

Les antigènes de surexpression sont des protéines qui ne sont pas spécifiques des tumeurs mais qui se retrouvent surexprimées dans les tumeurs. L'intérêt de ces antigènes est qu'ils sont exprimés dans un plus grand nombre de cancers, ce qui en fait des cibles intéressantes. Dans cette famille on retrouve des antigènes comme hTERT, la Survivine, PRAME, mais aussi le CEA ou MUC1. Une liste plus importante est décrite sur le site suivant : <http://www.cancerimmunity.org> . La protéine MUC1 est d'ailleurs un antigène du MPM et sera décrite plus largement dans une partie lui étant consacrée.

### 4. Les antigènes de différenciation

Ces antigènes de tumeur sont exprimés à la fois dans la tumeur mais également dans le tissu sain d'origine. On retrouve dans cette catégorie un certain nombre d'antigènes du mélanome dénommés antigènes de différenciation mélanocytaire (MART-1/MELAN-A, gp100, tyrosinase, TRP2), mais aussi des antigènes de la prostate (PSA, kallikrein 4) ou encore la molécule CD20 dans les lymphomes à cellules B.

## VIII) Mécanisme d'échappement au système immunitaire

La théorie de l'immuno-édition des cancers suppose que lors de l'établissement de ces derniers, ceux-ci échappent au système immunitaire. Ces mécanismes d'échappement de la tumeur vis-à-vis du système immunitaire sont une clé importante dans la réalisation de protocole d'immunothérapie. En effet, comprendre par quel moyen la tumeur échappe au système immunitaire peut apporter des réponses sur les éléments importants à cibler en immunothérapie, pour parvenir à une phase d'élimination des cellules tumorales.

Une des cellules clé dans l'élimination des cellules tumorales est le lymphocyte T, qu'il soit CD8+ ou CD4+. C'est ainsi que les tumeurs ont développé un certain nombre de mécanismes de résistance, et d'échappement à ces cellules effectrices [202].

### A. Défaut de reconnaissance

Le premier mécanisme impliqué dans l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire est un défaut de reconnaissance de ces cellules tumorales par les lymphocytes T spécifiques. Ce défaut de reconnaissance peut résulter en premier lieu, de la perte d'expression de

l'antigène par les cellules tumorales [203]. Les cellules tumorales peuvent aussi présenter des mutations ou des anomalies dans la machinerie de présentation des antigènes, les rendant alors invisibles aux lymphocytes T. Pour cela, les cellules tumorales vont diminuer voire perdre complètement l'expression des molécules HLA de classe I. Cela se retrouve dans un grand nombre de cancers : poumons, œsophage, prostate [204-206]. On observe également des mutations, soit des molécules HLA de classe I [207-208], soit de l'ensemble des protéines impliquées dans le chargement des peptides et donc nécessaire à la présentation antigénique, telle que la  $\beta 2m$  [209], mais aussi par exemple une inhibition des molécules TAP1 et TAP2 [210]. Un autre mécanisme de résistance consiste également à empêcher l'accès des lymphocytes au site tumoral en supprimant les molécules d'adhésion importantes pour l'extravasation des lymphocytes de la circulation sanguine vers la tumeur. Cela a été décrit par exemple dans le mélanome [211]. Parmi ces molécules on retrouve l'E-selectine, la P-selectine mais aussi ICAM-1 [212].

#### B. Résistance à la mort induite par le lymphocyte T

Les cellules tumorales développent également des mécanismes de résistance à la mort cellulaire médiée par les lymphocytes T. Ces mécanismes impliquent la production de protéines comme la PI-9/SPI-6, une sérine protéase inhibitrice du granzyme B [213]. Les cellules tumorales vont également surexprimer un certain nombre de protéines anti-apoptotiques comme c-FLIPE, ce qui leur permet ensuite de résister à l'apoptose dépendante de TRAIL [214]. Une autre approche d'évasion à la lyse par les lymphocytes T consiste en une expression des récepteurs leurres de mort. Ces récepteurs leurres vont alors empêcher l'action des molécules TRAIL et FAS ou du TNF- $\alpha$  sur les cellules tumorales. Les cellules peuvent également perdre l'expression de ces mêmes récepteurs, empêchant ainsi l'action des molécules pro-apoptotiques [215-216].

#### C. Inactivation des lymphocytes T par anergie

Les cellules tumorales peuvent également empêcher l'activation des lymphocytes T matures en induisant leur anergie, notamment par l'expression des co-récepteurs CTLA-4 et PD1. Nous avons déjà vu l'importance de ces co-récepteurs dans l'activation T, les ligands de CTLA-4 et PD1 sont souvent retrouvés surexprimés par les cellules tumorales [217]. L'expression d'un certain nombre de cytokines est également impliquée dans l'inhibition de l'activité des lymphocytes T, telles que le TGF- $\beta$  [218], le PGE2 [219] ou encore des protéines de la famille des galectines, telles que la galectine-1, molécule immunosuppressive bloquant les fonctions des lymphocytes T [220].

#### D. Autres mécanismes

Les cellules tumorales sont également capables d'induire la mort des lymphocytes T par l'activation de façon précoce du programme de mort cellulaire AICD (program T-cell activation-induced cell death). Cette activation passe par l'expression à la surface des cellules tumorales des molécules FAS-L et TRAIL [221-222].

En plus de ces mécanismes d'échappement touchant les lymphocytes T, les cellules tumorales peuvent sécréter des chimiokines, comme CCL2, qui attirent des populations cellulaires impliquées dans l'inhibition de l'activation du système immunitaire. C'est le cas des TAM de type M2 [223], des lymphocytes T régulateurs [224] et des MDSC [225] qui, ensemble, vont favoriser l'échappement de la tumeur au contrôle par le système immunitaire.

#### E. Mécanisme d'échappement tumoral dans le MPM

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à la réponse T spécifique dirigée contre le MPM. En effet, il est important de savoir quels mécanismes d'échappement existent dans cette pathologie.

Tout d'abord le MPM apparaît comme un cancer très peu immunogène avec seulement quelques cas de rémissions spontanées décrits dans la littérature [78]. Concernant les populations cellulaires immunosuppressives, on retrouve la présence de lymphocytes Treg dans le MPM, cependant la corrélation avec un pronostic défavorable est difficilement établie [82]. On retrouve également des TAM de type M2, associés à une faible présentation antigénique et des propriétés immunosuppressives [226]. Au niveau des cytokines immunosuppressives, on observe également une large production de PGE2 [227], mais aussi de TGF- $\beta$  [228]. En plus de cet environnement immunosuppresseur empêchant l'établissement d'une réponse immunitaire T, les cellules de MPM sont résistantes à l'apoptose, notamment par la perte d'expression de molécules pro-apoptotiques, mais aussi par l'expression de molécules anti-apoptotiques ou inhibitrices de l'apoptose. Le MPM présente donc un contexte immuno-modulateur fort. L'utilisation des drogues épigénétiques pourrait être un moyen de renverser ce contexte.

## INTRODUCTION 2 : Epigénétique et cancer

### 1) A l'origine de l'épigénétique

Au cours du développement cellulaire, les cellules de l'organisme vont acquérir une morphologie, une fonction, un phénotype qui leur est propre et ce, malgré un patrimoine génétique identique. Ces modifications vont également être conservées au cours des cycles cellulaires et sont donc transmissibles. Cela suggère la présence d'une mémoire de l'identité cellulaire, d'une signature permettant à la cellule de savoir ce qu'elle doit ou ce qu'elle ne doit pas exprimer en fonction de son rôle et de l'environnement dans lequel elle se trouve. De plus, l'ADN n'est pas suffisant à lui seul pour rendre compte de la diversité biologique, supposant l'existence d'un autre support d'information. C'est en 1942 que Waddington proposa le terme d'épigénétique, sur la base d'une diversité biologique non attribuable à la séquence d'ADN [229]. L'épigénétique est défini comme les modifications de l'ADN ou des facteurs qui lui sont associés, portant une information et pouvant être hérités sans toutefois toucher la séquence d'ADN elle-même [230]. L'épigénétique peut se subdiviser en deux grands mécanismes : les modifications des histones et la méthylation de l'ADN

-Les modifications post-traductionnelles des histones : ces modifications comprennent les modifications post-traductionnelles (acétylation, méthylation, phosphorylation, sumoylation...) pouvant intervenir sur les histones, notamment sur une partie spécifique appelée queue d'histone (mais pas uniquement). Ces modifications sont impliquées dans la régulation de l'ADN (figure 14). Elles sont héréditaires d'une génération cellulaire à une autre et sont parfois en lien avec la méthylation de l'ADN.

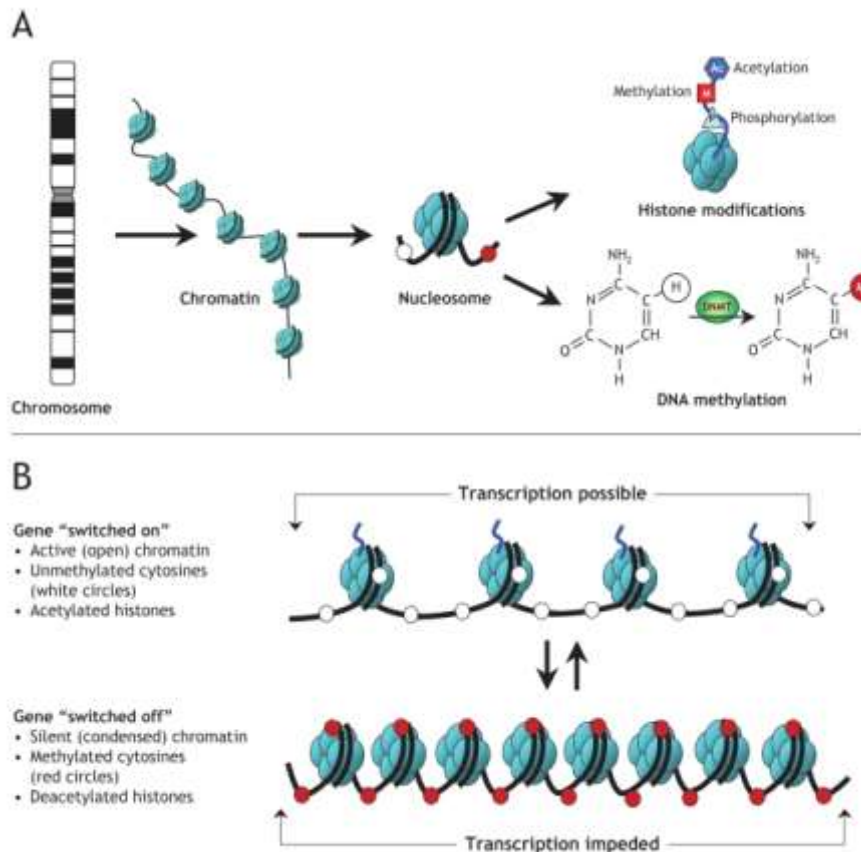
-La méthylation de l'ADN : ces modifications consistent en la méthylation des cytosines par l'addition d'un groupement méthyle (-CH<sub>3</sub>). Ce groupement est transféré à partir d'un donneur de méthylation : le S'-adénylméthionine (SAM). Ces méthylations ont lieu au niveau des dinucléotides CpG (une Cytosine précédant une Guanine). On retrouve dans le génome, des régions riches en CpG appelées îlots CpG. Ces méthylations vont avoir une implication majeure dans la régulation génique et la répression des éléments répétés ainsi que des transposons présents dans le génome (figure 14). L'empreinte génomique ou parentale, qui consiste en l'inactivation d'un allèle parental spécifique est un exemple d'implication de la méthylation de l'ADN dans la régulation génique.

En dehors de ces deux grands mécanismes, il existe d'autres mécanismes de régulation épigénétique, comme le remodelage de la chromatine, les variants d'histones H3.3 et H2A.Z, mais aussi des ARN non codants (miRNA et les long non coding RNAs ; lncRNAs) comme l'ARN



complémentaire Xist impliqué dans l'inactivation du chromosome X. Un dernier mécanisme encore peut étudier consiste en la méthylation de l'ARN.

Ces mécanismes épigénétiques sont importants tout au long de notre vie, ils vont être impliqués dans la gamétogénèse, mais aussi tout au long du développement embryonnaire, dans un certain nombre de maladies psychiatriques [231], dans le vieillissement cellulaire [232] et le cancer [233].



**Figure 14: Contrôle de la transcription par méthylation de l'ADN ou modifications des histones**

A) La chromatine est une structure composée d'ADN et de protéines. L'ADN double brin est enroulé autour des octamères d'histones, l'ensemble formant alors les nucléosomes, unités organisant la chromatine. Des modifications dites épigénétiques, ne touchant pas la séquence en nucléotides, mais impliquées dans la régulation de la structure de la chromatine ainsi que dans la régulation de l'expression génique, peuvent alors intervenir sur cette chromatine. On retrouve deux grands types de modifications épigénétiques : les modifications post-traductionnelles (méthylation, acétylation, phosphorylation) et réversibles des histones ainsi que la méthylation de l'ADN (sur le carbone 5 des résidus cytosines placés devant une guanine). Cette réaction est catalysée par les DNMTs. B) Changements réversibles de la chromatine impliqués dans le contrôle de l'expression génique. Les gènes sont exprimés lorsque la chromatine est ouverte et inactivée. Lorsque la chromatine est condensée, l'expression des gènes est réprimée.

Cercle blanc = cytosines non méthylées; Cercle rouge = cytosines méthylées

Source: Luong P, Basic Principles of Genetics, 2009 <http://cnx.org/content/m26565/1.1/>

## A. La méthylation de l'ADN

Comme dit précédemment, la méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement méthyle (-CH<sub>3</sub>) à la place d'un atome d'hydrogène sur le carbone 5 des cytosines de l'ADN (figure 14). Cependant, cet ajout ne se fait pas n'importe où sur le génome. Il a lieu au niveau des dinucléotides CpG (cytosine-phosphate-guanine) [234]. Environ 60 à 90% des CpG se retrouvent ainsi méthylés dans le génome et sont associés à un état important de compaction de la chromatine (hétérochromatine). Ces zones contiennent principalement des éléments non codants, des éléments répétés ou microsatellites, mais aussi des transposons [235]. On retrouve également des régions riches en CpG, appelées îlots CpG, se situant principalement au niveau des promoteurs des gènes et impliquées dans leur régulation [236-237]. De plus, la méthylation d'un seul site CpG peut être impliquée dans la régulation génique. Par exemple, cette méthylation peut empêcher l'action d'activateur de la transcription, comme c'est le cas pour la fixation du facteur SP1 [238]. Mais elle peut aussi favoriser la fixation de protéines inhibitrices comme les MBP (Methyl CpG Binding Protein). Ces protéines sont capables de reconnaître les îlots CpG méthylés et vont ainsi pouvoir venir se fixer et empêcher la transcription du gène cible. Le membre fondateur de cette famille est la protéine MECP2, un répresseur des gènes neuronaux [239].

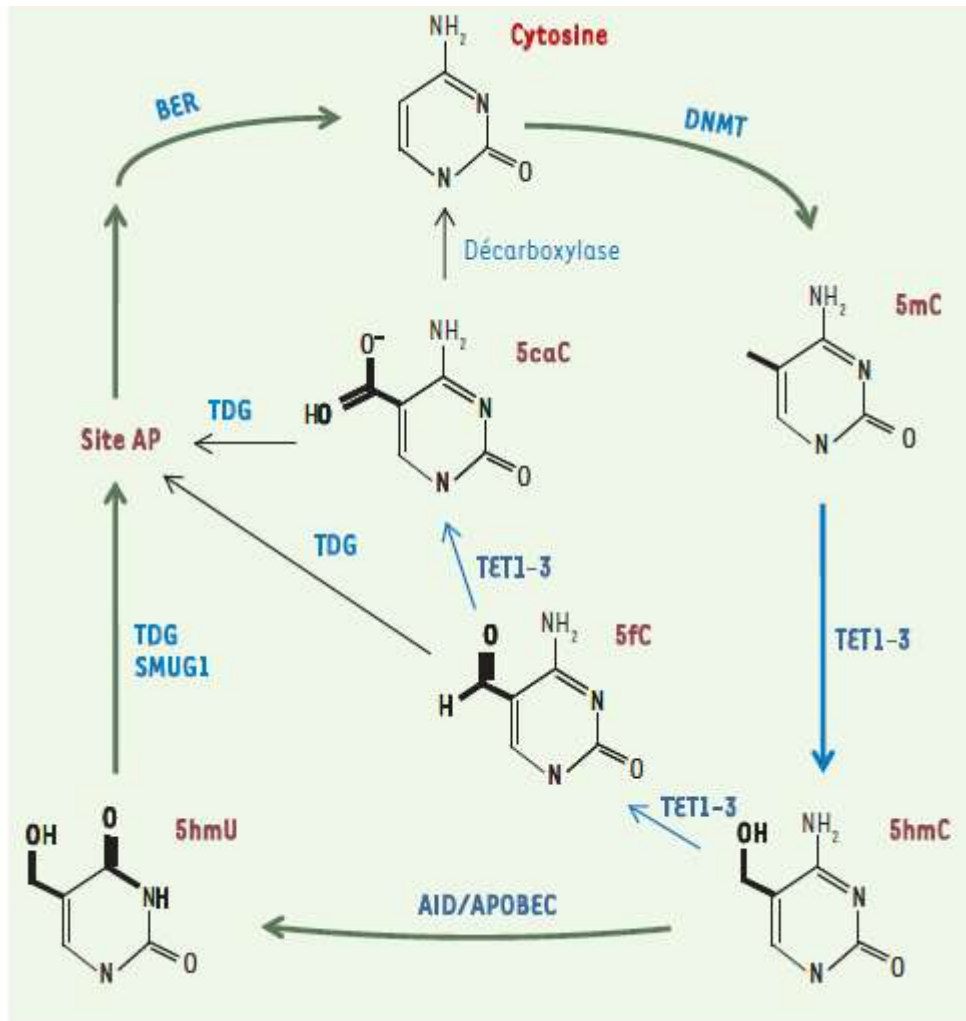
La méthylation de l'ADN est donc un mécanisme important dans la régulation génique. Ce transfert de méthylation est assuré par un ensemble d'enzymes, les DNA méthyles transférase ou DNMTs, et leur substrat SAM. Les mécanismes de ciblage de ces méthylations sur l'ADN ne sont pas encore parfaitement bien compris. La méthylation dite *de novo* implique la DNMT3A et DNMT3B [240]. La DNMT1 serait quant à elle impliquée dans la maintenance de la méthylation au cours des cycles cellulaires [241]. Pour cela, un complexe contenant cette DNMT1 reconnaît l'ADN hémiméthylé durant la réplication de l'ADN et ainsi peut conserver les méthylations au cours du cycle cellulaire. En plus de ces trois enzymes, il existe deux autres DNMT : la DNMT3L et la DNMT2. La DNMT3L est tronquée et ne possède pas d'activité catalytique propre. En se liant à l'ADN, elle est capable de recruter la DNMT3a et est impliquée dans les mécanismes d'empreinte parentale. La séquence de la DNMT2 est très conservée lors de l'évolution des organismes, cependant son rôle fait encore débat. Elle pourrait être impliquée dans l'inactivation des transposons et la réponse au stress cellulaire lors d'une infection virale [242].

Cette méthylation de l'ADN a très longtemps été considérée comme étant irréversible et l'existence de déméthylases ou de mécanismes de déméthylation a longtemps été débattue. Il existe actuellement plusieurs mécanismes impliqués dans la méthylation, actifs ou passifs :

-La déméthylation passive de l'ADN consiste en l'absence de la maintenance de la méthylation au cours des divisions cellulaires et ne nécessite donc pas d'enzymes spécifiques ou de complexe particulier.

-La déméthylation active (figure 15) est beaucoup plus controversée. Elle suggère la présence de déméthylases. Cependant cette déméthylation active semble nécessaire pour certains phénomènes de régulation comme l'activation des lymphocytes T [243] ou encore la régulation de la transcription. En effet, une étude *in vitro* a permis de mettre en évidence des cycles de méthylation/déméthylation de gènes cibles du  $\beta$ -oestradiol [244]. Cependant, les mécanismes permettant de réaliser cette déméthylation rapide ne sont pas encore clairement élucidés. Des travaux ont proposé l'intervention du système Base Exision Repair (BER) dans la déméthylation active de l'ADN, impliquant la thymine DNA glycosylase (TDG) et la MBD4. Cette déméthylation se fait alors soit sans changer la nature de la 5-méthylcytosine (5mC) [245], soit en convertissant la 5mC en un substrat plus favorable. La génération des immunoglobulines fait d'ailleurs intervenir ce mécanisme nommé l'AID (activation-induced deaminase) où la déamination de la 5mC en thymidine génère un mismatch G:T pouvant être réparé par le système BER [246]. Un second mécanisme décrit récemment consiste en l'oxydation de la 5mC en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmc). Cette réaction est catalysée par les protéines de la famille TET dont les membres sont numérotés de 1 à 3 (Ten Eleven Translocation) [247]. Ce 5hmc pourrait ensuite être déaminé en 5-hydroxyméthyluracile (5hmU), créant un mismatch 5hmU:G pouvant à son tour être reconnu par la TDG et ainsi être réparé [248]. L'ensemble de ces travaux montre donc l'implication de la TDG, de la protéine MBD4 et des protéines TET dans la déméthylation active du promoteur.

Cependant la méthylation de l'ADN n'est pas la seule modification épigénétique, il existe un autre niveau de régulation épigénétique qui est la modification post-traductionnelle des protéines histones.



**Figure 15: Mécanisme de déméthylation actif de l'ADN**

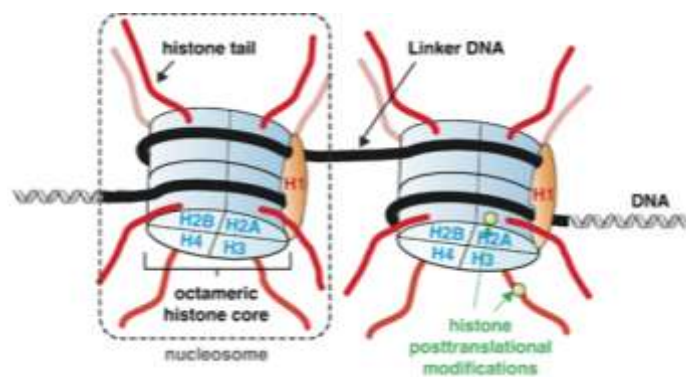
La 5hmC est produite à partir de la 5mC, elle-même catalysée par les DNMTs. Cette hydroxyméthylation est réalisée par les oxygénases de la famille TET. La 5hmC est ensuite déaminée par la famille de protéine AID, générant alors la 5hmU, qui est à son tour excisée par la TDG. Le système de réparation de l'ADN (BER pour Base Excision Repair) réintroduit alors une cytosine non méthylée. Un mécanisme alternatif existe également, où les 5hmC sont à leur tour oxydés en 5 formylcytosines et 5-carboxylcytosines, elle-mêmes directement reconnues par la TDG.

Source : Mercher T et al, In cauda venenum or the importance of TET2, 2011 [249]

## B. Les modifications d'histones

Les protéines histones sont impliquées dans la compaction de l'ADN et la régulation de l'expression des gènes. L'ADN est enroulé autour d'une structure protéique appelée nucléosome (figure 16). Ce nucléosome a été décrit pour la première fois dans les années 1970, suite à la digestion de l'ADN par des nucléases en fragments de 200 Pb [250]. Ces nucléosomes ont ensuite été visualisés grâce aux progrès de la microscopie [251-252], sous la forme d'une structure en collier de perles. Le nom de nucléosome fut alors proposé en 1975 par Pierre Chambon et sa structure décrite

par Kornberg [253-254] est composée d'une séquence d'ADN (180 à 200 pb) enroulée autour d'un cœur d'histone ou octamère d'histone 2X(H2A, H2B, H3, H4) associée à une histone de liaison, l'histone H1. Sans la présence de cette dernière histone on parle alors de particule cœur qui permet l'enroulement de 147 pb, c'est cette particule cœur qui est à l'origine de l'observation de la structure en collier de perles. C'est en 1965 que les histones composant le nucléosome furent identifiées [255]. Les histones possèdent un domaine globulaire, par lequel les interactions entre les différentes histones ont lieu. Ainsi, l'histone H2A et H2B s'associent ensemble, de même que les histones H3 et H4. Ces hétérodimères vont ensuite s'associer, formant un tétramère puis un octamère, structure finale du nucléosome. Les parties N-terminales de ces queues histones vont se situer à l'extérieur du complexe, tout comme les parties C-Termiales. Ces nucléosomes s'enroulent autour d'une séquence nucléotidique de 146 Pb. L'histone H1 est une histone permettant de lier les différents nucléosomes et joue un rôle dans la structuration de l'ADN.



**Figure 16: Structure du nucléosome**

Un nucléosome comprend entre 180 à 200 paires de bases enroulées autour d'un octamère d'histones et d'une histone de liaison. Cet octamère est constitué de 2X (H2A, H2B, H3, H4). L'histone H1 est une histone de liaison entre les différents nucléosomes et stabilise la structure de la chromatine. Chaque histone possède une queue d'histone sur laquelle la majorité des modifications post-traductionnelles ont lieu.

**Source :** Füllgrabe et al, Histone onco-modifications, 2011 [256]

Les modifications post-traductionnelles des histones peuvent aussi bien avoir lieu sur leur domaine globulaire que sur la queue N-terminale et C-Terminale. Ces modifications consistent en l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, la sumoylation et l'ubiquitinylation. L'ensemble de ces modifications est résumé dans le tableau 3 [257-262]. Il semble d'ailleurs que ces modifications ne changent pas l'état conformationnel des histones mais va modifier leurs interactions avec l'ADN et d'autres facteurs. Parmi ces modifications, l'acétylation et la méthylation sont fortement étudiées pour leur impact dans les cancers.

**Tableau 3: Principales modifications post-traductionnelles des histones et leurs fonctions associées**

Modifications	Résidus modifiés	Fonctions régulées
Acétylation	K-ac	Transcription, réparation
Méthylation (Lysines)	K-me1 K-me2 K-me3	Réplication, condensation
Méthylation (Arginines)	R-me1 R-me2	Transcription, réparation
Phosphorylation	S-pH TpH	Transcription, réparation, condensation
Ubiquitinylation	K-ub	Transcription, réparation
Sumoylation	K-su	Transcription
ADP-Ribosylation	E-ar	Transcription
Déimination	R> Cit	Transcription
Isomérisation de Prolines	P-cis> P-Trans	Transcription

Source : D'après Dawson M.A, Cancer epigenetics : from mechanism to therapy , 2012 [262]

### 1. Acétylation des histones

L'acétylation est une modification réversible des histones. Cette modification fait intervenir deux groupes d'enzymes, les histones acétyles transférases (HAT) et les histones déacétylases (HDAC). Deux conséquences résultent de l'acétylation des histones :

- La première, physico-chimique, va instaurer un changement de charge des histones. Ces dernières sont plutôt positives d'où leur affinité pour l'ADN chargé négativement. L'acétylation des histones va changer cet état positif. L'affinité des histones pour l'ADN va donc être plus faible. Un changement de l'état de compaction de la chromatine va avoir lieu, et sera associé à une activation de l'expression transcriptionnelle et une décompaction générale de l'ADN [263-265]. Dans ce processus, les HDAC, par leur action de déacétylation de l'ADN, vont plutôt être associées à une répression transcriptionnelle.

- Le second niveau de régulation de l'acétylation intervient dans la mise en place d'un code histone. En effet, il a été proposé que certaines acétylations d'histones sur des lysines spécifiques favorisent la liaison de protéines régulatrices et ainsi la transcription ou non des gènes cibles [266].

Cette reconnaissance spécifique des lysines acétylées peut se faire via la présence d'un bromodomaine, motif de 110 Acide Aminés (AA) se retrouvant sur les molécules HAT [267]. Les HAT sont classées en 4 familles : la superfamille des GNAT (GCN5 related N acétyltransférase), la superfamille MYST (MOZ, Ybf2, Sas3, Sas2 et Tip60), la famille CBP/p300 et la famille SRC [268-269]. Une nomenclature de ces familles a été réalisée par Allis et al, en 2007 [270].

Les HDAC sont classées en quatre classes. Les classes 1, 2,4 sont dépendantes du  $Zn^{2+}$  alors que la classe 3 celles des sirtuines est dépendante du NAD. La classe I regroupe les protéines homologues à Rpd3 (levure) et comprend les HDAC1, 2, 3 et 8 humaines qui sont uniquement nucléaires. La classe II contient les protéines homologues à Hda1 (levure) et comprend les HDAC4, 5, 6, 9 et 10 humaines, certaines étant nucléaires et d'autres cytoplasmiques. Les protéines homologues à Sir2 (levure) sont regroupées au sein de la classe III (Sirtuines 1 à 7 chez l'Homme). Enfin la classe IV et contenant l'HDAC11 est classée à part car elle possède à la fois des caractéristiques de classes I et II [271-272]. Cette classification est importante car un certain nombre d'inhibiteurs sur lesquels nous reviendrons plus tard sont plus ou moins spécifiques d'une certaine catégorie d'HDAC.

La balance HDAC/HAT est donc un mécanisme de régulation important de l'expression génique. Une chromatine acétylée est le plus souvent associée à une activation transcriptionnelle [273]. Cependant, la présence d'un code histone et la reconnaissance de marques d'acétylation particulières avec des co-facteurs ou co-inhibiteurs ajoutent une complexité supérieure à ces mécanismes de régulation. Il est également à noter que les HDAC et les HAT possèdent un grand nombre de substrats différents et les histones ne sont qu'un groupe de protéines ciblées par ces dernières [274-275]

## 2. Méthylation des histones

La méthylation des histones a lieu sur les lysines ou les arginines. Elle peut se faire par ajout d'un, deux ou trois groupements de méthylation (mono, di ou tri-méthyle) sur les lysines et un ou deux groupements sur les arginines. De plus, cette méthylation peut être asymétrique, ajoutant une complexité supplémentaire dans ce code histone. La méthylation des histones fait intervenir des histones méthyltransférases (HMT). Ces enzymes sont distinctes selon qu'elles méthylent les lysines

ou les arginines. La déméthylation va se faire via des histones déméthylases (HDM). Il existe un grand nombre de ces histones déméthylases qui ont été décrites récemment [256, 276].

Ces HMT et HDM sont spécifiques de certaines marques histones : par exemple, la déméthylase LSD1 va permettre uniquement la déméthylation de la lysine H3K9 et H3K4 mono- ou di-méthylée mais pas tri-méthylée [277]. Les mécanismes de méthylation des histones, contrairement à l'acétylation des histones, ne sont pas clairement associés à une activation ou une répression transcriptionnelle. Ainsi par exemple, les marques de méthylation H3K9me3, H3K27me3 et H4K20me3 sont associées à une répression de l'expression transcriptionnelle, contrairement aux marques H3K4me3 et H3K36me3 qui sont associées à une activation transcriptionnelle [256].

Comme pour les marques d'acétylation, il existe des domaines protéiques spécifiques reconnaissant des marques d'histones méthylées. Actuellement, quatre domaines ont été identifiés : le chromodomaine, le domaine WD40 et le domaine PHD sont impliqués dans la reconnaissance des lysines méthylées. Le domaine TUDOR reconnaît aussi bien les arginines que les lysines méthylées. Ces domaines vont permettre d'ajouter une complexité supplémentaire dans la régulation de l'expression génique : par exemple, le chromodomaine de la protéine HP1 va reconnaître les marques H3K9me3 et est associé à la fixation de protéines possédant une activité de désacétylation et de méthylation. L'ensemble permettant ainsi la propagation des marques H3K9me3 et donc la répression de la chromatine, comme cela a été démontré pour le gène CDKN2A [278].

## II) Epigénétique et cancers

Les modifications épigénétiques sont rapidement apparues comme étant un événement impliqué dans les cancers. Les cellules tumorales possèdent une signature épigénétique qui leur est propre, avec une dérégulation globale des mécanismes régulant les cellules saines [279]. De plus, ces mécanismes sont aussi bien présents dans l'initiation que dans le développement des cellules cancéreuses [280]. Ces modifications épigénétiques vont impliquer des phénomènes d'hypométhylation et d'hyperméthylation anormaux, mais également des modifications des histones et des facteurs les régulant. Le terme « d'épimutation » désigne ainsi l'inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs, la dérégulation des oncogènes et une certaine instabilité chromosomique.

La connaissance de ces mécanismes épigénétiques (méthylation de l'ADN, modification des histones) a conduit ces dernières années à une recherche accrue sur des molécules pouvant « restaurer » un état épigénétique normal de ces cellules.



### A. Les méthylation de l'ADN dans le cancer

C'est en 1983 que Feinberg et Vogelstein ont identifié pour la première fois l'implication de phénomènes épigénétiques dans le cancer. En effet, les auteurs observent une réduction globale de la méthylation dans les cellules cancéreuses du côlon, comparativement aux cellules saines [281]. Ces résultats ont ensuite été confirmés par Gama-Sosa et al, [282] qui a analysé de façon plus large la teneur en 5mc d'un panel de cellules tumorales et observé une réduction globale de la méthylation dans le cancer. Cette baisse de la méthylation dans le cancer conduit à plusieurs phénomènes. Tout d'abord, une activation d'un certain nombre de gènes notamment des oncogènes, mais aussi des gènes appartenant à la famille des CT (cancers testis) dans laquelle on retrouve les CTA [198]. Cette hypométhylation conduit également à une instabilité chromosomique. En effet, la déméthylation des séquences satellites favorise les cassures de l'ADN et les recombinaisons anormales. Cette hypométhylation et l'instabilité chromosomique associée vont également avoir un impact sur le phénomène de perte d'empreinte (LOI) et de perte d'hétérozygotie (LOH). A l'inverse de l'hypométhylation globale du génome et de son implication dans la tumorigénèse, on observe également dans les cancers des hyperméthylations localisées au niveau des promoteurs et responsables notamment de l'inhibition de l'expression d'un certain nombre de gènes tels que les TSG [283]. La première mise en évidence d'une hyperméthylation d'un promoteur associée à sa perte d'expression a été observée pour le gène RB avec l'hyperméthylation spécifique d'un allèle de cette protéine [284-285]. Suite à cela, un nombre important de TSG a été décrit comme étant réprimés par hyperméthylation dans différents cancers, tels que VHL, CDKN2A, BRCA1, RASSF1a. Ces TSG peuvent être impliqués dans différents processus cellulaires, tels que le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, ou encore les voies de transduction. On voit donc bien par ces exemples que la méthylation de l'ADN apparaît comme un moyen supplémentaire de neutraliser ou d'activer des gènes impliqués dans le processus de transformation tumorale, et cela sans apparition de mutations sur la séquence nucléotidique. Basée sur ces résultats, la question de l'implication de l'épigénétique dans les processus tumoraux en tant que cause ou conséquence se pose donc et reste encore assez controversée actuellement.

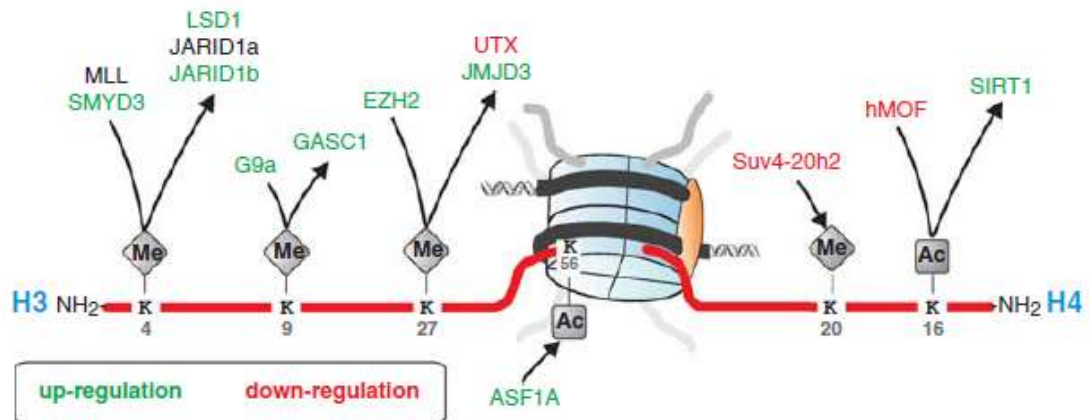
### B. Les modifications d'histones dans le cancer

Les modifications de la méthylation de l'ADN ne sont pas les seules anomalies épigénétiques que l'on retrouve dans les cancers. Les modifications des histones sont également très importantes. Ces modifications des histones sont intimement liées à la modification de méthylation de l'ADN, notamment par l'interaction conjointe des HMTs avec certaines DNMTs [286-288]. La méthylation de

l'ADN au niveau des promoteurs des TSG est souvent associée à une désacétylation des histones H3 et H4 et une méthylation des marques histones H3K9 et H3K27, suggérant l'action coordonnée entre la méthylation de l'ADN et la modification des histones dans l'activation de certains oncogènes et la répression de l'expression des TSG [287, 289]. On peut noter par exemple une étude décrivant une corrélation entre l'apparition de la marque histone H3K9me et la répression du gène suppresseur de tumeurs CDKN2A dans les cellules cancéreuses [278]. Actuellement, ces marques histones sont de plus en plus décrites comme étant importantes dans le cancer, notamment la méthylation et l'acétylation des lysines et leur impact dans les processus tumoraux [290]. On retrouve ainsi une réduction de l'acétylation de l'H4K16 et une augmentation de la marque de l'H4K20me3 dès les premiers stades tumoraux, s'accumulant lors de la progression tumorale [291]. Une revue récente décrit d'ailleurs l'ensemble de ces modifications [256]. Ces modifications des marques histones sont également associées à une variation de l'expression des enzymes participant à la régulation de ces marques.

Concernant les HAT/HDAC, on observe dans les cancers des mutations spécifiques de ces protéines. Par exemple, l'HDAC2 se retrouve mutée dans le cancer colorectal et est associée à une instabilité des microsatellites conférant une résistance aux inhibiteurs d'HDAC (iHDAC), molécules chimiques actuellement utilisées dans le traitement de certains cancers ou en phase de développement clinique. La répartition des HDAC sur l'ADN va également être associée aux régions contenant des TSG. Par exemple, la présence d'ilots CpG fortement méthylés au niveau des régions promotrices des TSG va être reconnue par des MBD, qui pourront à leur tour recruter des HDAC et ainsi contribuer au verrouillage de l'expression de ces gènes [292].

Concernant la méthylation des histones, nous avons déjà vu précédemment qu'elle pouvait être impliquée dans l'inactivation des TSG. On retrouve donc ainsi des mutations ou des modifications d'expression de ces HMT et HDM. C'est le cas par exemple d'EZH2, une méthyltransférase spécifique de l'histone H3K27. Cette enzyme appartient au complexe polycomb PCR2 et PCR3. L'apparition de la marque H3K27me3 va permettre le recrutement du répresseur PCR1 et va conduire à l'inactivation de certains gènes clés comme le suppresseur de tumeur p16/INK4 en coordination avec la famille pRB [293]. Les principales dérégulations des enzymes modifiant les histones sont décrites dans la figure 17.



**Figure 17: Enzymes modifiant les histones dérégulées dans les cancers.**

Plusieurs enzymes impliquées dans la modification des histones sont retrouvées modifiées dans les cancers. En vert on peut observer celles retrouvées surexprimées et en rouge celles sous-exprimées. En noir, il s'agit des protéines de fusions retrouvées dans les cancers.

Source : Füllgrabe et al, Histone onco-modifications, 2011 [256]

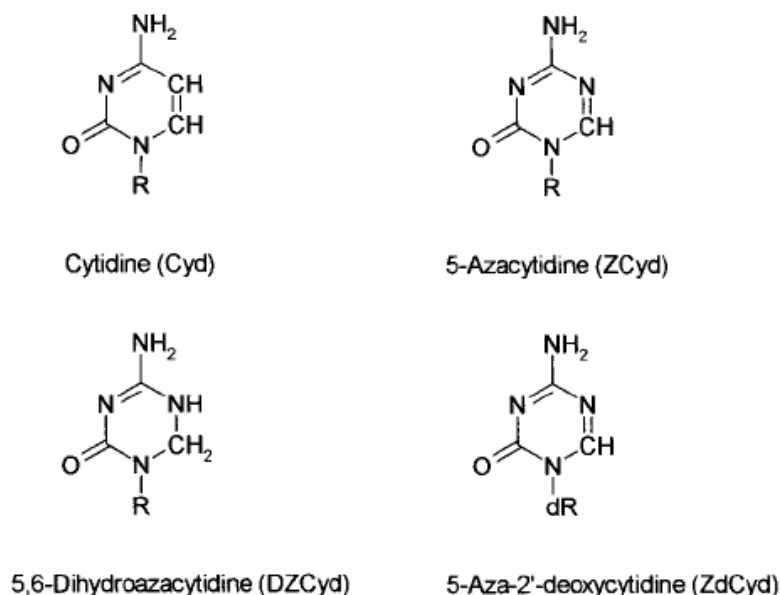
En conclusion, dans les cancers, une dérégulation épigénétique globale peut être observée. On observe ainsi d'une part, une hyperméthylation de l'ADN et une méthylation des marques histones inhibitrices au niveau des promoteurs des TSG et d'autre part, une hypométhylation globale de l'ADN, ainsi qu'une déacétylation globale des histones. L'ensemble de ces modifications contribue à l'expression des oncogènes, la répression des TSG et à la création d'une instabilité chromosomique. Ces événements ne sont pas uniquement des conséquences du processus de tumorigénèse mais sont présents dès les premiers stades tumoraux. L'importance de ces mécanismes épigénétiques a donc conduit à une recherche importante de molécules thérapeutiques permettant de restaurer un état épigénétique « normal » dans les cellules tumorales.

### III) Les drogues épigénétiques

Suite à l'importance des phénomènes épigénétiques dans les processus tumoraux, la recherche de molécules utilisables en cancérologie a donc été très fortement développée. Ces recherches ont menées à l'heure actuelle à la découverte de deux catégories de molécules : les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et les inhibiteurs d'histones déacétylases.

### A. Les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN

Il existe principalement deux molécules développées pour inhiber la méthylation de l'ADN : la 5-azacytidine (5-aza) et la 5-aza-2'-déoxycytidine (5-azaCdR). Le mécanisme d'action de ces deux molécules est quelque peu différent. Une revue de Christman résume d'ailleurs bien ces deux molécules et leur mode d'action [294]. C'est en 1964 que ces molécules ont été découvertes et synthétisées [295]. Leur première utilisation a d'abord été dirigée contre les leucémies aiguës myéloïdes notamment pour leur pouvoir cytotoxique. La 5-aza va s'incorporer dans l'ARN et l'ADN, causant l'inhibition de la synthèse protéique. Lors de son intégration dans l'ADN, elle va réaliser un complexe covalent avec la DNMT1 qui va être responsable de son action déméthylante [296]. De son côté, la 5-azaCdR va uniquement s'incorporer dans l'ADN. C'est un analogue non méthylable de la cytosine qui va donc empêcher la méthylation de l'ADN (figure 18) et conduire à une réexpression d'un certain nombre de gènes comme les TSG ou les CTA. Cette déméthylation par la 5-azaCdR reste stable sur une durée de temps importante. Elle nécessite la réplication des cellules et de par sa durée de vie dans le sang, cette molécule va cibler préférentiellement les cellules en division rapide. Cette drogue cible donc préférentiellement les cellules tumorales mais va également être responsable d'un certain nombre d'effets toxiques sur les cellules immunitaires et intestinales.



**Figure 18: Structures de la cytidine et de ses analogues non méthylables.**

Actuellement, les molécules 5-aza (Vidaza) [297] et la 5-aza-CdR (Décitabine) [298] sont utilisées couramment en clinique et sont approuvées pour le traitement des cancers hématologiques par la *Food and Drug Administration* [299]. Leur efficacité dans les cancers hématopoïétiques a été démontrée. En ce qui concerne les cancers solides, leur utilisation n'est pas encore convaincante et ils pourraient être utilisés en combinaison d'autres approches thérapeutiques.

#### B. Les inhibiteurs des histones déacétylases

Les histones dans les cellules cancéreuses se retrouvent donc majoritairement désacétylées. Le développement de molécules inhibitrices de ces HDAC permettant de restaurer un état d'acétylation « normal », est donc une perspective de recherche intéressante. Ces iHDAC, en plus de permettre de restaurer l'état d'acétylation des cellules cancéreuses, possèdent également des propriétés cytotoxiques dirigées contre les cellules cancéreuses. Ces molécules ont tout d'abord été décrites pour leur capacité à induire la différenciation et la mort des cellules tumorales [300]. Il existe actuellement quatre groupes d'iHDAC classés en fonction de leur nature : les acides hydroxamiques (SAHA, TSA..), les tétrapeptides cycliques (romidepsin), les benzamides (entinostat) et les acides aliphatiques (VPA). Ces groupes présentent plus ou moins une spécificité d'action dirigée contre différentes classes d'HDAC. Actuellement, environ 15 iHDAC sont étudiés dans différents essais cliniques et un certain nombre de nouvelles molécules sont développées dans les laboratoires. L'un des principes d'action de ces iHDAC est la liaison avec des ions  $Zn^{2+}$  qui ainsi séquestrés empêche le bon fonctionnement des HDAC [301].

Notre équipe, en collaboration avec l'équipe du Dr Philippe Bertrand de « Poitiers », vient d'identifier de nouveaux iHDAC dont un semble particulièrement intéressant puisqu'il agit à une concentration plus faible que ceux actuellement sur le marché [302]. Ces iHDAC ne vont pas simplement modifier l'état d'acétylation des histones, ils vont également agir sur l'acétylation globale de la cellule. Ces effets cellulaires sont impliqués dans le pouvoir cytotoxique de ces drogues. L'utilisation des iHDAC va permettre de modifier la balance entre les protéines pro- et anti-apoptotiques, en induisant par exemple l'expression de Bim [303]. On observe également une stabilisation de la protéine P53 favorisant l'arrêt du cycle cellulaire [304]. Un autre mécanisme d'action de ces drogues passe par l'inhibition de l'angiogénèse, notamment par la stabilisation de l'acétylation de HIF-1alpha, favorisant sa dégradation par le protéasome [305], mais aussi par l'inhibition de l'expression du VEGF [73]. Ces iHDAC apparaissent donc comme des drogues particulièrement intéressantes.

Le Vorinostat (SAHA) est l'une des molécules utilisées pour le traitement des lymphomes T cutanés (CTCL) [306]. Un certain nombre d'essais cliniques sont actuellement en cours dans les cancers liquides et solides permettant, d'évaluer l'intérêt de ces différentes molécules [307].

### C. Drogues épigénétiques et réponses immunitaires anti-tumorales

Ces drogues épigénétiques sont également décrites pour leur utilisation de façon combinée. L'une de ces combinaisons est l'utilisation des iHDAC avec des agents hypométhylants. Cette stratégie permet non seulement d'augmenter la toxicité cellulaire en utilisant des quantités plus faibles de drogue, mais elle permet également d'avoir une induction et une potentialisation de l'expression des CTA. C'est sur cette approche que l'équipe du Dr. Marc Grégoire travaille actuellement. Les travaux de l'équipe ont démontré l'effet cytotoxique de ces drogues, mais aussi leur capacité à induire et potentialiser l'expression *de novo* d'une certaine catégorie d'antigènes de tumeur : *les cancers testis antigen*, tel que NY-ESO-1. En effet, l'équipe a démontré une induction de NY-ESO-1 chez les lignées de MPM par un traitement au 5-aza-CdR ainsi qu'une potentialisation de cette expression par la combinaison 5-aza-CdR plus iHDAC (VPA ou SAHA). De plus, cette induction permet la reconnaissance et la lyse des cellules de MPM par un clone lymphocytaire T CD8+ spécifique de l'épitope NY-ESO-1(157-165)/HLA-A\*0201 *in vitro*.

Ces résultats ont également été confirmés *in vivo* dans un modèle murin de MPM, par l'établissement d'une réponse lymphocytaire T spécifique de la tumeur. En effet, un infiltrat lymphocytaire CD8+ est uniquement présent dans les tumeurs chez les animaux traités par l'iHDAC seul ou en combinaison avec le 5-aza-CdR. De plus, cet infiltrat lymphocytaire est capable de reconnaître spécifiquement les cellules de MPM murin et il est augmenté lorsque les cellules sont co-traitées (5-aza-CdR + iHDAC), démontrant l'établissement de réponses spécifiques dirigées contre des antigènes induits par le co-traitement [308]. Dans une seconde étude de l'équipe, il a été démontré que l'utilisation de cellules tumorales co-traitées permettait d'empêcher l'établissement et le développement des tumeurs chez des souris lorsque ces cellules tumorales sont injectées dans la cavité intra-péritonéale [309]. Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés par d'autres équipes dont le groupe du Dr. D.S. Schrumpp qui a démontré l'intérêt d'un pré-traitement par du 5-aza-CdR dans un modèle murin de transfert adoptif. L'antigène P1A murin est contrôlé par méthylation et un pré-traitement au 5-aza-CdR augmente l'expression de ce dernier, permettant alors d'augmenter l'efficacité d'un transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques de cet antigène et ce pour différents types histologiques de tumeurs [310].

Chez l'homme, ce n'est que récemment qu'il a été démontré l'induction d'une réponse T CD8+ spécifique de l'antigène MAGE, antigène de tumeur appartenant à la classe des CTA, chez des patients traités par la combinaison de drogues épigénétiques (iDNMT et iHDAC). Dans cette étude, l'azacitidine a été utilisée en combinaison du VPA chez des patients atteints d'une leucémie aiguë myéloïde ou d'une myélodysplasie. Une réponse lymphocytaire T CD8+ a été observée chez 10 des 21 patients [311].

L'ensemble de ces études souligne donc l'intérêt de l'utilisation et la nécessité de l'amélioration des stratégies thérapeutiques utilisant des drogues épigénétiques. L'utilisation de ces drogues épigénétiques en complément de stratégie immuno-thérapeutique constituerait une nouvelle approche du traitement des cancers : la « chimio-immunothérapie », ou encore de l'utilisation combinée de molécules de chimiothérapie avec des approches d'immunothérapies. Il est également important de déterminer l'impact de ces drogues épigénétiques sur des antigènes exprimés spontanément par les cellules tumorales et plus particulièrement en ce qui concerne les antigènes déjà connus du MPM, cela n'étant pas documenté à ce jour.

### **INTRODUCTION 3 : Les antigènes du MPM : l'antigène MUC1**

#### I) Les antigènes du MPM

Nous avons précédemment vu que les stratégies thérapeutiques dirigées contre le MPM sont relativement peu efficaces. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi elles, l'immunothérapie apparaît comme une perspective intéressante. En effet, nous avons déjà évoqué précédemment les arguments en faveur du développement de l'immunothérapie dans le MPM. Les approches d'immunothérapie se heurtent cependant au manque de connaissance des cibles antigéniques spécifiques du MPM reconnues par le système immunitaire du patient. Actuellement dans la littérature trois protéines sont décrites comme étant des antigènes candidats du MPM : la mésothéline, WT1 et MUC1.

La mésothéline a déjà été décrite précédemment comme bio-marqueur du MPM. En effet, la production de la forme soluble de cette protéine est utilisée comme bio-marqueur et indicateur de la progression de la maladie. La mésothéline est surexprimée dans plusieurs types de cancers. Cela en fait donc une cible thérapeutique intéressante. L'obtention de clone T dirigés contre la mésothéline et réactifs vis-à-vis d'une lignée de MPM a déjà été décrite dans la littérature [87]. Cette protéine est également la cible de deux autres stratégies d'immunothérapies spécifiques : le Morab009, un anticorps et une immuno-toxine nommée SS1P.

La protéine WT1, pour Wilm's tumor 1, est un facteur de transcription exprimé dans les tissus issus du mésoderme lors de l'embryogénèse, tels que : le rein, les gonades et le mésothélium. Chez l'adulte, l'expression de ce facteur de transcription se retrouve limitée dans un faible nombre de cellules comme les cellules CD34+ hématopoïétiques [312]. On observe une surexpression de cette protéine dans les cancers comme les leucémies, le MPM, le cancer du poumon et du sein [313]. Cet antigène appartient donc à la famille des antigènes surexprimés comme la mésothéline et peut être ciblé dans le MPM. Il a d'ailleurs été décrit que des cellules tumorales de MPM peuvent être efficacement reconnues aussi bien dans un contexte HLA-I que HLA-II par des clones de lymphocytes T CD8+ et CD4+ dirigés contre des épitopes de WT1 [88].

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à la mésothéline et à un autre antigène candidat du MPM : la protéine MUC1. Cette protéine est retrouvée surexprimée dans plus de 90% des cancers. C'est donc une cible thérapeutique très intéressante. Son expression est également retrouvée dans le MPM.

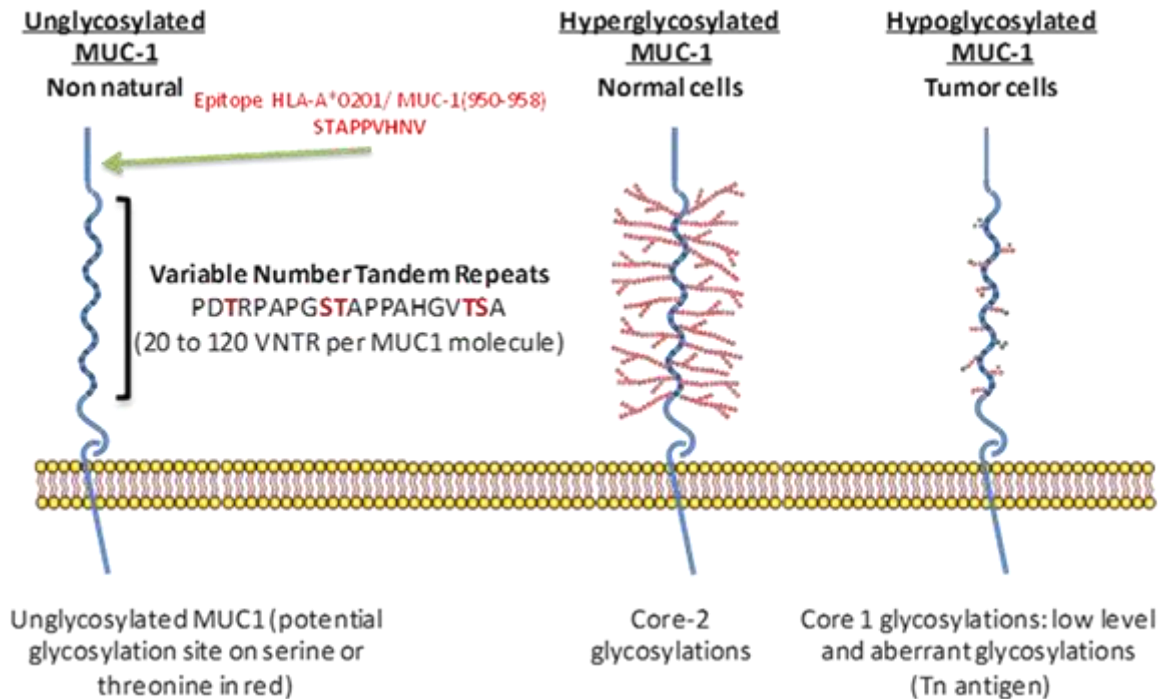


## A. La protéine MUC1

La protéine MUC1 appartient à la famille des mucines. Le gène de la protéine MUC1 a été cloné et isolé dans les années 1990 [314-315]. Cette protéine est caractérisée principalement par la présence d'un niveau de glycosylation important. La sécrétion de ces protéines glycosylées est une partie importante de la constitution du mucus. La protéine MUC1 se retrouve exprimée à la surface des cellules épithéliales avec une polarisation apicale. Elle est constituée : d'une queue C-terminale intracellulaire pouvant réaliser un certain nombre d'interactions avec des protéines de la voie  $\beta$ -caténine, d'un domaine transmembranaire et d'une partie N-terminale extracellulaire constituant la majeure partie de la protéine. Cette partie extracellulaire est notamment caractérisée par la présence d'un VNTR, pour Variable Number Tandem Repeat. Ce VNTR est une répétition de 20 acides aminés (répété 20 à 120 fois et très polymorphique avec une prédominance des allèles 40 et 60 fois répétés) [314]. Ce VNTR porte 5 sites potentiels d'O-glycosylation sur les sérines ou thréonines.

Cette protéine se retrouve surexprimée dans un grand nombre de cancers (quasiment 90 % des adénocarcinomes), avec une perte de la polarisation de son expression à la surface cellulaire et la présence de motifs anormaux de glycosylation [316]. La première observation d'une variation de l'état de glycosylation de MUC1 a été réalisée grâce à l'étude du marquage par un anticorps dirigé contre MUC1, le clone SM-3. Cet anticorps spécifique du corps hypoglycosylé de MUC1 marquait uniquement les cellules tumorales contrairement aux cellules saines [317-318]. Cet anticorps SM-3 réagit également vis-à-vis d'un large panel de lignées tumorales mais pas vis-à-vis du tissu sain leur correspondant (poumon, côlon, ovaire...) [318]. Ces études décrivent ainsi une différence dans l'état de glycosylation de MUC1 entre les cellules cancéreuses et les cellules saines. En effet, la structure des glycosylations présentes à la surface de MUC1 varie entre les cellules saines et les cellules cancéreuses. Les cellules saines possèdent de longues chaînes de glycosylation, alors que ces chaînes sont plus courtes et riches en acide sialique pour les cellules tumorales [319]. On observe également dans les cancers une modulation des enzymes impliquées dans la glycosylation de MUC1, conduisant à cette hypoglycosylation globale de la protéine et à l'apparition de motifs anormaux de glycosylation associés aux cellules tumorales (figure 19). C'est à la fois la surexpression de cette protéine, la présence de motifs anormaux de glycosylation et l'hypoglycosylation globale de cette protéine, qui sont responsables de son pouvoir immunogène dans le cancer.

Fort de ces constatations, le développement de stratégies immuno-thérapeutiques ciblant cette protéine a donc largement été investigué, en étudiant notamment les réponses T dirigées contre MUC1, la présentation d'épitopes de MUC1, le développement de stratégies d'immunothérapie, et le développement d'essais cliniques.



**Figure 19: La protéine MUC1**

Cette protéine est caractérisée par une courte partie intracellulaire permettant la signalisation et l'interaction avec ses partenaires. La partie extracellulaire est grande et contient les VNTR pour « variable number tandem repeats ». Il s'agit d'une séquence de 20 acides aminés répétée de 20 à 120 fois, le nombre de répétition étant polymorphique au sein de la population. Ce VNTR porte également 5 sites potentiels de glycosylation. En effet, la protéine MUC1 est principalement exprimée par les cellules épithéliales au niveau apical de ces cellules avec la présence de longues chaînes de glycosylation, créant ainsi un mucus protecteur. A la fin de ces VNTR, dans une répétition dite dégénérée, on retrouve l'épitope HLA-A\*0201/MUC1(950-958). Les cellules tumorales sont caractérisées par une perte de polarité, une surexpression de MUC1, une hypoglycosylation globale et la présence de motifs anormaux de glycosylation.

**Source :** Roulois et al, MU1-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Cancer Therapy : Induction and Challenge, 2013 (Annexe 2)

## B. MUC1 et réponse lymphocytaire T

Les premières observations d'une réponse T dirigée contre la protéine MUC1 se révélèrent tout d'abord surprenantes. Elle a été mise en évidence à partir des lymphocytes T d'un patient atteint d'un cancer pancréatique. Cette reconnaissance était non restreinte par les molécules CMH [320]. Ces lymphocytes T ne reconnaissent pas un complexe CMH/peptide, mais réagissent directement

contre la molécule MUC1 elle-même. De plus, cette reconnaissance est inhibée par l'utilisation de l'anticorps SM-3. Ces résultats suggèrent donc la mise en place d'une réponse T indépendante du CMH et dirigée contre le corps hypoglycosylé de MUC1 [321-324]. Afin d'aller plus loin dans ces travaux, une autre équipe a démontré qu'en utilisant un inhibiteur de la glycosylation, le benzyl-2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranoside (BGN), il était possible d'augmenter cette reconnaissance T indépendante du CMH [325]. Cette découverte du potentiel antigénique de MUC1 a conduit à la recherche de réponses T HLA-restreintes. Dans les années 1990, le groupe de Domenech a décrit pour la première fois un peptide pouvant se lier aux molécules HLA-A1,-A2.1,-A3 et -A11 (STAPPAHGV) [326], sans pouvoir cependant, valider la présentation de cet épitope par les cellules tumorales. C'est l'équipe d'Apostolopoulos qui valida la présentation de ce peptide grâce à un modèle de souris transgénique pour la molécule HLA-A\*0201 [327]. Ensuite, Brossart et al décrivent deux autres peptides HLA-A\*0201 restreints de MUC1 : MUC1 (20-28) LLLTVLTV et MUC1 (950-958) STAPPVHNV. Ces peptides présentent une bonne affinité de liaison avec la molécule HLA-A\*0201 [328]. Cette équipe a également généré deux clones de lymphocyte T CD8+ dirigés contre ces épitopes. Ces clones sont capables de reconnaître des lignées tumorales (sein, pancréas, rein) MUC1+ HLA-A\*0201+ et de les lyser. Dans une autre étude, cette équipe a également testé la reconnaissance par ces clones T de lignées de myélomes multiples et des blastes de leucémies myéloïdes aiguës [329]. A partir de ces études, d'autres épitopes présentés dans différents contextes HLA de classe I et de classe II ont été décrits ainsi que les réponses T associées.

Ces résultats ont permis de mettre en évidence la présentation d'épitopes de MUC1 par un large spectre de tumeurs, mais aussi la possibilité d'obtenir des lymphocytes T cytotoxiques capables de lyser les cellules tumorales MUC1+. Des modèles murins ont alors été mis en place afin de comprendre les mécanismes d'induction d'une réponse T spécifique de MUC1, mais aussi de mettre au point des stratégies de vaccination pour obtenir des lymphocytes T spécifiques dirigés contre MUC1 avant de les adapter chez les patients.

### C. MUC1, modèle murin et vaccination

Dans l'objectif d'étudier l'immunogénicité de MUC1 *in vivo* et l'impact des stratégies de vaccination dirigées contre MUC1, un modèle de souris transgénique (TG) pour la protéine MUC1 humaine a été mis en place par le groupe de Papadimitriou [330]. Le profil d'expression tissulaire de MUC1 humain dans ces souris est similaire à celui retrouvé chez l'homme. Les premiers travaux utilisant ce modèle de souris TG ont permis d'étudier l'établissement d'une tolérance contre MUC1 et les moyens de la contourner [331-333]. Rowse GJ et ses collègues ont étudié l'établissement et la

croissance de tumeurs MUC1 positives chez des souris contrôles ou TG [331]. Ils ont également observé l'induction d'une réponse humorale spécifique dirigée contre MUC1 après une immunisation avec des peptides issus de la protéine MUC1. Ils ont constaté que l'établissement de tumeurs MUC1+ chez les souris TG est possible alors que ces cellules tumorales sont rejetées par les souris contrôles. La vaccination quant à elle permet l'induction d'un « switch isotypique » des immunoglobulines vers la production du sous-type IgG, uniquement chez les animaux contrôles. Ces résultats suggèrent donc l'apparition d'une tolérance dirigée contre MUC1. Deux autres études semblent d'ailleurs confirmer ces résultats [334-335]. Tout d'abord, l'injection de cellules tumorales B16 exprimant MUC1 chez des souris contrôles conduit à l'apparition d'une réponse T CD4+ alors qu'elle est absente chez les souris TG [334]. Ensuite, ces souris B16 wild type portant une tumeur MUC1+ développent une réponse IgG dirigée contre MUC1, alors que les souris B16 TG n'en développent pas [335]. Pour finir, ces souris TG sont utilisées dans un modèle d'endométriose, maladie inflammatoire pouvant conduire à l'apparition d'un cancer de l'endomètre. Dans ce modèle, les auteurs ont décrit l'apparition de réponses T régulatrices dirigées contre MUC1 [336]. Ces résultats suggèrent donc l'établissement possible d'une tolérance dirigée contre MUC1 chez la souris, mais aussi chez l'Homme, d'où l'importance du développement de stratégies de vaccination pouvant dépasser cette tolérance. Afin de ne pas déclencher une réponse tolérogène, mais plutôt une réponse effectrice spécifique des cellules tumorales, il semble nécessaire d'utiliser un antigène MUC1 portant des motifs de glycosylation anormaux, présents dans les cancers. En effet, ces études ne prennent pas en compte la modification des glycosylations de MUC1 dans les cellules cancéreuses. Certaines études de vaccination avec des peptides spécifiques de MUC1, glycosylés ou non, suggèrent qu'une tolérance ne peut pas s'établir contre des épitopes de MUC1 portant des motifs de glycosylation particuliers, tels que l'antigène Tn [337-339]. Ces motifs anormaux peuvent donc être reconnus par le système immunitaire comme du « NON SOI » plutôt que comme du « SOI » et cela semble donc être important dans l'induction d'une réponse T spécifique.

#### D. Les autres stratégies pour induire des réponses T MUC1 spécifiques

Il existe un nombre d'approches assez important actuellement en cours de développement dans l'optique d'induire des réponses T spécifiques de MUC1 chez les patients atteints d'un cancer. La majorité de ces approches se base sur la capacité des cellules dendritiques à induire des réponses T spécifiques [340]. Le tableau 4 résume l'ensemble de ces approches. Parmi elles, deux stratégies différentes regroupent la majorité des essais de vaccination actuellement en cours de développement : l'utilisation d'acide nucléique codant pour MUC1 ou la vaccination peptidique.

La première approche de vaccination consiste en l'utilisation d'un support d'acide nucléique (ADN/ARN) comme vaccin [341-343]. Cette approche a l'avantage de pouvoir induire à la fois des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ et CD4+ et a montré son potentiel anti-tumoral chez la souris. Cependant, il est nécessaire de développer des stratégies adjuvantes ou de combiner ces vaccinations à un inducteur de l'activation du système immunitaire. Par exemple, une équipe a développé un vaccin combinant l'ADNc de MUC1 à l'HSP70, afin d'augmenter les capacités des

cellules dendritiques à induire une réponse T cytotoxique efficace [344]. D'autres stratégies tentent de combiner cette vaccination à un inducteur de mort cellulaire. C'est le cas des shRNA, empêchant l'expression d'ANT2, une protéine impliquée dans le processus de carcinogénèse [345]. Une autre approche tente d'empêcher la glycosylation de MUC1 par les cellules en utilisant une séquence modifiée de MUC1 [346]. Une autre stratégie consiste à cibler directement les cellules dendritiques en les transfectant avec des ARN messagers de MUC1 [347]. Ces approches ont montré des effets intéressants chez l'animal, avec une induction de réponses T CD8+ mais aussi CD4+, le plus souvent associées à une régression de la tumeur chez l'animal.

La seconde stratégie fait intervenir l'utilisation de peptides ou glycopeptides de MUC1. Comme nous l'avons dit précédemment, il semble que dans ce genre de stratégie l'utilisation de glycopeptide portant des motifs spécifiques de tumeur est l'approche la plus intéressante afin d'éviter l'établissement d'une tolérance, comme l'utilisation par exemple du motif antigénique Tn [337, 339]. Ce peptide peut également être modifié. Par exemple, le peptide MUC1-MPA(11)P permet d'augmenter la pénétration du peptide dans les APC [348]. Cette stratégie semble d'ailleurs démontrer dans les modèles animaux une bonne capacité à pouvoir induire une réponse T spécifique et une diminution de la masse tumorale chez la souris. Les peptides peuvent également être modifiés pour porter des sucres spécifiques de récepteurs présents à la surface des DC et donc ainsi cibler directement la DC [338]. Afin de pouvoir induire à la fois des réponses T CD4+ et CD8+, des longs peptides sont utilisables, ce qui permet également de pouvoir couvrir un large spectre de restrictions HLA [349]. D'ailleurs, les premiers résultats semblent indiquer que les stratégies « long peptides » (21mer) permettraient d'obtenir plus d'efficacité *in vivo* que l'utilisation de peptides courts (9mer). Ces peptides peuvent également être combinés avec d'autres agents pour augmenter leur efficacité dans des approches de vaccination multimodales [350].

Actuellement, il y a donc de nombreuses stratégies d'essais de vaccination MUC1. Ces stratégies présentent *in vitro* et *in vivo* des effets intéressants, mais qu'en est-il chez l'Homme ?

**Tableau 4: Liste des stratégies thérapeutiques en développement**

Auteur	Strategy	Cancer Model	Effect
Deguchi [351]	A-gal epitope to increase immunogenicity of MUC1	Pancreatic cancer mouse model	Induction antibody, tumor mice regression Induction of T cell response
Kovjazin[349]	ImMucin peptide 21mer	mice/ PBMC of patients	Lymphocyte T CD4+ and T CD8+ response in vitro and in vivo
Choi[352]	DNA vaccine (MUC1/HSP70)	B16 MICE	Induction cytotoxic T cells response/ Tumor growth inhibition
Chen[347]	MUC1 mRNA, dendritic cells transfection	Pancreas cancer	Dendritic cells, mRNA MUC1 transfected can induce MUC1 specific CD8+ T cells
Wright[346]	MUC1 peptide with substitution of O-Glycosylation site	Humain adenocarcinoma	O glycosylation site substitution improve immunogenicity
Kobukai[348]	MPA11P vehicle of a 30mer muc1 peptide	Mouse	Reduction tumor size, lymphocyte infiltration
Lakshmiarayanan[350]	Tripartite MUC1 vaccine (TLR2, Thelper, MUC1 glycopeptides)	Mouse model of mammary cancer	IgG antibodies, cytotoxic T lymphocytes, activation of innate immune response
Sugiura [342]	MUC1 DNA Vaccine	Mouse/colon	Induction CD4+ response, not T CD8+
Ryan [337, 339]	TN MUC1 glycopeptide	Mouse	T cell responses against glycosylated peptides, but not unglycosylated peptides
Yun choi [345]	MUC1 DNA vaccination, enhanced by mANT2 shRNA	Mousse melanoma	Combination Enhanced effect of DNA Vaccination, MUC1 CD8+ T cell response
Jeon [341]	DNA vaccination	Mouse	Tumor growth inhibition, CD8+ IFN $\gamma$ increased

Source : Roulois et al, MU1-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Cancer Therapy : Induction and Challenge, 2013 (Annexe 2)

#### E. Essais cliniques chez l'Homme

Lorsque l'on regarde les stratégies dirigées contre MUC1 en phase clinique, on se rend tout d'abord compte que ces stratégies ne sont pas limitées à un seul type de cancer. Un peu plus de soixante essais cliniques ciblant cette protéine sont actuellement en cours et consultables sur le site <http://www.clinicaltrials.gov>. Ces essais cliniques sont résumés dans le tableau 5, seulement quatre sont en phase d'essai IIB/III.

La première stratégie de vaccination concerne le vaccin liposomal BLP25 (Stimuvax ou L-BLP25). Il consiste en un liposome contenant un peptide de 25 acides aminés contenant le VNTR (STAPPAHGVTSPDTRPAPGSTAPP) et couplé à un résidu palmitoyl au niveau C-terminal, favorisant son ancrage dans la particule liposomale [353-354]. Cette stratégie est principalement utilisée dans le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) et est bien tolérée [355-356]. Même si pour l'instant aucune réponse immunitaire n'est observée, ce vaccin semble favoriser la survie des

patients en stade IIIB/V du NSCLC dans une étude de phase II [357]. Une phase III est actuellement en cours pour confirmer ces résultats [358].

La deuxième stratégie de vaccination est le TG4010 de Transgene SA. C'est un virus recombinant modifié de l'Ankara vaccine codant pour MUC1 et le gène de l'IL-2 (MVA-MUC1-IL-2). Les essais de phase II menés avec ce virus ont été réalisés dans un certain nombre de cancers : prostate, RCC et NSCLC [359-361]. Dans le cancer de la prostate, une activité biologique a été mise en évidence montrant l'augmentation du temps de doublement du taux de PSA dans le sang [360]. Dans le RCC, les premiers résultats sont encourageants avec l'apparition de réponses CD4+ et CD8+ spécifiques de MUC1 [361]. Dans le NSCLC, une étude rétrospective sur la combinaison du MVA avec de la chimiothérapie a permis une augmentation de la survie de six mois en comparaison avec la chimiothérapie seule [362]. Une phase IIB/III est d'ailleurs actuellement en cours dans le NSCLC afin de confirmer ces résultats et d'évaluer le bénéfice clinique de cette combinaison.

Des résultats encourageants ont également été obtenus dans un essai de phase III dans lequel des patientes atteintes d'un cancer du sein (stage II) ont été immunisées avec la protéine MUC1 portant des groupements « oxidized mannan » [363]. Aucune résurgence de la maladie n'est apparue chez les patientes vaccinées en comparaison avec le groupe non vacciné, dans lequel quatre patientes sur 16 ont rechutées en ayant reçu un placebo.

**Tableau 5: Liste des essais cliniques en développement**

Author	Strategy	Clinical trial phase	Major observation	Cancer type
Apostolopoulos[363]	Oxidized Mannan-MUC1	III	Breast cancer recurrence prevention	Breast
Ramlau[359]	TG4010	II	TG4010 can be coupled with chemotherapy	Lung
Dreicer [360]	TG4010	II	Increased PSA doubling time	Prostate
Oudard [361]	TG4010	II	MUC1 T cell responses	RCC
Quoix [362]	TG4010	IIB	Improved survival	Lung
Ohyanagi[356]	BLP25	I/II	Well tolerated, low side effects	Lung
Butts[357]	BLP25	II/B	Increased survival	Lung
WU YL[358]	BLP25	III inspire	In progress/increased survival	Lung
Butts[364]	BLP25	I/II	New formulation well tolerated	Lung
Wright[365]	MUC1 TIL Transfers	I/II	Influence of the tumor burden on adoptive transfer of MUC1 specific T cells	Breast
Lepisto [366]	Dendritic cells pulsed with MUC1	I/II	Well tolerated, induction of T cell responses	Pancreas
Kondo [367]	Dendritic cells and CTL transfer	I	Clinical response	Pancreas
Dobrzanski [368]	Adoptive transfert CD4 T cells plus IL-10	I	Clinical response	Ovarian
Mohebtash[369]	PANVAC-VF	II	Clinical effects	Breast/ovary
Ibrahim[370]	AS1402 + Letrosole	II	Use of Letrosole incompatible with AS1402 strategy	Breast
Pegram[371]	AS1402	I	Well tolerated, need phase II to evaluate efficacy	Breast
Rittig [372]	ARN muc1	I/II	Induction of CD4+ T cell responses	RCC

Source : Roulois et al, MU1-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Cancer Therapy : Induction and Challenge, 2013 (Annexe 2)



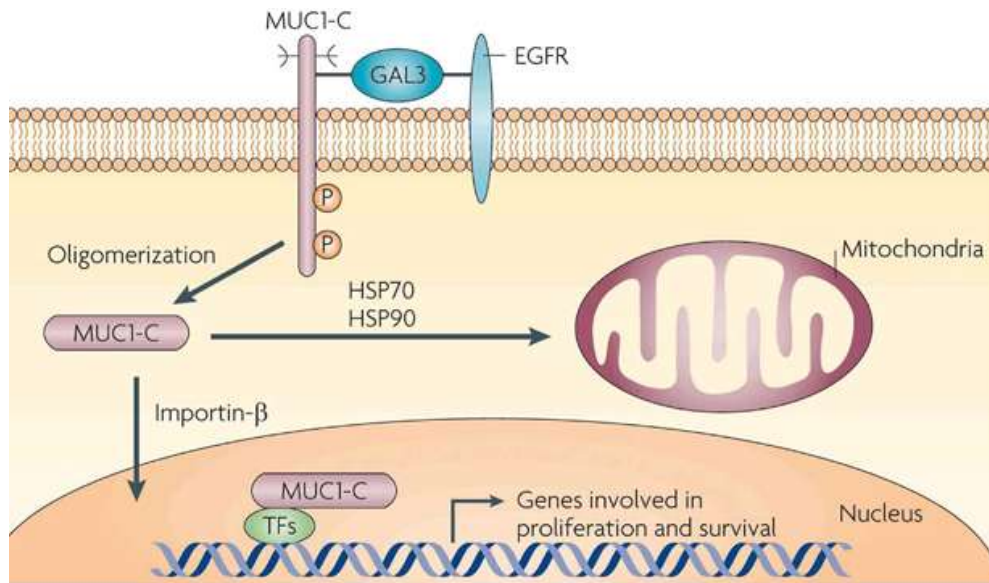
La protéine MUC1 apparaît donc comme une cible immuno-thérapeutique intéressante dans de nombreux types de cancers. Au cours de ma thèse, j'ai étudié cette protéine pour son aspect antigénique dans le MPM, mais également en tant que cible chimio-thérapeutique des iHDAC dans le MPM. En effet, la protéine MUC1 possède un certain nombre de propriétés oncogéniques pouvant être ciblées en pharmacologie.

#### F. MUC1, une protéine oncogénique

La protéine MUC1 a largement été étudiée en tant que cible d'intérêt en immunothérapie. Cependant, des études récentes et une meilleure compréhension de sa fonction et de sa régulation [373-374] ont également mené à étudier cette protéine sous un aspect oncogénique [375].

##### 1. Les fonctions de la protéine MUC1

La protéine MUC1, par sa partie extracellulaire, participe à un grand nombre d'interactions notamment avec les protéines de la famille des galectines comme la galectine 3 [376] et le récepteur à l'EGFR. Cette interaction avec l'EGFR va empêcher l'inhibition de ce dernier et favoriser la transformation tumorale (figure 20) [377]. La galectine 3 pourrait également être impliquée dans la création d'un pont entre MUC1 et l'EGFR [378]. La partie intracellulaire de MUC1 va aussi avoir un rôle important dans l'activation du signal intracellulaire. En effet, cette partie C-terminale (MUC1-C) va pouvoir être ciblée par un certain nombre de kinases participant *in fine* à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, responsable de la transcription d'un certain nombre de gènes impliqués dans des fonctions anti-apoptotiques et favorisant ainsi le processus de transformation tumorale [379]. MUC1 va pouvoir également interagir avec un certain nombre de molécules chaperonnes, telles que HSP90 et jouer un rôle dans la résistance à l'apoptose [380-381]. Pour finir, MUC1-C va aussi être impliquée dans la voie  $\beta$ -caténine [382-383].



**Figure 20 : Fonction oncogénique de MUC1**

La protéine MUC1 peut interagir avec l'EGFR au moyen de la galectine-3. Cette interaction induit la phosphorylation du domaine cytoplasmique de MUC1 (MUC1-C). La partie MUC1-C, va alors s'oligomériser dans le cytoplasme et être transportée vers le noyau grâce à l'importine-β. Une fois dans le noyau, MUC1-C va s'associer avec des facteurs de transcription et promouvoir l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la survie cellulaire, l'angiogénèse ou le remodelage de la matrice extracellulaire. MUC1-C peut également interagir avec les molécules HSP70 et 90 et être transportée dans la mitochondrie. L'ensemble de ces mécanismes participe au rôle pro-oncogénique de MUC1.

**Source :** Kufe, Oncogenic function of the MUC1 receptor subunit in gene regulation, 2010, [375]

Dans les cancers, d'une manière générale cette surexpression de MUC1 va favoriser son interaction avec ses différents partenaires et promouvoir la progression tumorale en favorisant : la résistance à l'apoptose, la prolifération cellulaire et l'établissement de métastases. Un certain nombre d'équipes de recherche s'intéresse donc maintenant au ciblage de MUC1 et surtout à sa partie C-terminale, afin d'inhiber ses propriétés pro-oncogéniques.

## 2. MUC1 : cible pharmacologique

Les inhibiteurs pharmacologiques actuellement développés et dirigés contre MUC1 s'intéressent principalement à la partie cytoplasmique de MUC1 (MUC1-C), afin de bloquer les voies de signalisation intracellulaires. Dans ces approches, un peptide leurre a permis d'inhiber l'interaction entre MUC1-C et la β-caténine [382]. Plus récemment, l'utilisation d'un peptide dominant négatif, spécifique du site d'interaction de MUC1 avec l'EGFR et la β-caténine, permet d'inhiber cette interaction et de diminuer l'agressivité de lignées du cancer du sein [384].

En dehors de l'utilisation de ces peptides leurres, on trouve également des molécules qui ciblent directement le domaine cytoplasmique de MUC1. Ces approches sont potentiellement plus spécifiques. Un inhibiteur a été développé, le GO-20, empêchant l'oligomérisation des domaines cytoplasmiques de MUC1 et leur import dans le noyau où ils médient leur fonction [385-386]. Dans la littérature, des approches moins spécifiques décrivent également la possibilité d'inhiber l'expression de MUC1, notamment par des protéines de la famille PIAS (protein inhibitor of activated STAT) [387]. Il a également été décrit la possibilité d'utiliser de la Gemcitabine, un analogue de la déoxycytidine, pour diminuer l'expression de MUC1 [388]. La compréhension de la régulation épigénétique de MUC1 pourrait également s'avérer intéressante. Cependant, à l'heure actuelle, seule une étude décrit l'importance de la méthylation de l'ADN et de la marque histone H3K9 (méthylée ou acétylée) dans la régulation de MUC1 [389]. En effet il semblerait que la diméthylation de l'H3K9 et la méthylation de l'ADN au niveau du promoteur de MUC1 soient impliquées dans l'inhibition de l'expression de MUC1, au contraire, l'acétylation de l'H3K9 et l'hypométhylation de l'ADN, serait quand elles impliquées dans l'induction de l'expression de cette protéine. En dehors de cette étude, il existe peu de donnée quand à la régulation épigénétique de MUC1, alors que le promoteur et la régulation génétique de MUC1 sont plutôt bien décrits [374].

## OBJECTIFS

Le MPM est un cancer avec un pronostic actuellement très défavorable. Les stratégies thérapeutiques restent globalement peu efficaces, et même si elles permettent d'augmenter la médiane de survie des patients, à l'heure actuelle aucun traitement ne permet la guérison de cette maladie. Il y a donc un enjeu majeur dans la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi ces stratégies, les approches d'immunothérapies ou de chimio-immunothérapies pourraient s'avérer intéressantes.

Le premier objectif de ma thèse était d'identifier des antigènes exprimés par le MPM et reconnus par des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Le second objectif était d'étudier la présentation de ces antigènes par les cellules tumorales, mais aussi d'étudier l'impact des drogues épigénétiques sur cette présentation antigénique. De plus, ce travail devait permettre l'obtention de clones de lymphocytes T réactifs vis-à-vis des cellules tumorales qui sont nécessaires pour étudier la modulation du système immunitaire par les approches thérapeutiques développées au sein de l'équipe.

Afin d'envisager des approches immuno-thérapeutiques ciblées dans le MPM, il est nécessaire d'identifier des antigènes exprimés par le MPM et pouvant être reconnus par des lymphocytes T. Dans la première partie de ma thèse, j'ai cherché à identifier des antigènes du MPM par deux approches :

- La première consistait en une approche d'immunologie « directe », j'ai établi des lignées tumorales du MPM dérivant de liquides pleuraux de patients d'une part, et isolé les lymphocytes T présents d'autre part. J'ai ensuite tenté de mettre en évidence des réponses spécifiques de ces lymphocytes T vis-à-vis de la lignée tumorale autologue. L'objectif étant d'identifier l'antigène reconnu à partir de lymphocytes T réactifs contre la tumeur.

- La seconde approche consistait en une approche d'immunologie « inverse ». En effet, l'équipe avait identifié des cibles antigéniques candidates pour le MPM (MUC1 et la mésothéline [390-391]). J'ai donc obtenu *in vitro* des populations clonales de lymphocytes T spécifiques de plusieurs épitopes de ces antigènes, à partir de sang d'un donneur sain, afin de vérifier si les cellules tumorales étaient capables de présenter ces épitopes. Cette étude a permis de mettre en évidence que MUC1 est un antigène cible du MPM.

## Objectifs

Suite à l'identification de la protéine MUC1 comme antigène candidat en immunothérapie du MPM, j'ai étudié l'impact des drogues épigénétiques sur ce dernier. En effet, l'équipe du Dr. Marc Grégoire a auparavant démontré l'efficacité d'une combinaison de drogues épigénétiques (iDNMT plus iHDAC) sur l'induction de l'expression de CTA, tels que NY-ESO-1, rendant alors sensible à la lyse ces cellules tumorales par un lymphocyte T CD8+ spécifique de NY-ESO-1 [308]. Cependant, il existe peu de données en ce qui concerne l'impact de cette combinaison de drogues sur d'autres antigènes déjà exprimés par les cellules tumorales.

J'ai alors étudié la modulation d'expression de deux antigènes du MPM (NY-ESO-1 et MUC1) par un inhibiteur de DNMT (5-aza-CdR) et deux iHDAC (VPA et SAHA), utilisés seuls ou en combinaison. J'ai ensuite étudié l'effet de ces drogues sur la reconnaissance de MUC1 et NY-ESO-1 par des clones de lymphocytes T spécifiques de ces antigènes. J'ai ensuite commencé l'étude des mécanismes épigénétiques mis en causes et responsables de la modulation d'expression de MUC1 par les iHDAC.

## RESULTATS

### 1) Mise en évidence *ex vivo* de réponse T dirigée contre le MPM chez l'homme

L'immunologie directe est une technique permettant d'identifier et de rechercher de nouveaux antigènes de tumeur. Pour cela, il est nécessaire d'obtenir à partir du LqP du patient, la lignée tumorale d'une part et d'autre part les lymphocytes T. L'équipe du Dr. Marc Grégoire dispose d'une collection de lignées cellulaires tumorales de MPM obtenues à partir des cellules présentes dans le liquide pleural du patient. Cette bio-collection contient également des échantillons de LqP et de sérums. Elle permet la recherche et l'identification de nouveaux marqueurs du MPM [392] (Annexe 1). Lors de mon arrivée au sein de l'équipe, j'ai mis en place sur les nouveaux liquides pleuraux, l'isolation et l'amplification des lymphocytes T présents (voir méthodologie 1).

#### Méthodologie 1

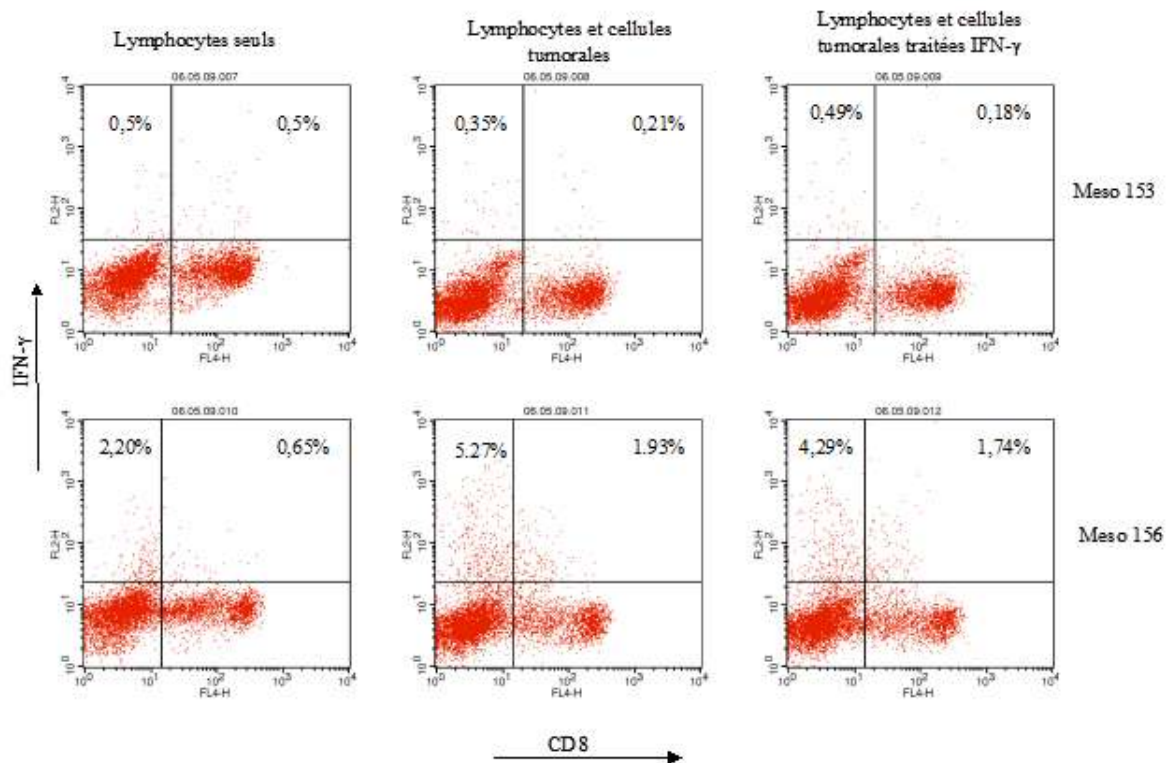
##### Etablissement des lignées tumorales et des lignées de lymphocytes T associés à la tumeur

Brièvement, le liquide pleural est centrifugé pendant 20 minutes à 1500 g. Le culot de cellules est lavé, puis de nouveau centrifugé sur gradient de Ficoll, afin d'isoler les PBMCs et les cellules tumorales dans la phase au dessus du Ficoll. Les cellules sont ensuite lavées deux fois. Les cellules sont mises en culture dans une plaque 6 puits dans du milieu RPMI 1640 contenant soit 10% de sérum de veau fœtal (SVF), soit 8% d'un pool de sérums humains (pSH), auquel 150 U/ml d'IL-2 sont ajoutés.

Les cellules cultivées dans du milieu RPMI 1640 contenant du SVF sont destinées à l'obtention de la lignée tumorale. Au bout de 24 heures, afin de séparer les cellules non adhérentes des cellules adhérentes, des lavages plus ou moins forts sont réalisés, en partant du principe que les cellules tumorales adhèrent au plastique. Les cellules cultivées avec du milieu RPMI 1640 supplémenté en pSH et 150 U/ml d'IL-2 sont destinées à l'obtention des TIL. Au bout de 24 heures, des lavages plus ou moins forts des cellules sont réalisés. Les cellules lymphocytaires étant non adhérentes, elles sont récupérées. L'ajout d'IL-2 à la population lymphocytaire va favoriser la prolifération des lymphocytes T. Cette population est cultivée environ 15 jours en présence de 150 U/ml d'IL-2, puis récupérée et conservée pour des analyses ultérieures. De cette façon, il est possible d'obtenir à la fois la lignée tumorale, mais aussi les lymphocytes T autologues présents dans le liquide pleural du patient.

##### Test de la réactivité des TIL contre la lignée tumorale autologue

Afin de déterminer la présence de lymphocytes T réactifs dirigés contre la lignée tumorale autologue, les TIL sont co-cultivés avec les cellules tumorales autologues, préalablement traitées ou non par 500 U/ml d'IFN- $\gamma$  à un ratio effecteur/cible de 1/1 en présence de brefeldine A. Le prétraitement à l'IFN- $\gamma$  permet d'augmenter l'expression des molécules HLA par les cellules tumorales et donc en théorie l'intensité de la réponse TIL spécifique. Après 6 heures d'incubation, un marquage extracellulaire par un anticorps anti-CD8+ est réalisé afin de distinguer les lymphocytes T CD8+ des autres cellules. Les cellules sont ensuite fixées par 4% de paraformaldéhyde et un marquage intra-cytoplasmique par un anti-IFN- $\gamma$  est réalisé afin d'observer par cytométrie en flux la réponse des lymphocytes T CD8+ spécifiques contre les cellules tumorales.



**Figure 21: Test couple TIL-tumeur**

Au cours de ma thèse, une dizaine de couples TIL/tumeur ont été obtenus et testés. Un exemple de résultats de ce test est montré sur la figure 19 pour deux patients : Meso 153 et Meso 156. Une seule réponse a été détectée chez le patient Meso 156, visible par une augmentation du pourcentage de lymphocytes T CD8+/IFN-γ+, passant de 0.65% cultivés seuls, à 1.93% en présence des cellules tumorales. Les lymphocytes T CD8+ IFN-γ+ ont un faible marquage CD8, ce qui suggère qu'ils sont CD8αβ et non pas CD8αα, qui sont eux au contraire fortement marqués par l'anti-CD8α+. Une augmentation de la production d'IFN-γ a également été observée pour la population CD8- (composée majoritairement des CD4+), passant ainsi de 2.20% à 5.27% de lymphocytes CD8- réactifs. Le pré-traitement par l'IFN-γ des cellules tumorales ne permet pas d'augmenter cette réponse T spécifique. Suite à cette observation, la population de TIL Meso 156 a été clonée afin d'isoler un clone reconnaissant spécifiquement la lignée tumorale autologue. Cependant, suite à la faible réponse des clones obtenus, il n'a pas été possible d'identifier l'antigène reconnu. L'approche d'immunologie classique nous a donc permis de mettre en évidence qu'il y avait peu de réponses T spontanées dans le liquide pleural de patient souffrant d'un MPM, puisque nous avons détecté une telle réponse que chez 1 seul patient sur 10.

## II) Immunologie inverse

L'immunologie dite inverse consiste à déterminer si des protéines cibles sont des antigènes potentiels du cancer, ainsi qu'à définir pour un contexte HLA donné la capacité de présentation d'épitopes prédits *in silico*. Pour cela, il est nécessaire d'obtenir un clone lymphocytaire T spécifique des épitopes prédits à partir de la séquence protéique de l'antigène candidat. La vérification de la reconnaissance des cellules tumorales par les clones lymphocytaires T produits permet d'établir que la protéine candidate est un antigène de tumeur. Concernant le MPM, trois antigènes candidats ont été décrits : la MSLN, MUC1 et WT1 [390-391]. WT1 ayant déjà été étudié dans le MPM [393], nous nous sommes intéressés à la MSLN et MUC1.

Des épitopes peptidiques de ces deux protéines, possédant une forte probabilité de liaison avec les molécules HLA-A\*0201+ (contexte HLA le plus fréquemment présent dans la population caucasienne), ont été prédits et décrits dans la littérature: trois épitopes de la MSLN (20-28, 530-539 et 547-556) ont été décrits dans un contexte de présentation croisée et de vaccination [87, 394]. Deux épitopes de MUC1 (12-20 et 950-958) reconnus par des clones T spécifiques ont été décrits comme étant présentés par des lignées tumorales mammaires et rénales [328].

J'ai ainsi obtenu par la technique d'immunologie inverse [395] (Méthodologie 2) plusieurs clones T restreints HLA-A\*0201 et dirigés contre l'un des trois épitopes de la mésothéline (20-28) et contre les deux épitopes de MUC1 (12-20 et 950-958).



## **Methodologie 2**

### **Stimulation des lymphocytes T CD8+**

Les DC matures autologues sont chargées pendant 2h à 4°C avec 10µg/ml d'un des peptides MUC1 12-20 (LLLLTLTV), MUC1 950-958 (STAPPVHNV) et MSLN 20-28 (SLLFLLFSL), puis rincées deux fois. Les DC sont alors irradiées à 35 grays à l'EFS. La population lymphocytaire appauvrie en lymphocytes CD25+ est alors mise en présence des DC autologues chargées en peptide à un ratio de 1 DC pour 20 lymphocytes, en plaque 96 puits à fond rond dans du RPMI 1640 contenant du pSH. Le milieu est supplémenté par 1000U/ml d'IL-6 (Cell Genix) et 5ng/ml d'IL-12 (Cell Genix) pendant la première stimulation, puis 10U/ml d'IL-2 (Novartis) et 5 ng/ml d'IL-7 (ABCys) pour les stimulations suivantes. Au total, 80 puits sont réalisés par peptide et quatre stimulations successives sont réalisées à 7 jours d'intervalle. Le milieu est renouvelé en fonction de la prolifération des lymphocytes constatée au microscope optique, avec un renouvellement de moitié tous les trois jours au minimum.

### **Détection des lymphocytes T spécifiques des peptides par marquage intracellulaire de l'IFN-γ**

A l'issue de la troisième et de la quatrième stimulation, la présence de lymphocytes spécifiques des peptides est testée. Pour cela, des aliquots de lymphocytes T de chaque puits sont prélevés et co-cultivés avec la lignée T2 (une lignée TAP déficiente, les molécules HLA vides sont donc facilement chargeables en peptide), préalablement chargée ou non avec 10 µM de peptide (pendant 30 minutes à 4°C, suivi de lavages). Cette co-culture se fait dans du RPMI 1640 contenant du SVF auquel est ajouté de la brefeldine A (Sigma) à une concentration de 10 µg/mL avec un ratio effecteur/cible de 1/2. La brefeldine A bloque l'exocytose des cellules et permet ainsi d'évaluer par un marquage intra-cytoplasmique le nombre de cellules produisant de l'IFN-γ. Après une incubation de 6 heures à 37°C, le marquage est réalisé. Pour cela, les cellules sont fixées pendant 10 minutes à température ambiante dans du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde (Electron Microscopie Science). Après deux lavages, les cellules sont incubées en présence de l'anticorps anti-IFN-γ dilué dans du PBS contenant 0,1% de BSA et 0,1% de saponine (Sigma) pendant 30 minutes, à l'obscurité et à température ambiante. Deux lavages successifs sont ensuite réalisés avec du PBS 0,1% BSA et 0,1% saponine, et les cellules sont re-suspendues dans 150 µL de PBS. Leur fluorescence est ensuite analysée par cytométrie en flux.

La présence de cellules spécifiques dans un puits est observée par un pic de fluorescence uniquement lorsque les lymphocytes sont mis en contact avec les cellules T2 chargées en peptides. Le pourcentage de cellules spécifiques est ensuite déterminé en soustrayant « le pourcentage de cellules produisant de l'IFN-γ en condition cellules T2 non chargées » au « pourcentage de cellules produisant de l'IFN-γ lorsque les cellules T2 sont chargées en peptides ».

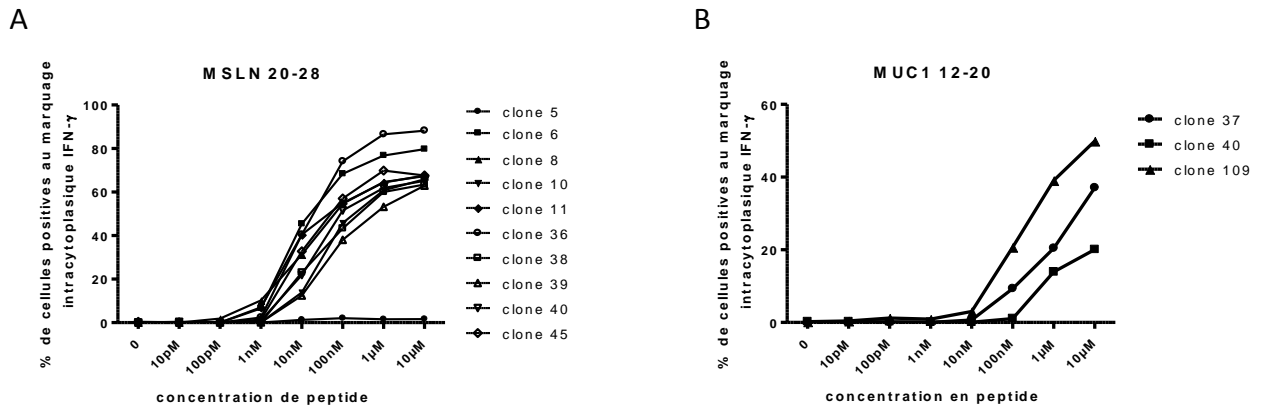
### **Clonage des lymphocytes T CD8+**

Les cellules provenant des cultures polyclonales contenant des lymphocytes T CD8+ spécifiques des peptides sont clonées par dilution limite. Des plaques 96 puits à fond rond sont ensemencées avec un mélange de  $1.10^7$  PBMCs et de  $1.10^6$  LAZ (par plaque), irradiés respectivement à 35 et 70 grays. Ce mélange va jouer le rôle de cellules « nourricières » en conditionnant le milieu. Ces cellules sont déposées dans du RPMI contenant 8% de pSH, de la phytohé magglutine-L à une concentration de 1 µg/mL (Sigma) et de l'IL-2 à une concentration de 150 U/mL. Les lymphocytes T sont ensemencés dans ces plaques 96 puits à une concentration théorique de 100, 10, 1 et 0,5 cellules/puits. Au bout de 5 jours, la moitié du milieu est remplacée par du RPMI 1640 contenant 8% de pSH et 150 U/mL d'IL-2 et chaque culture est ensuite suivie individuellement avec des changements de milieu adaptés à la prolifération observée au microscope. Au bout de 15 jours environ, un test TNF-α est réalisé sur les puits ayant proliférés. Les cellules des puits positifs répondant au peptide dans la condition 0,5 lymphocytes/puits sont alors récupérées afin de réaliser une expansion de ces populations lymphocytaires. Cette expansion est réalisée selon le même principe que celui du clonage avec 2000 à 10 000 lymphocytes déposés par puits sur les cellules « nourricières ». Au bout de 10 à 15 jours, lorsque les lymphocytes sont dans un état moins actif, ils peuvent être congelés, et une partie est conservée afin de les caractériser.

### **Dose réponse des clones pour le peptide**

La capacité des clones à répondre à une concentration décroissante de peptide a été analysée. Pour cela, les clones sont co-cultivés avec des cellules T2 chargées par différentes concentrations de peptides. Une dilution en cascade au 1/10 est réalisée en partant d'une concentration de 10 µM jusqu'à une concentration de 10 pM. La réponse des clones est observée par cytométrie en flux au moyen d'un marquage intra-cytoplasmique de l'IFN-γ produit par le clone lymphocytaire.

J'ai en premier lieu obtenu différents clones T dirigés contre les épitopes HLA-A\*0201+/MSLN (20-28) et HLA-A\*0201+/MUC1 (12-20). Après amplification de ces clones, j'ai vérifié leur spécificité en testant leur réponse à différentes concentrations de peptides (figure 22). Au total, 10 clones spécifiques de l'épitope HLA-A\*0201+/MSLN (20-28) et trois clones spécifiques de l'épitopes HLA-A\*0201+/MUC1 (12-20) ont été testés.



**Figure 22: Dose réponse des clones MSLN 20-28 (A) et MUC1 12-20 (B) aux cellules T2 chargées par différentes concentrations en peptide**

Les cellules T2 ont été chargées par différentes concentrations du peptide MSLN 20-28 (figure 20 A) ou MUC1 12-20 (figure 20 B). On peut observer que l'ensemble des clones spécifiques de la MSLN a une réponse similaire. Plus particulièrement, le clone 11 s'active à partir d'une très faible concentration en peptide d'1nM, puisqu'il y a 7,02 % de cellules positives au marquage IFN- $\gamma$  et ce pourcentage augmente pour atteindre un maximum de 67,60% pour une concentration de 1 $\mu$ M. La réponse des 6 autres clones est très similaire à la réponse du clone 11 (figure 20 A) suggérant qu'ils sont probablement identiques. Concernant les clones dirigés contre les épitopes MUC1 12-20, j'ai observé que le clone 37 s'active à partir d'une concentration de 100nM puisqu'il y a 9,31% de cellules positives au marquage IFN- $\gamma$  et ce pourcentage atteint 49,2% à 10 $\mu$ M. Cependant, aucun plateau n'a été atteint par les 3 clones analysés (figure 20 B).

La réponse de ces clones aux cellules tumorales HLA-A\*0201+ exprimant MSLN et MUC1 a ensuite été testée. Pour cela, les cellules tumorales ont été traitées avec de l'IFN- $\gamma$  afin d'augmenter l'expression, à leur surface, des molécules HLA de classe I, et donc d'augmenter la capacité des cellules tumorales à présenter des peptides antigéniques. Cependant, aucune réponse contre les cellules

tumorales n'a pu être détectée. La présentation de ces épitopes par les cellules tumorales, n'a donc pas pu être validée.

A la suite de ce travail, un clone dirigé contre l'épitope HLA-A\*0201+/MUC1 (950-958) a été obtenu. Ce clone est capable de reconnaître spécifiquement les lignées tumorales de MPM HLA-A\*0201+. L'expression de l'antigène MUC1 et la présentation de l'épitope MUC1 (950-958) ont donc été caractérisées sur la collection de lignées de MPM et a permis de déterminer que MUC1 est un antigène d'intérêt pour l'immunothérapie du MPM. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication [396] présentée dans la partie suivante.

Article 1 : **Recognition of pleural mesothelioma by mucin-1(950-958)/human leukocyte antigen A\*0201-specific CD8+ T-cells.** Roulois D, Vignard V, Gueugnon F, Labarrière N, Grégoire M, Fonteneau JF. Eur Respir J. 2011 Nov;38(5):1117-26.

#### RESULTATS PRINCIPAUX :

Dans cet article, nous montrons que l'antigène MUC1 est un candidat intéressant pour une approche d'immunothérapie du MPM. En effet, nous avons démontré que l'ensemble des lignées de MPM exprime la protéine MUC1, avec une importante variation de l'état de glycosylation de cette dernière. Nous avons obtenu deux clones T CD8+ dirigés contre l'épitope HLA\*A0201+/MUC1 (950-958). J'ai dans un premier temps caractérisé ces deux clones : affinité de réponse au peptide et séquençage de la région CDR3 hypervariable. Nous avons observé que le clone N5.14 est plus affin vis-à-vis du complexe HLA-peptide que le clone N32.10 puisqu'il répond à des concentrations en peptide plus faibles. Le résultat suggérait que les deux clones étaient différents. Afin de le confirmer, j'ai séquencé leur région CDR3 $\beta$  hypervariable et montré qu'ils exprimaient bien un CDR3 $\beta$  différent. D'une manière intéressante, seul le clone le plus affin pour le complexe HLA-peptide est capable de reconnaître les lignées tumorales du MPM dans un contexte HLA-A\*0201. L'ensemble du travail a donc été poursuivi avec ce clone. Nous avons caractérisé la réponse de ce clone vis-à-vis des cellules tumorales afin de confirmer sa spécificité. Le clone ne reconnaît ni les cellules tumorales HLA-A\*0201+ chargées avec un peptide irrelevant, ni les cellules HLA-A\*0201+ n'exprimant pas MUC1 et enfin ni les cellules tumorales exprimant MUC1 mais pas le HLA-A\*0201+. Nous avons également décrit que toutes les lignées tumorales HLA-A\*0201+ exprimant MUC1 sont effectivement reconnues par ce clone T N5.14, et que cette reconnaissance conduit à la lyse des cellules tumorales ciblées. Dans la littérature, il est également décrit que le niveau de glycosylation des lignées tumorales peut avoir un impact sur la reconnaissance de celles-ci par les lymphocytes T spécifiques de MUC1. Afin d'étudier l'importance des glycosylations dans la reconnaissance des cellules de MPM par le clone N5.14, les cellules tumorales de MPM ont été traitées avec un inhibiteur des O-glycosylations, le BGN. D'une manière surprenante, nous avons remarqué que l'activation spécifique du clone N5.14 était indépendante de l'état d'O-glycosylation des cellules tumorales.

Cette étude a permis de mettre en évidence que l'antigène MUC1 est une cible potentielle dans une approche d'immunothérapie du MPM. Il serait donc intéressant de déterminer si les stratégies actuellement en essai clinique et ciblant MUC1, comme le vaccin thérapeutique MVA-MUC1-IL2 TG4010 de Transgène utilisé dans le cancer du poumon, pourraient être appliquées dans le MPM.

---

Eur Respir J 2011; 38: 1117–1126  
 DOI: 10.1183/09031536.00160210  
 Copyright ©ERS 2011



## Recognition of pleural mesothelioma by mucin-1(950–958)/human leukocyte antigen A\*0201-specific CD8+ T-cells

D. Roulois<sup>a,\*</sup>, V. Vignard<sup>a</sup>, F. Gueugnon<sup>a</sup>, N. Labarrière<sup>a,\*</sup>,  
 M. Grégoire<sup>a,\*</sup> and J-F. Fonteneau<sup>a,\*</sup>

**ABSTRACT:** Recent clinical investigations have demonstrated that T-cell-based immunotherapy of malignant pleural mesothelioma (MPM) could represent an alternative to the other therapeutic strategies. However, its development suffers from the lack of identified tumour antigenic targets. Mucin (MUC)1, which is expressed and recognised by cytotoxic T-cells in numerous cancer types, has not been investigated as a potential immune target in MPM. Thus, the objective of this study was to analyse MUC1 expression by MPM cells and to determine whether this antigen can be the target of cytotoxic CD8+ T-cells (cytotoxic T-lymphocytes (CTLs)).

We first evaluated the expression and glycosylation of MUC1 by MPM cell lines using different MUC1-specific monoclonal antibodies. We then obtained a CTL clone specific for a MUC1 peptide (residues 950–958) presented by human leukocyte antigen (HLA)-A\*0201 and studied its interferon- $\gamma$  and cytotoxic response to MPM cell lines.

We found that all MPM cell lines expressed MUC1 protein at the cell surface with different glycosylation profiles. We also observed that HLA-A\*0201+ MPM cell lines are recognised and lysed by a HLA-A\*0201/MUC1(950–958)-specific CTL clone independently of the MUC1 glycosylation profile.

Thus, MUC1 expression and antigen presentation by MPM cells may represent an attractive target for immunotherapeutic treatment of MPM despite its hyperglycosylated profile.

**KEYWORDS:** Cytotoxic T-cells, glycobiology, immune response, mesothelioma, mucin 1

**M**alignant pleural mesothelioma (MPM) is an aggressive tumour of the pleura, usually associated with chronic asbestos exposure. Incidence is increasing and is expected to peak around the year 2020 in the western world and continue to rise in developing countries [1].

Clinical strategies developed as MPM treatments, including chemotherapy, radiotherapy and surgery, are of limited efficacy [2]. However, MPM case reports and recent clinical trials describe the use of T-cell-based immunotherapy as an interesting alternative in mesothelioma treatment [3]. Indeed, previous observations have demonstrated correlation between the presence of lymphocytic infiltrate and better prognosis [4–7]. Furthermore, we previously showed, in pre-clinical studies, that cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) can be generated against MPM [8, 9]. More recently, HEGMANS *et al.*

[10] reported that injection of patients with dendritic cells (DCs) pulsed with an autologous tumour cell lysate is capable of inducing a CTL response against MPM.

The limit to the development of T-cell-based immunotherapeutic treatments of MPM is the lack of well characterised tumour-associated antigens (TAAs) recognised by T-cells. In the literature, recognition of MPM cells by TAA-specific CTLs has rarely been described and has not been analysed in details. YOKOKAWA *et al.* [11] showed that a CTL line specific for residues 547–556 of mesothelin and human leukocyte antigen (HLA)-A\*0201 was able to lyse three mesothelin+HLA-A\*0201+ MPM cell lines, and similarly, a study by MAY *et al.* [12] showed that a CTL line specific to residues 122–140 of the Wilms' tumour 1 (WT1) oncoprotein and HLA-A\*0201 was able to lyse one WT1+ HLA-A\*0201+ MPM cell line.

**AFFILIATIONS**  
<sup>a</sup>INSERM, U802, Institut de Recherche Thérapeutique, and <sup>b</sup>Université de Nantes, Faculté de médecine, Nantes, France.

**CORRESPONDENCE**  
 J-F. Fonteneau  
 INSERM, U802  
 Institut de Recherche Thérapeutique  
 Université de Nantes  
 8 quai Mauceau  
 BP70721  
 44007 Nantes Cedex 1  
 France  
 E-mail: jean-francois.fonteneau@inserm.fr

Received  
 Oct 12 2010  
 Accepted after revision  
 April 08 2011  
 First published online  
 May 03 2011

This article has supplementary material available from [www.erj.ersjournals.com](http://www.erj.ersjournals.com)

European Respiratory Journal  
 Print ISSN 0903-1936  
 Online ISSN 1399-3003

An additional TAA of interest is the mucin (MUC)1 antigen. This highly glycosylated type I transmembrane glycoprotein, with a variable number of 20-amino acid repeat sequences referred to as variable number tandem repeats (VNTRs), is now described as one of the most interesting targets for cancer immunotherapy [13, 14]. It was originally reported that VNTR sequences can be specifically recognised by CD8+ CTLs on the surface of numerous cancer cell types (breast cancer, pancreatic cancer and multiple myeloma) in a HLA class I-unrestricted fashion [15]. This recognition was dependent on a tumour-specific hypoglycosylation profile of MUC1 [16, 17], which is not present in normal cells [18]. More recently, classical recognition of MUC1 peptides in association with HLA class I molecules on the surface of tumour cells by CTLs has also been demonstrated. One HLA-A1-restricted and several HLA-A\*0201-restricted epitopes of MUC1, notably MUC1(950-958), which is recognised by CTLs on the surface of tumour cells, have been described [19-22] but not investigated in MPM.

To date, it is known that MUC1 is overexpressed by MPM cells compared with normal mesothelioma cells [23]. Thus, MUC1 could represent an attractive TAA to target CTL responses against MPM. To assess this, we analysed MUC1 expression and glycosylation by MPM cells, obtained different MUC1(950-958)/HLA-A\*0201-specific CTL clones from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of a HLA-A\*0201+ healthy donor, and studied their response against MPM cell lines. We found that the most highly reactive CTL clone recognised and lysed HLA-A\*0201+ MPM tumour cells, independently of the MUC1 glycosylation profile. This result suggests that MUC1 may be a good TAA candidate for the development of T-cell-based immunotherapy for MPM.

## MATERIALS AND METHODS

### Tumour cell culture

Pleural effusions were collected by thoracocentesis, and diagnosis was established by immunohistochemical and immunocytochemical labelling. All patients gave signed, informed consent. Human MPM cell lines (Meso4, Meso13, Meso34, Meso35, Meso45, Meso47, Meso56, Meso62, Meso96, Meso122, Meso144 and Meso148) were obtained from pleural effusions. They were established and characterised for several specific markers in our laboratory. The method of isolation of these cell lines is described elsewhere [24]. They all displayed an epithelioid phenotype. Human breast cancer cell lines MDA-MB231 (established by R. Cailleau, M.D. Anderson Hospital, Houston, TX, USA) and MCF-7 (established by B.J. Sugarman, Genentech Inc., San Francisco, CA, USA) were obtained respectively from D. Jäger (Klinik für Oncologie, Zürich, Switzerland) and from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cell lines were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 100 U·mL<sup>-1</sup> penicillin, 0.1 mg·mL<sup>-1</sup> streptomycin and 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, Lyon, France). The T2 cell line (gift from T. Boon, Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels, Belgium) is a HLA-A\*0201+ human T-cell leukaemia/B-cell line hybrid defective for transporter associated with antigen processing (TAP)1 and TAP2, thus expressing empty HLA class I molecules at its surface that can be loaded with exogenous peptide [25]. Cells were cultured in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. In some experiments, tumour cell lines were

cultured for 24 h with 500 IU·mL<sup>-1</sup> interferon (IFN)- $\gamma$  (Abcys, Paris, France), or for 48 h with 5 mM benzyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-galactopyranoside (BGN) (Sigma-Aldrich) during the first 24 h.

### Antibodies and peptides

Phycerythrin (PE)-conjugated mouse anti-human IFN- $\gamma$  monoclonal antibody (mAb), mouse anti-human HLA-A2 mAb (clone BB7.2) and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse immunoglobulin (Ig)G1k isotype control mAb were purchased from BD (Le Pont-De-Clair, France). Mouse anti-human MUC1 (clones HMFG-1 and SM3) mAbs were purchased from Abcam (Paris, France). Mouse anti-human MUC1 (clone VU-3C6) mAb was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France). FITC-conjugated anti-human CD58 mAb, FITC-conjugated anti-human HLA-ABC mAb and PE-conjugated goat F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse IgG (heavy and light chains (H+L)) were purchased from Beckman Coulter (Roissy, France). FITC-conjugated anti-human CD54 mAb was purchased from R&D Systems (Lille, France). MUC1(950-958), STAPPVHNV and mesothelin (530-538), VLPLTVAEV peptides were purchased from Eurogentec (Angers, France). Peptides were  $\geq 95\%$  pure.

### T-cell priming

Blood from HLA-A\*0201+ healthy donors was obtained from the Etablissement Français du Sang (Nantes, France). Induction of MUC1(950-958)/HLA-A\*0201+ specific CD8+ T-cells was performed as we described previously but with minor modifications [26]. Briefly, T-cells were co-cultured in RPMI 1640 supplemented with 8% pooled human serum (pHS) produced locally with monocyte-derived DCs differentiated for 5 days with 1,000 IU·mL<sup>-1</sup> granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Abcys) and 200 U·mL<sup>-1</sup> interleukin (IL)-4 (Abcys), then matured for 24 h with 50  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> polyinosinic:polycytidylic acid (Sigma-Aldrich) and 20 ng·mL<sup>-1</sup> tumour necrosis factor- $\alpha$  (Abcys), and pulsed for 2 h with 10  $\mu$ M of MUC1(950-958) peptide. T-cell cultures were re-stimulated weekly with peptide-pulsed DCs in the presence of 10 U·mL<sup>-1</sup> IL-2 (Proleukin; Chiron Corp., Emeryville, CA, USA) and 5 ng·mL<sup>-1</sup> IL-7 (R&D Systems). 6 days after the third stimulation, an aliquot of each T-cell culture was used to evaluate the percentage of MUC1(950-958)-specific T-cells by IFN- $\gamma$  intracytoplasmic staining.

### T-cell clones

Cells from polyclonal cultures containing MUC1(950-958)-specific T-cells were cloned by limiting dilution as we previously described [26]. Briefly, T-cells were plated in U-bottom 96-well plates with irradiated (35 Gy) feeder cells ( $1 \times 10^5$  allogenic PBMCs and  $1 \times 10^4$  Epstein-Barr virus-transformed B-cells per well), at concentrations of 10, 1 or 0.5 T-cells per well. The stimulatory medium consisted of RPMI 1640 containing 8% pHS, 150 U·mL<sup>-1</sup> IL-2 and 1  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> phytohaemagglutinin L (Sigma-Aldrich). After 2 weeks, each clone was tested for peptide specificity. Specific clones were maintained in culture by periodic re-stimulation.

### Complementarity-determining region 3 $\beta$ sequencing

RNA from  $5 \times 10^6$  cells from each T-cell clone was extracted with the RNable reagent (Eurobio, Ullis, France) according to the manufacturer's instructions and dissolved in 15  $\mu$ L water.

Reverse transcription, PCR amplification and sequencing were performed as described previously [27]. We followed the T-cell receptor (TCR) nomenclature established by ARDEN *et al.* [28].

#### Immunofluorescence and flow cytometry

For membrane staining,  $1 \times 10^5$  cells were incubated at 4°C for 30 min with  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  specific or isotype-control mAb and washed. mAb dilution and washing were performed using PBS containing 0.1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich). When unconjugated mAbs were used, a second incubation with PE-conjugated goat F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse IgG (H+L) was performed. Fluorescence was analysed by flow cytometry (FacsCalibur; BD) using Cellquest software (BD). Relative fluorescence intensity (RFI) was calculated as the sample mean fluorescence divided by the isotype-control mean fluorescence.

For IFN- $\gamma$  intracytoplasmic staining, T2 or tumour cell lines were plated at  $1 \times 10^5$  cells-well<sup>-1</sup> in a 96-well plate. Beforehand, cells were pulsed with different concentrations of MUC1(950-958) for 1 h at 4°C and then washed. They were co-cultured with  $5 \times 10^4$  cells of the MUC1-specific CD8+ T-cell clone in media containing  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  brefeldin A (Sigma-Aldrich) for 6 h at 37°C. Cells were then fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. Cell membranes were permeabilised with PBS containing 0.1% BSA and 0.1% saponin, incubated with PE-conjugated mouse anti-human IFN- $\gamma$  mAb for 30 min at room temperature and then washed. Production of IFN- $\gamma$  was determined by flow cytometry gated for T-cells (FacsCalibur; BD).

#### Intracellular Ca<sup>2+</sup> level video imaging

Measurement of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels was performed with CD8+ T-cell clone N5.14 loaded with 1 mM Fura-2/acetoxymethyl ester (Molecular Probes; Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) for 1 h at room temperature in Hank's balanced salt solution (HBSS). T-cells were washed, resuspended in HBSS with 1% FCS and seeded on Lab-Tek glass chamber slides (Nunc, Naperville, IL, USA) coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich). T-cells were co-cultured with tumour cells that were left to adhere to glass slides for 1 h at 37°C before addition of T-cells. Measurements of intracellular Ca<sup>2+</sup> responses were performed at 37°C with a DMI 6000 B microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France). Cells were illuminated every 15 s with a 300-W xenon lamp using 340/10- and 380/10-nm excitation filters. Emission at 510 nm was used for analysis of Ca<sup>2+</sup> responses, and captured with a CoolSNAP HQ2 camera (Roper, Tucson, AZ, USA) and analysed with Metafluor 7.1 imaging software (Universal Imaging, Downingtown, PA, USA).

#### <sup>51</sup>Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> cytotoxicity assay

Tumour cell lines were incubated with <sup>51</sup>Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> (PerkinElmer, Boston, MA, USA) for 1 h at 37°C.  $1 \times 10^5$  tumour cells (target) were then washed and co-cultured with a MUC1-specific CD8+ T-cell clone (effector) in a 96-well plate for 4 h at 37°C in triplicate. Effector/target ratios of 2/1, 10/1 and 50/1 were used. After a 4-h incubation at 37°C, 25  $\mu\text{L}$  of each supernatant was collected and added to 100  $\mu\text{L}$  scintillation liquid cocktail (OptiPhase Supermix; PerkinElmer) before liquid scintillation counting. The percentage of specific lysis was calculated as  $100 \times (\text{experimental release} - \text{spontaneous$

release)/(maximum release - spontaneous release). The spontaneous release of <sup>51</sup>Cr was determined from target cells cultured alone. The maximum release of <sup>51</sup>Cr was obtained from target cells that were lysed in media containing 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich).

## RESULTS

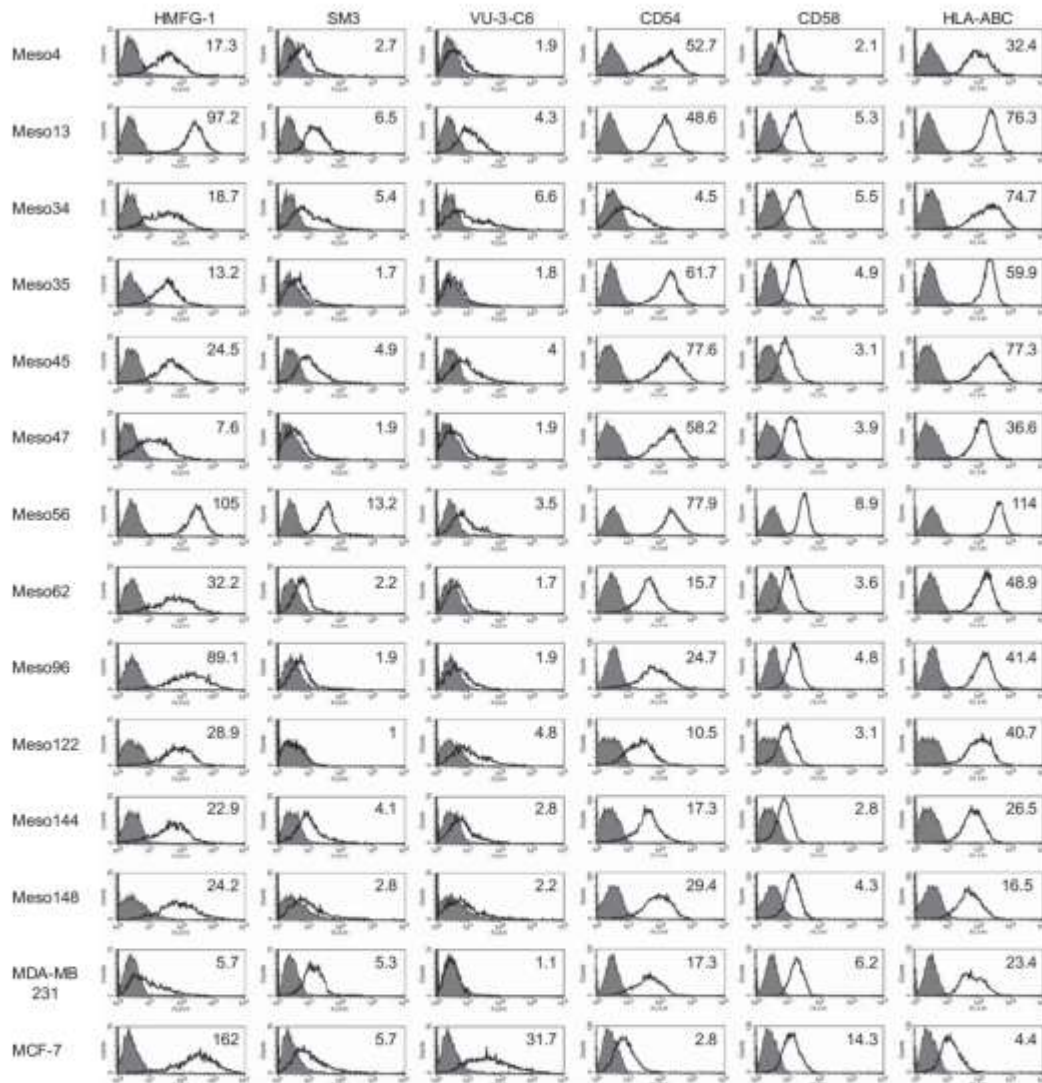
### MUC1 expression by MPM cells

We first performed a real-time PCR experiment to determine whether the MUC1 gene was transcribed. Variable levels of MUC1 transcript were detected in all MPM lines tested (data not shown). We then used flow cytometry to study the expression of MUC1 protein and molecules involved in peptide presentation and T-cell activation (CD54, CD58 and HLA class I) on the surface of a large collection of MPM cell lines (fig. 1). We used a combination of three monoclonal antibodies that distinguishes different glycosylation states of MUC1: HMFG-1, SM3 and VU-3-C6 [29]. Clone HMFG-1 recognises glycosylated and hypoglycosylated forms of MUC1, whereas clones SM3 and VU-3-C6 are specific for hypoglycosylated forms. Furthermore, these antibodies recognised the MUC1 VNTR motif, which is a 20-amino acid repeated sequence whose number varies from 20 to 125 repeats depending on the MUC1 alleles expressed. Thus, staining intensity with these antibodies not only reflects the quantity of MUC1 at the cell surface, but is also dependent on the number of VNTRs present in MUC1. Using the HMFG-1 mAb, we observed that MUC1 is expressed on the surface of all MPM cell lines tested (fig. 1). However, the staining level is variable among MPM cell lines RFI ranging from 7.6 for Meso47 to 105.2 for Meso56. These staining levels are slightly lower than the one observed for MCF-7, a breast cancer cell line known to be recognised by MUC1-specific CD8+ T cells [20]. More staining heterogeneity was observed using the two mAbs specific for hypoglycosylated forms of MUC1. Some MPM cell lines, such as Meso35, Meso47, Meso96 and Meso148, were negative or slightly stained (RFI < 2), whereas other MPM cell lines, such as Meso13 and Meso56 were more markedly stained (RFI > 5). Furthermore, some MPM cell lines were stained preferentially by one of the two mAb specific of different hypoglycosylated forms, such as Meso56 and Meso122, which are preferentially stained by SM3 and VU-3-C6, respectively. Together, these results suggest that all MPM cell lines express MUC1 with differences in the level and the type of glycosylation.

We also analysed the expression of molecules implicated in CD8+ T-cell activation, such as HLA-ABC (HLA class I), CD54 (intercellular adhesion molecule-1) and CD58 (lymphocyte function associated antigen-3) on MPM cells. All MPM cell lines stained positively for these molecules with the exception of Meso34, which expressed a low level of CD54 molecules (fig. 1). Thus, all MPM cell lines seem to be equipped to activate a MUC1-specific CD8+ T-cell response.

### HLA-A\*0201-restricted, MUC1(950-958)-specific CD8+ T-cell clones

To determine whether MUC1 is a tumour antigen that can be recognised by CTLs on the surface of MPM cells, we generated HLA-A\*0201-restricted CD8+ T-cell clones against the MUC1(950-958) peptide. This peptide is presented in association with the HLA-A\*0201 molecule to CD8+ T-cells in numerous cancer types [20, 21]. PBMCs from HLA-A\*0201+

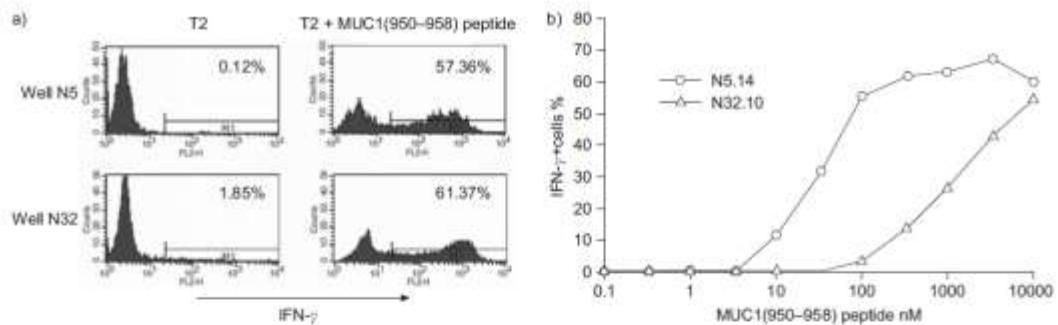


**FIGURE 1.** Expression of mucin (MUC)1, CD54, CD58 and human leukocyte antigen (HLA) class I molecules by malignant pleural mesothelioma (MPM) cell lines. MPM cells (Meso4, 13, 34, 35, 45, 47, 56, 62, 96, 122, 144 and 148) and breast cancer cells (MDA-MB231 and MCF-7) were stained with MUC1- (clones HFMG-1, SM3 and VU-3-C6), CD54-, CD58- or HLA-ABC-specific monoclonal antibodies. Fluorescence was analysed by flow cytometry. Grey histograms represent isotype control staining and white histograms MUC1-, CD54-, CD58- or HLA class I-specific staining. Relative fluorescence intensity is shown on each histogram. This figure is representative of three experiments.

healthy donors were stimulated three times with MUC1(950-958) peptide-pulsed autologous DCs, at 1-week intervals. 6 days after the third stimulation, the presence of MUC1(950-958)-specific T-cells was determined by measuring IFN- $\gamma$ -producing cells in response to unpulsed or MUC1(950-958) peptide-pulsed

TAP-deficient T2 cells. We found MUC1(950-958)-specific CD8+ T-cells in nine out of 80 microcultures, with five cultures containing >10% of T-cells specific for this epitope. By limiting-dilution cultures, we then isolated two T-cell clones, N5.14 and N32.10, from the two wells that contained the highest fraction of





**FIGURE 2.** Characterisation of mucin (MUC1(950-958)/human leukocyte antigen (HLA)-A\*0201-specific T-cell clones N5.14 and N32.10. MUC1(950-958)-pulsed HLA-A\*0201+ mature dendritic cells were used to stimulate autologous T-cells. Cultures were then re-stimulated weekly. *a)* At 6 days after the third stimulation, an aliquot of each T-cell culture was exposed to unpulsed or MUC1(950-958)-pulsed T2 cells. Interferon (IFN)- $\gamma$  production by T-cells was measured by intracytoplasmic IFN- $\gamma$  staining and flow cytometry analysis with a gate set on T-cells. *b)* N5.14 and N32.10 CD8+ T-cell clones were cultured with T2 cells pulsed with different concentrations of MUC1(950-958) peptides. IFN- $\gamma$  production by T-cell clones was measured by intracytoplasmic IFN- $\gamma$  staining and flow cytometry analysis gated for T-cells. The figure is representative of three experiments.

MUC1(950-958)-specific T-cells: wells N5 and N32 (fig. 2a). To ensure their clonality, we sequenced their complementarity-determining region (CDR3 $\beta$ ) and found that they both expressed a single TCR  $\beta$ -chain with a single CDR3 region (table 1). We then measured their reactivity against MUC1(950-958) peptide presented by HLA-A\*0201+ T2 cells. We observed that clone N5.14 (median effective concentration (EC<sub>50</sub>) mean  $\pm$  SEM 25.7  $\pm$  4.4 nM) has a higher avidity than clone N32.10 (EC<sub>50</sub> 866.7  $\pm$  185.6 nM), since it recognised  $\sim$ 34 times less peptide (fig. 2b). We also observed that both clones' responses to MUC1(950-958) peptide presented by T2 cells were inhibited by the presence of an anti-HLA-A\*0201 mAb (clone BB7.2) in the co-culture (data not shown), confirming their HLA-A\*0201 restriction.

**Recognition of HLA-A\*0201+ MPM cells by HLA-A\*0201-restricted, MUC1(950-958)-specific CD8+ T-cell clones**

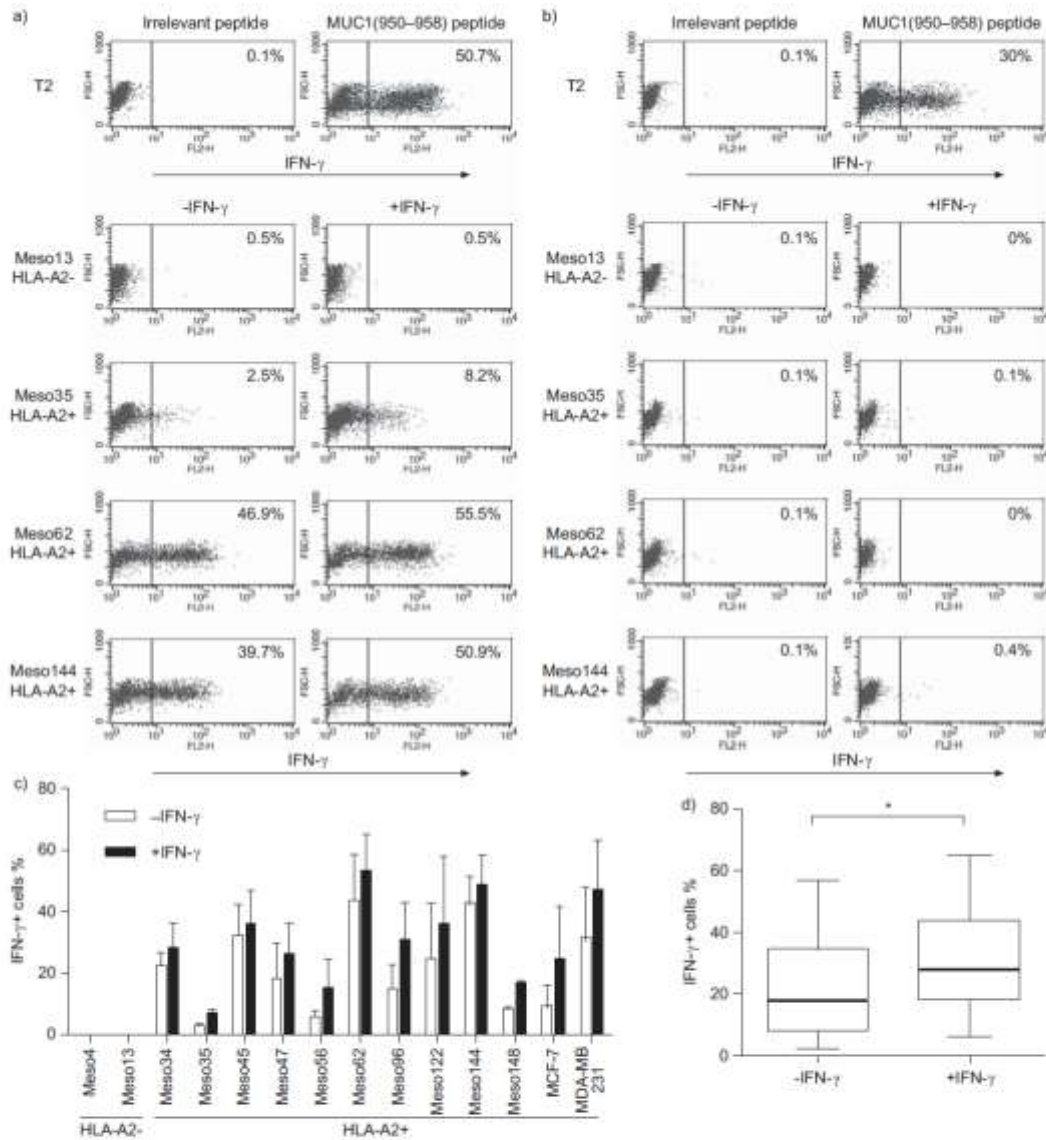
To determine whether HLA-A\*0201+ MPM cells are recognised by MUC1(950-958)/HLA-A\*0201-specific T-cell clones, we first co-cultured the two clones with either unpulsed or peptide-pulsed T2 cells as controls. We also analysed and compared the clone responses when exposed to an HLA-A\*0201- MPM cell

line, Meso13, or three HLA-A\*0201+ MPM cell lines, Meso35, Meso62 and Meso144 (fig. 3a and b). As expected, the two clones responded to MUC1(950-958) peptide-pulsed T2 cells and did not produce IFN- $\gamma$  when co-cultured with the HLA-A\*0201- Meso13 cell line. However, only clone N5.14, which displayed the best avidity toward the peptide (fig. 2c), responded strongly to two HLA-A\*0201+ MPM cell lines, Meso62 and Meso144, and weakly to the third HLA-A\*0201+ line, Meso35 (fig. 3a). The other clone, N32.10, which exhibited a lower avidity, was not able to recognise the three HLA-A\*0201+ MPM cell lines (fig. 3b), except if the tumour cells were pulsed with peptides (data not shown). In this experiment, we also tested the response of the clones against the MPM cell lines treated 48 h beforehand with IFN- $\gamma$ , which is known to increase the expression of molecules implicated in antigen presentation (CD54, CD58 and HLA class I) and also MUC1 expression (online supplementary fig. 1). IFN- $\gamma$ -treated HLA-A\*0201+ MPM cell lines were better recognised by clone N5.14 compared with untreated cell lines. However, the IFN- $\gamma$  treatment did not lead to the recognition of the three HLA-A\*0201+ MPM cell lines by the other clone, N32.10.

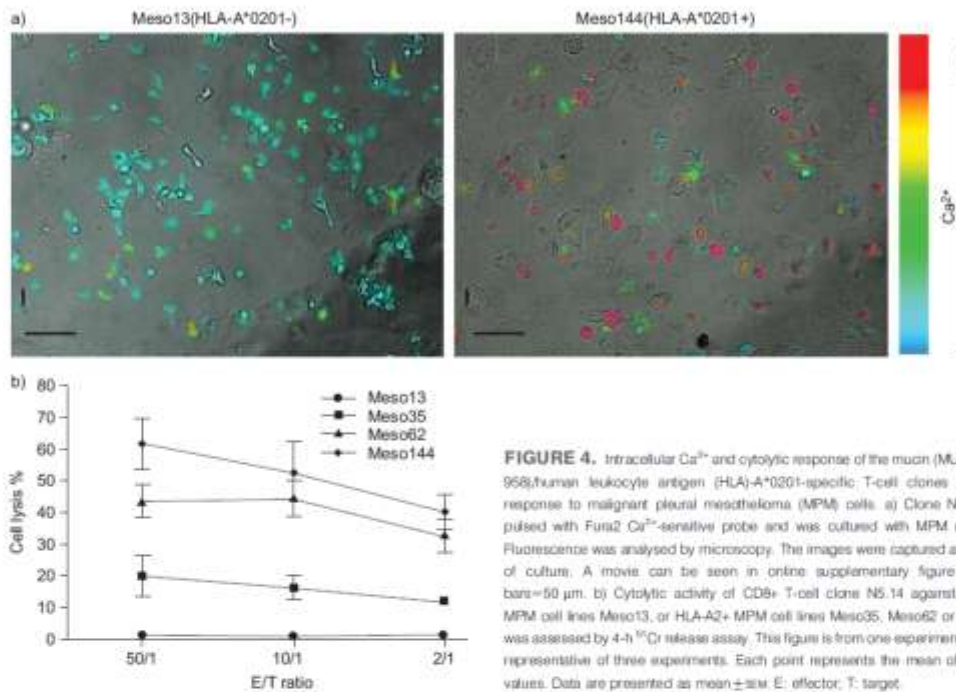
We extended this experiment to test the recognition by the two clones of all the HLA-A\*0201+ MPM cell lines available in our laboratory. The T-cell clone N5.14 responded to all HLA-A\*0201+ MPM cell lines tested. This response was, in most cases, increased after the treatment of the tumour cell lines with IFN- $\gamma$ , especially if the IFN- $\gamma$  production by the clone was low in response to untreated tumour cell lines (fig. 3c). This increase was significant ( $p=0.0164$  by Mann-Whitney U-test) when results against all MPM cells lines were pooled together (fig. 3d). In contrast, the clone N5.14 did not respond to the two HLA-A\*0201- MPM cell lines, Meso4 and Meso13. The other CD8+ T-cell clone, N32.10, failed to recognise any MPM cell lines (data not shown). These results suggest that the avidity of MUC1(950-958)-specific T-cells should be high enough to allow recognition of the naturally processed and presented peptide by MPM cells.

TABLE 1 T-cell receptor (TCR) $\beta$ -chain complementarity-determining region (CDR3) sequences			
Clone	V $\beta$	CDR3	J $\beta$
N5.14	BV201	CSA GLRGNT EAFFGQG	BJ151
N32.10	BV9	CAS APSGLAGRDT QYFG	BJ293

Mucin (MUC1(950-958)/human leukocyte antigen (HLA)-A\*0201-specific CD8+ T-cell clones N5.14 and N32.10 were obtained by limiting dilution cultures of wells N5 and N32 respectively. Their T-cell receptor  $\beta$ -chain complementarity-determining region CDR3 sequences were determined. Italics represent the hypervariable region. V $\beta$ : variable region of TCR $\beta$ ; J $\beta$ : joining region of TCR $\beta$ .



**FIGURE 3.** Recognition of malignant pleural mesothelial (MPM) tumour cells by mucin (MUC) 1(950-958)/human leukocyte antigen (HLA)-A\*0201-specific T-cell clones N5.14 and N32.10. **a)** N5.14 and **b)** N32.10 CD8+ T-cell clones were cultured with HLA-A\*0201- (Meso13) or HLA-A\*0201+ (Meso62 or Meso144) MPM cell lines, or T2 cells pulsed with 10 μM MUC1(950-958) peptide or an irrelevant mesothelin (530-536) peptide. Interferon (IFN)-γ production by T-cell clones was measured by intracytoplasmic IFN-γ staining and flow cytometry analysis gated for T-cells. Data are from one experiment that was representative of three. **c** and **d)** The CD8+ T-cell clone N5.14 was cultured with MPM cell lines (Meso04, 13, 34, 35, 45, 47, 56, 62, 96, 122, 144 and 148) or breast cancer cell lines (MCF-7 or MDA-MB231). Tumour cells were treated or not with IFN-γ before co-culture with T-cell clone N5.14. IFN-γ production by T-cell clones was measured by intracytoplasmic IFN-γ staining and flow cytometry gated for T-cells. **c)** Histograms represent the mean percentage of cells secreting IFN-γ in response to each MPM cell line obtained in three independent experiments. **d)** Box and whiskers plots of the percentage of N5.14 T-cells secreting IFN-γ in response to all HLA-A\*0201+ MPM cell lines obtained in three independent experiments with a Mann-Whitney statistical analysis. — median; box: interquartile range; whiskers: range. \*, p < 0.05.



**FIGURE 4.** Intracellular  $Ca^{2+}$  and cytolytic response of the mucin (MUC1)(950-958)/human leukocyte antigen (HLA)-A\*0201-specific T-cell clones N5.14 in response to malignant pleural mesothelioma (MPM) cells. a) Clone N5.14 was pulsed with Fura2  $Ca^{2+}$ -sensitive probe and was cultured with MPM cell lines. Fluorescence was analysed by microscopy. The images were captured after 8 min of culture. A movie can be seen in online supplementary figure 3. Scale bars=50  $\mu$ m. b) Cytolytic activity of CD8+ T-cell clone N5.14 against HLA-A2-MPM cell lines Meso13, or HLA-A2+ MPM cell lines Meso35, Meso62 or Meso144 was assessed by 4-h  $^{51}Cr$  release assay. This figure is from one experiment that was representative of three experiments. Each point represents the mean of triplicate values. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. E: effector; T: target.

Then, to control for the specificity of the clone N5.14, we performed two additional experiments. First, we confirmed that MPM recognition by the clone is HLA-A\*0201-restricted by adding an anti-HLA-A\*0201 mAb (clone BB7.2) in the T-cell clone/MPM cell line co-culture (online supplementary fig. 2a). We observed a 60–70% inhibition of the clone’s IFN- $\gamma$  response. Secondly, we assessed the response of clone N5.14 to HCT116, a HLA-A\*0201+ MUC1- colon cancer cell line (online supplementary fig. 2b). As expected, this tumour cell line was not recognised by clone N5.14, confirming its MUC1 specificity (online supplementary fig. 2c).

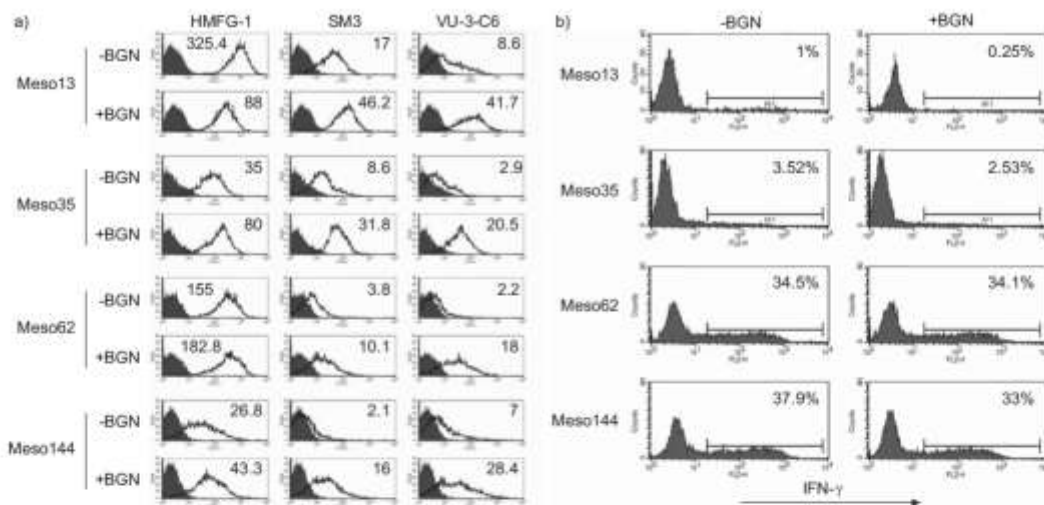
**Cytolytic activity of CD8+ T-cell clone N5.14 against MPM cell lines**

We first observed evidence of HLA-A\*0201+ MUC1+ MPM cell line lysis by clone N5.14 in a 50-min intracellular  $Ca^{2+}$  level imaging experiment (fig. 4a and online supplementary fig. 3). We observed that clone N5.14 was not activated in the presence of the HLA-A\*0201- MUC1+ MPM cell line Meso13. The clone moved from one tumour cell to another, scanning for specific HLA/peptide complexes, and tumour cells remained attached to the plastic. A few spikes of intracellular  $Ca^{2+}$  were observed in a few T-cells, but were not sustained. In contrast, when the clone was cultured with the HLA-A\*0201+ MUC1+ MPM cell line Meso144, the majority of T-cells stuck to tumour cells with a sustained intracellular  $Ca^{2+}$  increase. For the last 10 min, some tumour cells recognised by the clone detached from the plastic and started dying (online supplementary fig. 3).

Finally, we confirmed that recognition of HLA-A\*0201+ MPM cell lines by the clone N5.14 led to the lysis of tumour cells in a 4-h  $^{51}Cr$  release assay. Thus, we co-cultured clone N5.14 with two well-recognised HLA-A\*0201+ MPM cell lines, Meso62 or Meso144, or with one weakly recognised HLA-A\*0201+ MPM cell line Meso35, or with the nonrecognised HLA-A\*0201- line Meso13. We found that clone N5.14 was able to kill the three HLA-A\*0201+ MPM cell lines at levels that correlated with its response measured by intracellular IFN- $\gamma$  staining (fig. 4b). We used HLA-A\*0201- MPM cell line Meso13 as control and it was not killed by the clone.

**Glycosylation level of MUC1 does not affect recognition of HLA-A\*0201+ MPM cells by HLA-A\*0201-restricted, MUC1(950–958)-specific CD8+ T-cell clones**

We did not find a correlation between the level of recognition of HLA-A\*0201+ tumour cell lines by the clone, and the surface staining of MUC1, CD54, CD58 and/or HLA class I by tumour cells (figs 1 and 3c). However, staining with MUC1-specific mAbs not only reflects the quantity of surface MUC1, but also the VNTR sequences present in the MUC1 molecules. Furthermore, other parameters, such as MUC1 glycosylation status, could play a role in MUC1 presentation. Although several studies showed that recognition of MUC1 by T-cells is increased when this antigen is hypoglycosylated [17, 19], our study showed that the glycosylation status of MUC1 did not seem to affect recognition of MPM cells. Indeed, some cell lines, such as Meso62, with a very low level of MUC1 hypoglycosylation,



**FIGURE 5.** Inhibition of mucin (MUC)1 glycosylation by benzyl-2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranoside (BGN) restores staining with SM3 and VU-3-C6 monoclonal antibodies (mAbs), but does not affect recognition of malignant pleural mesothelioma (MPM) cells by the MUC1(950-958)/HLA-A\*0201-specific T-cell clone NS 14. a) MPM cells were cultured for 48 h with or without BGN, a competitive inhibitor of glycosylation, during the first 24 h. MPM cells were then stained with MUC1-specific mAbs HMFG-1, SM3 and VU-3-C6. Fluorescence was analysed by flow cytometry. Relative fluorescence intensity is shown on each histogram. b) The CD8+ T-cell clone NS 14 was cultured with MPM cell lines, with or without prior BGN treatment. Interferon (IFN)- $\gamma$  production by the T-cell clone was measured by intracellular IFN- $\gamma$  staining and flow cytometry gated for T-cells. This figure is representative of three experiments.

were well recognised by the T-cell clone. In contrast, Meso56, which exhibits the highest level of MUC1 hypoglycosylation, was one of the less well-recognised cell lines.

In addition, we used BGN, a competitive inhibitor of O-glycosylation, to reduce glycosylation of MUC1 in MPM cells, and then tested whether this treatment increased the recognition of MPM cells by the T-cell clone. As expected, when MPM cell lines were treated with BGN, MUC1 glycosylation was severely impaired, as SM3 and VU-3-C6 staining of MPM cell lines increased significantly, close to levels observed with HMFG-1 (fig. 5a). However, T-cell clone responses were similar in BGN-treated and -untreated cell lines (fig. 5b). This result confirms that the glycosylation status of MUC1 does not affect presentation of MUC1(950-958)/HLA-A\*0201 complexes on MPM cells and their recognition by CD8+ T-cells.

**DISCUSSION**

In this study, we have shown that all MPM cell lines express MUC1 with significant differences. The majority of MPM cell lines, such as Meso35 or Meso96, express normal MUC1 protein with low level of hypoglycosylation at the cell surface. Other MPM cell lines, such as Meso13 or Meso56, express a more hypoglycosylated MUC1. Using two different MUC1(950-958)/HLA-A\*0201-specific CD8+ T-cell clones, we also demonstrated that all HLA-A\*0201+ MPM cell lines in our study presented this epitope to the CD8+ T-cell clone with the highest affinity, whatever the MUC1 glycosylation profile. In addition, MUC1 peptide presentation led to the lysis of HLA-A\*0201+ MPM cell lines by this T-cell clone. Combined, these results suggest that MUC1 may be a good candidate as a tumour antigen for the

development of MPM immunotherapeutic treatments. However, the observation that the MUC1(950-958)/HLA-A\*0201-specific CD8+ T-cell clone with the lowest avidity does not recognise HLA-A\*0201+ MPM cell lines suggests that immunotherapeutic treatments of MPM should aim at inducing high-avidity T-cells against MUC1. Furthermore, monitoring of the T-cell responses against MUC1 in such treatments should be performed against tumour cells, instead of target cells pulsed with a high quantity of peptide.

Two other TAAs expressed by MPM and able to induce CD8+ T-cell response have been described summarily, mesothelin and WT1 [11, 12], since their recognition by peptide-specific T-cell lines was studied in a small number of MPM cell lines (one and three MPM cell lines, respectively). In our study, we thoroughly described MUC1 expression and glycosylation in 12 MPM cell lines and their recognition by a MUC1-specific CD8+ T-cell clone. Nonetheless, these studies and our own suggest that at least three different TAAs can be combined to target MPM in immunotherapeutic approaches, limiting the chance for tumour cells to escape the immune system by the selection of antigen loss variants.

Our analysis of MUC1 expression and glycosylation showed that MUC1 is expressed by all the MPM cell lines analysed with a variable MUC1 glycosylation profile from one MPM cell line to another. MUC1 is often in a glycosylated form on the surface of MPM cells. This is characterised by absent or weak staining by SM3 or VU-3-C6 mAbs, which are induced or increased after treatment with BGN, a competitive inhibitor of glycosylation. However, a few MPM cell lines exhibit a

variable level of positive staining with SM3 or VU-3-C6 mAbs. Thus, some VNTRs of MUC1 molecules are hypoglycosylated at their surface. Our results partly confirm previous observations by CREANEY *et al.* [23], who reported MUC1 expression in malignant mesothelioma, but we did not confirm the altered glycosylation of MUC1, since we observed a hypoglycosylated profile of MUC1 molecules for only a few MPM cell lines.

We did not find a correlation between the staining level of surface MUC1 and the recognition of MPM cell lines by the MUC1-specific clone N5.14. For instance, MPM cell lines with low MUC1 surface staining and no or weak hypoglycosylation, such as Meso47 or Meso62, were well recognised by the clone, whereas other MPM cell lines with high staining of surface MUC1, such as Meso56, were weakly recognised. It is not surprising that MUC1 staining does not correlate with level of recognition by the T-cell clone, since these stainings do not reflect only MUC1 expression, but also the number of MUC1 VNTRs. Furthermore, the presence of MUC1 on the surface of MPM cells does not account for total MUC1 expressed by tumour cells, but also depends on the turnover of MUC1 at the surface and its cleavage by sheddases, such as tumour necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme/ADAM17 and membrane type 1 matrix metalloprotease [30, 31].

Additional parameters other than expression of MUC1 could modulate the presentation of MUC1(950–958) peptide to CD8+ T-cells. We hypothesised that the glycosylation profile of MUC1 may be one of these parameters. Indeed, HILTHOLD *et al.* [19] reported that glycosylation of long peptides, consisting of five MUC1 VNTRs, decreased the processing and the HLA-A1-restricted cross-presentation to CD8+ T-cells by DCs of a nine amino acid peptide contained in this long peptide. Moreover, HINODA *et al.* [17] described an increased recognition of gastric tumour cells cultured with the O-glycosylation inhibitor BGN, by a HLA-unrestricted, MUC1-specific CTL line. It was clearly not the case in our study, since there was no correlation between MUC1 hypoglycosylation and T-cell clone recognition. Furthermore, we performed several experiments to confirm the absence of influence of MUC1 glycosylation on the T-cell clone response by treating the MPM cells with BGN, a competitive inhibitor of O-glycosylation. Treatment of MPM cell lines with BGN did not increase or induce their recognition by the T-cell clone, suggesting that MUC1 glycosylation does not interfere with the HLA class I presentation of this epitope.

Several immunotherapeutic strategies have been developed to treat MPM. They exhibit high efficiency in mouse models and are currently being evaluated in phase I–II clinical trials. These strategies include injection of MPM patients with DCs pulsed with autologous tumour cell lysate [10] or type I IFN [32, 33], with IL-2 [34–36] or with a CD40 agonist [37, 38]. All these strategies are mainly nonantigen-specific immunotherapies aimed at boosting antitumour innate and specific immune responses, maturing antigen-presenting cells or depleting regulatory T-cells. With the identification of a TAA expressed by MPM cells and recognised by T-cells, such as MUC1, antigen-specific immunotherapy could be designed to stimulate antitumour T-cell responses. Such approaches targeting MUC1 have shown promising results in other malignancies, such as breast, prostate, lung and ovarian cancer [39–43]. For instance, in a pilot phase III immunotherapy study consisting of the

injection of oxidised mannan–MUC1 to stage II breast cancer patients with no evidence of the disease, APOSTOLOPOULOS *et al.* [39] reported that this vaccine prevented recurrence of the disease. Thus, identification of TAAs that are expressed by MPM cells, such as MUC1, and characterisation of their recognition by CTLs would be of great help in designing antigen-specific immunotherapy to treat MPM.

**SUPPORT STATEMENT**

This study was financed by INSERM, La Ligue Inter-Régionale Contre le Cancer (comités 44 and 79), the Nantes University Hospital (Nantes, France) and the ARSMESO44 association.

**STATEMENT OF INTEREST**

None declared.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank J. Le Pendu (INSERM U892, Nantes, France) for his critical reading of the manuscript, D. Coulais (Platform of Development and Clinical Transfer, Hôpital de Nantes, Nantes) and P. Hulin and S. Nedellec (MicroPCell, the Cellular Imaging Core Facility of the Institut de Recherche Thérapeutique de Nantes, Nantes) for their technical assistance.

**REFERENCES**

- 1 Robinson BW, Musk AW, Lake RA. Malignant mesothelioma. *Lancet* 2005; 366: 397–408.
- 2 Scherpereel A, Astoul P, Baas P, *et al.* Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J* 2010; 35: 479–495.
- 3 Gregoire M. What's the place of immunotherapy in malignant mesothelioma treatments? *Cell Adh Migr* 2010; 4: 153–161.
- 4 Robinson BW, Robinson C, Lake RA. Localised spontaneous regression in mesothelioma – possible immunological mechanism. *Lung Cancer* 2001; 32: 197–201.
- 5 Leigh RA, Webster I. Lymphocytic infiltration of pleural mesothelioma and its significance for survival. *S Afr Med J* 1982; 61: 1007–1009.
- 6 Anraku M, Cunningham KS, Yun Z, *et al.* Impact of tumour-infiltrating T cells on survival in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135: 823–829.
- 7 Yamada N, Otzumi S, Kikuchi E, *et al.* CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes predict favorable prognosis in malignant pleural mesothelioma after resection. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59: 1543–1549.
- 8 Gregoire M, Ligeza-Poisson C, Juge-Morineau N, *et al.* Anti-cancer therapy using dendritic cells and apoptotic tumour cells: pre-clinical data in human mesothelioma and acute myeloid leukaemia. *Vaccine* 2003; 21: 791–794.
- 9 Ebstein F, Sapede C, Royer PJ, *et al.* Cytotoxic T cell responses against mesothelioma by apoptotic cell-pulsed dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 1322–1330.
- 10 Hegmans JP, Veltman JD, Lambers ME, *et al.* Consolidative dendritic cell-based immunotherapy elicits cytotoxicity against malignant mesothelioma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 1383–1390.
- 11 Yokokawa J, Palena C, Arlen P, *et al.* Identification of novel human CTL epitopes and their agonist epitopes of mesothelin. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6342–6351.
- 12 May RJ, Dao T, Pinilla-Ibarz J, *et al.* Peptide epitopes from the Wilms' tumour 1 oncoprotein stimulate CD4+ and CD8+ T cells that recognize and kill human malignant mesothelioma tumour cells. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4547–4555.

13 Vlad AM, Kettel JC, Alojz NM, *et al*. MUC1 immunobiology: from discovery to clinical applications. *Adv Immunol* 2004; 82: 249-293.

14 Beatson RE, Taylor-Papadimitriou J, Burchell JM. MUC1 immunotherapy. *Immunotherapy* 2010; 2: 305-327.

15 Barnd DL, Lan MS, Metzgar RS, *et al*. Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumour-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7159-7163.

16 Noto H, Takahashi T, Makiguchi Y, *et al*. Cytotoxic T lymphocytes derived from bone marrow mononuclear cells of multiple myeloma patients recognize an underglycosylated form of MUC1 mucin. *Int Immunol* 1997; 9: 791-798.

17 Hinoda Y, Takahashi T, Hayashi T, *et al*. Enhancement of reactivity of anti-MUC1 core protein antibody and killing activity of anti-MUC1 cytotoxic T cells by deglycosylation of target tissues or cells. *J Gastroenterol* 1998; 33: 164-171.

18 Ho SB, Niehans GA, Lyfthogt C, *et al*. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1993; 53: 641-651.

19 Hiltbold EM, Alter MD, Ciborowski P, *et al*. Presentation of MUC1 tumour antigen by class I MHC and CTL function correlate with the glycosylation state of the protein taken up by dendritic cells. *Cell Immunol* 1999; 194: 143-149.

20 Brossart P, Heinrich KS, Stuhler G, *et al*. Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumour antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* 1999; 93: 4309-4317.

21 Brossart P, Schneider A, Dill P, *et al*. The epithelial tumour antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* 2001; 61: 6846-6850.

22 Tsang KY, Palena C, Gulley J, *et al*. A human cytotoxic T-lymphocyte epitope and its agonist epitope from the nonvariable number of tandem repeat sequence of MUC-1. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2139-2149.

23 Creimey J, Segal A, Sterrett G, *et al*. Overexpression and altered glycosylation of MUC1 in malignant mesothelioma. *Br J Cancer* 2008; 98: 1562-1569.

24 Gueugnon F, Leclercq S, Blanquart C, *et al*. Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Pathol* 2011; 178: 1033-1042.

25 Salter KD, Cresswell P. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *EMBO J* 1986; 5: 943-949.

26 Fonteneau JF, Larsson M, Somersan S, *et al*. Generation of high quantities of viral and tumour-specific human CD4+ and CD8+ T-cell clones using peptide pulsed mature dendritic cells. *J Immunol Methods* 2001; 258: 111-126.

27 Davodeau F, Dfilippantonio M, Roldan E, *et al*. The tight interallelic positional coincidence that distinguishes T-cell receptor J $\alpha$  usage does not result from homologous chromosomal pairing during V $\alpha$ J $\alpha$  rearrangement. *EMBO J* 2001; 20: 4717-4729.

28 Arden B, Clark SP, Kabelitz D, *et al*. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 1995; 42: 455-500.

29 Cao Y, Karsten U. Binding patterns of 51 monoclonal antibodies to peptide and carbohydrate epitopes of the epithelial mucin (MUC1) on tissue sections of adenolymphomas of the parotid (Warthin's tumours): role of epitope masking by glycans. *Histochem Cell Biol* 2001; 115: 349-356.

30 Thathiah A, Carson DD. MT1-MMP mediates MUC1 shedding independent of TACE/ADAM17. *Biochem J* 2004; 382: 363-373.

31 Thathiah A, Blobel CP, Carson DD. Tumour necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding. *J Biol Chem* 2003; 278: 3386-3394.

32 Odaka M, Serman DH, Wiewrodt R, *et al*. Eradication of intraperitoneal and distant tumour by adenovirus-mediated interferon- $\beta$  gene therapy is attributable to induction of systemic immunity. *Cancer Res* 2001; 61: 6201-6212.

33 Serman DH, Reico A, Carroll RC, *et al*. A phase I clinical trial of single-dose intrapleural IFN- $\beta$  gene transfer for malignant pleural mesothelioma and metastatic pleural effusions: high rate of antitumour immune responses. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4456-4466.

34 Ali G, Boldrini L, Lucchi M, *et al*. Treatment with interleukin-2 in malignant pleural mesothelioma: immunological and angiogenic assessment and prognostic impact. *Br J Cancer* 2009; 101: 1869-1875.

35 Astoul P, Picat-Joossen D, Viallat JR, *et al*. Intrapleural administration of interleukin-2 for the treatment of patients with malignant pleural mesothelioma: a phase II study. *Cancer* 1998; 83: 2099-2104.

36 Castagneto B, Zai S, Mutti L, *et al*. Palliative and therapeutic activity of IL-2 immunotherapy in unresectable malignant pleural mesothelioma with pleural effusion: results of a phase II study on 31 consecutive patients. *Lung Cancer* 2001; 31: 303-310.

37 Friedlander PL, Delaune CL, Abadie JM, *et al*. Efficacy of CD40 ligand gene therapy in malignant mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 321-330.

38 Vonderbeide RH, Flaherty KT, Khalil M, *et al*. Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870,893, a novel CD40 agonist monoclonal antibody. *J Clin Oncol* 2007; 25: 876-883.

39 Apostolopoulos V, Pietenz GA, Tsibanis A, *et al*. Pilot phase III immunotherapy study in early-stage breast cancer patients using oxidized mannan-MUC1 [ISRCTN71711835]. *Breast Cancer Res* 2006; 8: R27.

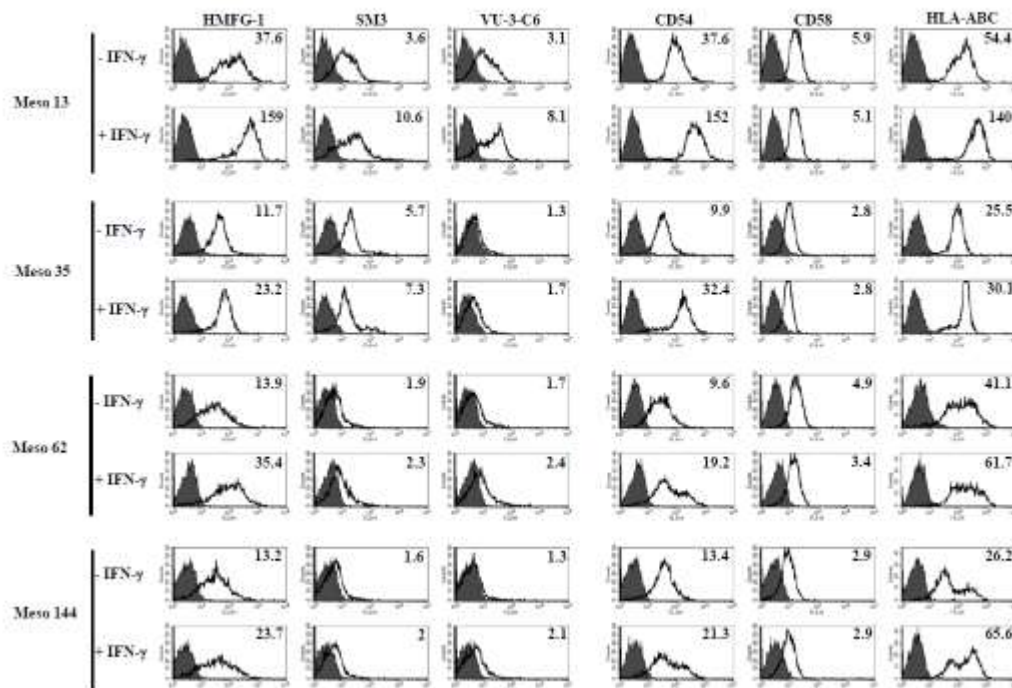
40 Dreicer R, Stadler WM, Ahmann FR, *et al*. MVA-MUC1-IL2 vaccine immunotherapy (TG4010) improves PSA doubling time in patients with prostate cancer with biochemical failure. *Invest New Drugs* 2009; 27: 379-386.

41 Loveland BE, Zhao A, White S, *et al*. Mannan-MUC1-pulsed dendritic cell immunotherapy: a phase I trial in patients with adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 869-877.

42 North SA, Graham K, Bodnar D, *et al*. A pilot study of the liposomal MUC1 vaccine BLP25 in prostate specific antigen failures after radical prostatectomy. *J Urol* 2006; 176: 91-95.

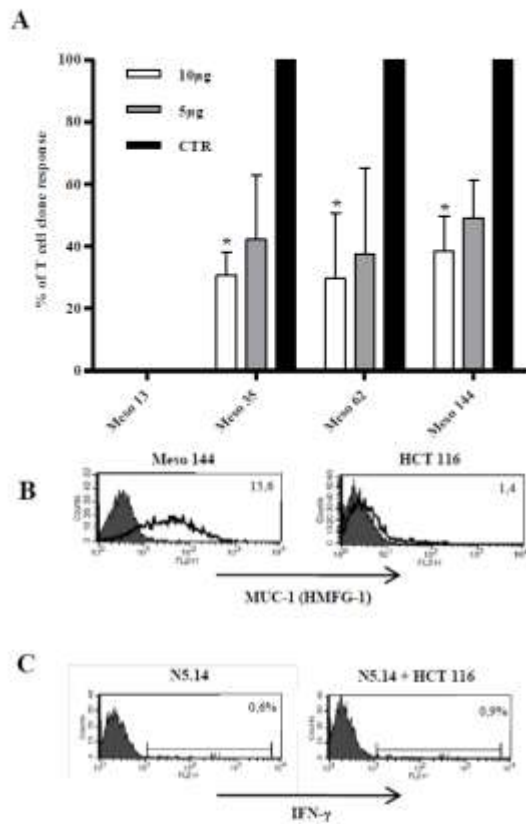
43 Ramlau R, Quix E, Rolski J, *et al*. A phase II study of Tg4010 (Mva-Muc1-IL2) in association with chemotherapy in patients with stage III/IV non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2008; 3: 735-744.

Supplemental figure 1



*Supplemental Figure 1: Increased expression of MUC-1, CD54 and HLA class I molecules by MPM cell lines after 48h treatment with IFN- $\gamma$ : MPM tumor cells were cultured for 24h with or without IFN- $\gamma$ , and stained with MUC-1 (clone HFMG-1, SM3 or VU-3-C6), CD54, CD58 or HLA-ABC specific monoclonal antibodies. Fluorescence was analyzed by flow cytometry. Grey histograms represent isotype control staining and white histogram MUC1, CD54, CD58 or HLA class I specific staining. Relative fluorescence intensity is shown on each histogram. A representative experiment of three independent experiments is shown.*

Supplemental figure 2



Supplemental figure 2: confirmation of the MUC1(950-958)/HLA-A\*0201 specificity of the T cell clones N5.14:(A) the CD8+ T cell clone N5.14 was cultured with HLA-A\*0201+ MPM cell lines in presence or not of an anti-HLA-A\*0201 monoclonal antibody (clone BB7.2). IFN- $\gamma$  production by T cell clones was measured by intracytoplasmic IFN- $\gamma$  staining and flow cytometry analysis with a gate set on T cells. % of T cell clone response was calculated as followed : %IFN- $\gamma$ + producing cells without mab was standardized to 100 and %IFN- $\gamma$ + cells with BB7.2 mab was indexed to this standard value. Histogram represent mean of three experiments. Statistical analysis was performed (\*P<0,05) (B) MPM cells (Meso144) and colon cancer cells (HCT116) were stained with MUC-1 specific mab (clone HFMG-1). Fluorescence was analyzed by flow cytometry. (C) the CD8+ T cell clone N5.14 was cultured alone or with HLA-A\*0201+ MUC1- colon cell line HCT116. IFN- $\gamma$  production by T cell clones was measured by intracytoplasmic IFN- $\gamma$  staining and flow cytometry with a gate set on T cells. A representative experiment of three independent experiments is shown.



## III) Etude de la modulation de MUC1 par des drogues épigénétiques

Article 2: **Downregulation of MUC1 expression and its recognition by CD8 (+) T cells on the surface of malignant pleural mesothelioma cells treated with HDACi.** Roulois D, Blanquart C, Panterne C, Gueugnon F, Grégoire M, Fonteneau JF. Eur J Immunol. 2012 Mar;42(3):783-9.

## OBJECTIFS ET RESULTATS PRINCIPAUX :

Dans cet article, nous nous intéressons à l'impact des drogues épigénétiques (iHDAC et inhibiteurs de la méthylation de l'ADN) sur l'expression de l'antigène MUC1. Préalablement à ce travail, l'équipe a démontré que l'antigène NY-ESO-1, non exprimé par les cellules tumorales de MPM, est induit lors d'un traitement par du 5-aza-CdR[308]. Cette induction de NY-ESO-1 est potentialisée par l'utilisation d'un iHDAC en combinaison avec du 5-aza-CdR, l'iHDAC seul n'ayant aucun effet. Cette combinaison d'inhibiteur de la méthylation et d'iHDAC présente un double intérêt. Premièrement, les iHDAC ont un fort pouvoir cytotoxique et leur utilisation en combinaison avec du 5-aza-CdR permet de diminuer les doses nécessaires pour avoir une toxicité sur les cellules tumorales. Deuxièmement, l'expression d'antigène par la tumeur et la potentialisation de cette expression, pourraient permettre d'avoir une activation spécifique du système immunitaire dirigée contre la tumeur. Toutefois, l'étude des effets des drogues épigénétiques sur l'expression des antigènes de tumeur a été réalisée essentiellement sur la famille des CTA. Nous avons donc voulu déterminer l'impact de ce co-traitement sur l'expression d'un autre type d'antigène, l'antigène surexprimé MUC1.

Le 5-aza-CdR seul n'a aucun effet sur l'expression de MUC1. Cependant, l'utilisation d'un iHDAC induit une forte diminution de l'expression de MUC1, tant au niveau des ARN messagers, qu'au niveau de l'expression de la protéine à la surface cellulaire. De plus, cette inhibition persiste lors du co-traitement et est stable pendant 7 jours. Cette inhibition de l'expression de la protéine MUC1 conduit à une diminution de la reconnaissance par le clone T CD8+ N5.14 spécifique de l'épitope HLA-A\*0201/MUC1(950-958). En contrôle nous avons utilisé le clone dirigé contre NY-ESO-1, afin de confirmer que les cellules tumorales traitées étaient toujours capable de présenter des antigènes aux lymphocytes T. Ces résultats impliquent que dans une optique d'utilisation de MUC1 comme cible immuno-thérapeutique, il est important de ne pas coupler ce traitement à l'utilisation d'iHDAC. Cela suggère également que le choix de l'antigène cible en immunothérapie, si elle est couplée à des agents épigénétiques est important.

En effet, ces approches seraient compatibles avec les antigènes de la famille des CTA comme NY-ESO-1, mais ne le seraient pas pour l'antigène MUC1. La protéine MUC1 possède également des propriétés pro-oncogéniques et la découverte de molécules thérapeutiques pouvant l'inhiber peut donc également se révéler intéressante.

## Downregulation of MUC1 expression and its recognition by CD8<sup>+</sup> T cells on the surface of malignant pleural mesothelioma cells treated with HDACi

David Roulois<sup>1,2</sup>, Christophe Blanquart<sup>1,2</sup>, Clarisse Panterne<sup>1,2</sup>, Fabien Guegnon<sup>1</sup>, Marc Grégoire<sup>1,2,\*</sup> and Jean-François Fonteneau<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM, Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, France

<sup>2</sup> Université de Nantes, Faculté de médecine, France

Research into new treatments against malignant pleural mesothelioma (MPM) is of great interest, as this aggressive cancer is often resistant to conventional therapies. One potential strategy is the use of epigenetic drugs, such as 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azaCdR), a DNA-hypomethylating drug, and valproate (VPA), a histone deacetylase inhibitor (HDACi). Indeed, these drugs not only trigger MPM cell death, but also induce the expression of cancer testis antigens recognized by CD8<sup>+</sup> T cells, such as New York-esophageal cancer-1 (NY-ESO-1). The objective of this study was to assess effects of these drugs on the expression and recognition by CD8<sup>+</sup> T cells of Mucin1 (MUC1), a tumor-associated antigen that is overexpressed by MPM. MPM tumor cell lines were treated with epigenetic drugs, alone or in combination. MUC1 expression by MPM cells, and its recognition by a MUC1-specific CD8<sup>+</sup> T-cell clone, was downregulated by HDACi when used alone or in combination with 5-azaCdR. This effect was not due to a blocking of the HLA class I presentation pathway in treated MPM cells, as NY-ESO-1 induced by 5-azaCdR alone, or with VPA, was recognized by a NY-ESO-1-specific T-cell clone. This study suggests that the choice of tumor antigens could be critical for strategies combining epigenetic drugs with immunotherapy.

**Key words:** CD8<sup>+</sup> T cells · Mesothelioma · Mucin1 · VPA · HDACi



Supporting Information available online

### Introduction

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a cancer of the pleura, which develops after chronic asbestos exposure [1]. Its incidence should peak around the year 2020 in the developed world, and to continue the increase in developing countries [2]. Treatments of MPM include chemotherapy, radiotherapy and surgery, and are of limited efficacy, urging the development of new therapeutic approaches [3].

In this perspective, new chemotherapy strategies are of great interest, for example, the use of epigenetic drugs such as hypomethylating agents, notably the DNA hypomethylating drug: 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azaCdR, Decitabine<sup>®</sup>), and the histone deacetylase inhibitors (HDACi): valproate (VPA, Depakine<sup>®</sup>), or suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, Vorinostat<sup>®</sup>). These drugs display potent anti-cancer activities and promising therapeutic potentials, notably for MPM [4–9]. 5-azaCdR permits expression of silenced genes by demethylation of CpG islands. The use of this drug allows clinical benefits in the treatment of hematopoietic malignancies [10]. HDACi are used to block

Correspondence: Dr. Jean-François Fonteneau  
e-mail: jean-francois.fonteneau@inserm.fr

\*These authors contributed equally to this work.

chromatin compaction through histone deacetylation, which increases gene expression [11]. Among HDACi, Depakine and Vorinostat are being evaluated in clinic either alone, or in combination, as cytotoxic drugs for MPM treatment [4, 9, 12]. Furthermore, new molecules with HDACi properties are currently being developed and investigated [13].

In addition to their anti-tumor cytotoxicity, these epigenetic drugs have been shown to modify the immunogenicity of tumor cells. Sigalotti et al. [14] reported that the treatment of MPM cell lines with 5-azaCdR can induce or increase the expression of a certain class of tumor-associated antigens (TAAs) recognized by T cells: the cancer testis antigens (CTAs). Weiser et al. [15] showed that the induction of the CTA, New York-esophageal cancer-1 (NY-ESO-1), by a sequential treatment of thoracic tumor cell lines with 5-azaCdR and the HDACi depsipeptide, FR901228, led to recognition of treated tumor cells by NY-ESO-1-specific CD8<sup>+</sup> T cells. More recently, we reported similar results with human MPM cell lines using a combination of 5-azaCdR/VPA [16]. In this study, we also showed that, in a mouse model, peritoneal mesothelioma tumor AK7 could be reduced by this combined treatment and was associated with large T-cell infiltrates that specifically recognized tumor cells pre-treated with 5-azaCdR/VPA. To further show that this treatment has an effect on the anti-tumor immune response, we compared vaccination with AK7 tumor cells treated with these epigenetic drugs or other cytotoxic drugs (curcumin, selenite) and observed that only tumor cells treated with epigenetic drugs immunized mice against mesothelioma [17]. These results suggested that these drugs could be associated with immunotherapy for the treatment of cancer.

Among TAAs recognized by T cells, Mucin1 (MUC1) belongs to the class of overexpressed antigens (<http://www.cancer-immunity.org/peptidedatabase/Toellepitopes.htm>). It is a transmembrane glycoprotein that is normally expressed on apical cell surface of many epithelial tissues, and on some hematopoietic cells. In many cancers, MUC1 expression is upregulated and displays an abnormal glycosylation profile that can allow its recognition by specific T cells [18]. Furthermore, this MUC1 overexpression can contribute to survival and migratory properties of tumor cells [19–21]. We recently showed that MUC1 is expressed by MPM cells and can be recognized by a HLA-A\*0201/MUC1(950–958)-specific CD8<sup>+</sup> T-cell clone [22]. This epitope was previously described by Brossart et al. in other cancer types [23].

The majority of studies of epigenetic drug treatment on tumor antigen expression have focused on CTAs and have shown induction or overexpression of this class of TAAs [14, 15, 24–26]. Other classes of TAAs have been less well studied. Hence, we decided to determine the effects of these drugs on the expression and recognition by T cells of the overexpressed TAA, MUC1. We show for the first time that VPA and 5-azaCdR/VPA induce downregulation of a TAA and its recognition by T cells. These results may have an impact in the design of clinical protocols combining the use of epigenetic drugs and immunotherapy, notably for the choice of target antigens.

## Results and discussion

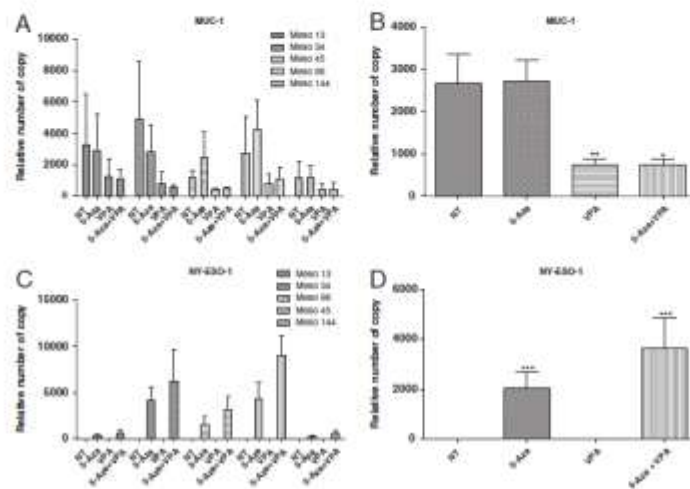
### Modification of MUC1 and NY-ESO-1 mRNA levels by 5-azaCdR and VPA treatment

In a previous study, we showed that 5-azaCdR, alone or in combination with HDACi VPA or SAHA, induced MPM tumor cell death and the expression of the CTA NY-ESO-1 by MPM cell lines [16]. In this study, we extended this work to another type of TAA: MUC1, which belongs to the class of overexpressed tumor antigens. Five MPM cell lines were treated with 5-azaCdR, VPA or a sequential combination of the two drugs. The concentrations of 5-azaCdR (0.5  $\mu$ M) and VPA (5 mM) used in this study were determined in our previous *in vitro* study by Leclercq et al. [16]. Indeed, at these concentrations, 5-azaCdR slowed MPM cells proliferation, but did not kill tumor cells, whereas VPA induced about 40% of tumor cell death. Thus, we first confirmed that this concentration of VPA was toxic for the MPM tumor cell lines used in this study. After 48 h of treatment with VPA, we observed a 37% growth inhibition in all MPM cell lines ranging from 23% for Meso96 to 43% for Meso34, which is mainly due to the toxicity of VPA (Supporting Information Fig. 1).

Then, MUC1 and NY-ESO-1 expression were measured by real-time PCR, with RLPO as a reference gene. We observed non-significant variations of MUC1 transcript numbers when MPM cell lines were treated with 5-azaCdR alone (Fig. 1A and B). Interestingly, MUC1 expression was significantly downregulated by more than 70% after treatment with VPA alone (mean NT = 2664 versus mean VPA = 727). The combination of 5-azaCdR with VPA did not further decrease MUC1 expression. As a control, we measured NY-ESO-1 expression and observed that NY-ESO-1 expression was induced in MPM cells treated with 5-azaCdR (mean = 2043) or with the 5-azaCdR/VPA combination (mean = 3616) and reached a higher level when both drugs were used, but was not induced by VPA alone (Fig. 1C and D). These last results confirm our previous observations [16]. Altogether, these first experiments show that VPA downregulates MUC1 gene transcription in MPM cells.

We extended the study to two other TAAs: The CTA MAGE-3 and the overexpressed TAA WT1. For MAGE-3, we observed a pattern of response to the treatment rather similar to NY-ESO-1 (Supporting Information Fig. 2A). Indeed, expression of MAGE-3 was induced by VPA in two MPM cell lines (Meso34, Meso45) and increased in two others (Meso13, Meso96), while there was no effect on Meso144 cell line. The increased expression was absent (Meso144) or less marked (Meso96) when MPM cell lines already expressed a high level of MAGE-3. Finally, for WT1, we obtained more heterogeneous results. We observed a strong downregulation of its expression by VPA for only one of the MPM cell lines (Meso34) (Supporting Information Fig. 2B).

Overall, these results suggest that treatment of human MPM with VPA decreases MUC1 gene expression. Thus, HDAC are implicated in the regulation of expression of this tumor antigen.



**Figure 1.** Downregulation of MUC1 gene expression by VPA treatment of MPM cell lines. MPM tumor cell lines were treated with 5-azaCdR, VPA or a combination of both molecules. After 48 h, MUC1 and NY-ESO-1 genes expression was measured by RT-PCR. (A, C) Data are shown as mean  $\pm$  SD of results obtained from each MPM cell line in three independent experiments. (B, D) Data are shown as mean  $\pm$  SD of results obtained with all MPM cell lines in three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; Mann-Whitney U-test followed by Dunn's post test.

**Downregulation of MUC1 protein expression at the surface of MPM cell lines after VPA treatment**

We then measured MUC1 expression at the surface of MPM cells after treatment with epigenetic drugs, using the HMPG-1 antibody that recognizes MUC1 independently of its glycosylation status (Fig. 2A and B). We observed downregulation of MUC1 on the surface of all MPM cell lines treated with VPA alone, or in combination with 5-azaCdR. 5-azaCdR alone had no effect on cell surface MUC1 level. These results correlate well with the results of RT-PCR experiments. Thus, VPA treatment downregulates MUC1 expression at the surface of MPM cells, whereas 5-azaCdR has no effect.

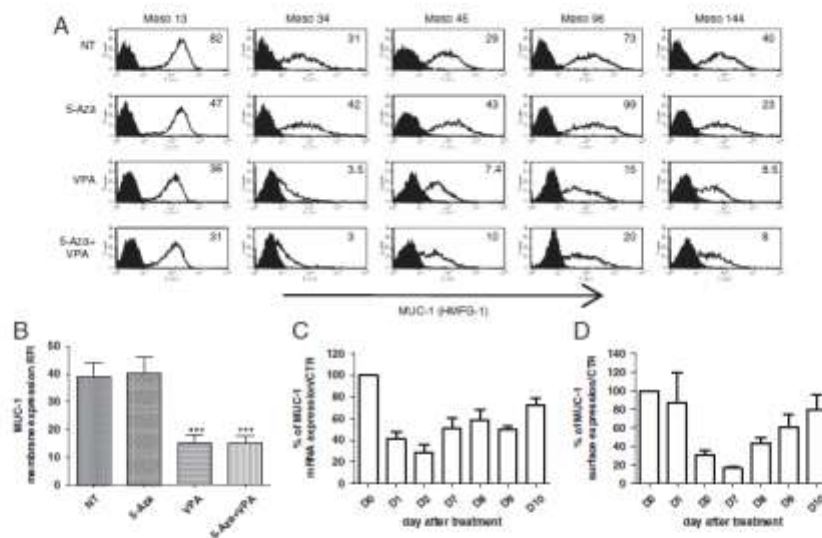
We extended this study to other types of cancer. We tested MUC1 membrane expression in three lung adenocarcinoma (A549, ADK117 and A549), one breast adenocarcinoma (MCF-7) and one colorectal carcinoma cell lines (HCT116). We observed a significant downregulation of MUC1 by VPA for two of three lung adenocarcinoma, whereas MUC1 expression was not significantly affected for the three other tumor cell lines (Supporting Information Fig. 3). Thus, MUC1 downregulation by VPA treatment can also be observed in other cancer types, but was more consistently seen in MPM cell lines.

In the next experiment, we determined how long MUC1 downregulation lasts in MPM tumor cells. We observed MUC1 downregulation for at least 10 days, not only at the transcriptional level (Fig. 2C), but also at the surface expression level with a 24-h delay (Fig. 2D), suggesting an inhibitory mechanism predominantly at the transcriptional level. Maximum MUC1 surface downregulation was observed after 7 days (16.6% of normal expression) and then slowly recovered to a level close to the normal level after 10 days (79.1% of normal expression).

Thus, we demonstrate that VPA strongly downregulates MUC1 expression at the surface of human MPM tumor cells, for several days after treatment. This downregulation may have benefits for the treatment of MPM patients, as overexpression of MUC1 has been described to play a role in the survival and migratory properties of tumor cells [19–21]. However, MUC1 downregulation may also decrease the recognition of MPM tumor cells by MUC1-specific cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells.

**Downregulation of MUC1-specific T-cell activation in response to VPA-treated MPM cell lines**

We next wanted to determine whether the downregulation of MUC1 protein expression leads to a decrease in MPM cell line recognition by MUC1-specific cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells. Indeed, we recently described MUC1 as a TAA expressed by MPM cells and recognized by a HLA-A\*0201/MUC1(950–958)-specific T-cell clone (clone N5.14) on surface of HLA-A\*0201<sup>+</sup> tumor cells [22]. Thus, we measured clone N5.14 TNF production in response to MPM cell lines treated or not with VPA and/or 5-azaCdR. We observed a significant downregulation, by half, of TNF production in response to HLA-A\*0201<sup>+</sup> MPM cell lines treated with VPA alone or in combination with 5-azaCdR (Fig. 3A and B). As a control, the HLA-A\*0201<sup>-</sup> MPM cell line, Meso13, was not recognized by clone N5.14. We also observed that clone N5.14 did not recognize the MUC1<sup>-</sup> HLA-A\*0201<sup>-</sup> colon cancer cell line HCT116 (data not shown). These results were confirmed by the measurement of IFN- $\gamma$  production of clone N5.14 by intracytoplasmic staining and flow cytometry, which also



**Figure 2.** Downregulation of MUC1 glycoprotein at the surface of MPM cell lines. MPM tumor cell lines were treated with 5-azaCdr, VPA or a combination of both molecules for 48 h. MUC1 expression was measured by membrane staining with the MUC1-specific antibody and analyzed by flow cytometry. (A) One representative experiment is shown. Black histograms represent isotype control and white histograms MUC1 staining. Related fluorescence intensity (RFI) is shown on each histogram. (B) Mean + SD of RFI obtained from the five MPM cell lines in four independent experiments are shown. (C) Kinetics of MUC1 gene expression determined by RT-PCR on the five MPM cell lines is shown. (D) Kinetics of MUC1 surface expression on the five MPM cell lines determined by immunofluorescence and flow cytometry are shown. \*\*\**p* < 0.001; Mann-Whitney U-test followed by Dunn's post test.

decreased in response to VPA-treated cells (data not shown). At the same time, we observed induction of TNF production by the HLA-A\*0201/NY-ESO-1(157–165)-specific clone M117.167 in response to HLA-A\*0201<sup>+</sup> MPM cell lines treated with 5-azaCdr and/or VPA, as we previously described [16]. Altogether, these observations show for the first time downregulation of TAAs recognition by T cells following treatment by VPA, which contrasts with observations done for CTAs, such as NY-ESO-1, where epigenetic drugs increase their recognition by specific T cells [24].

**Downregulation of MUC1 expression by SAHA-treated MPM cells and decrease in MUC1-specific T-cell recognition**

To ensure that downregulation of MUC1 is not a peculiar ability of VPA and that it can be obtained with another HDACi, we treated MPM tumor cells with 2.5 μM of SAHA and we tested MUC1 expression by MPM cells and their recognition by the MUC1-specific CD8<sup>+</sup> T-cell clone. We previously showed that this concentration of SAHA induces around 40% of MPM cells death [16]. We observed downregulation of MUC1 mRNA for the five MPM cell lines with a mean of 63% (Fig. 4A), which is similar to what we obtained after VPA treatment. We also observed downregulation of the membrane expression of MUC1 in the five

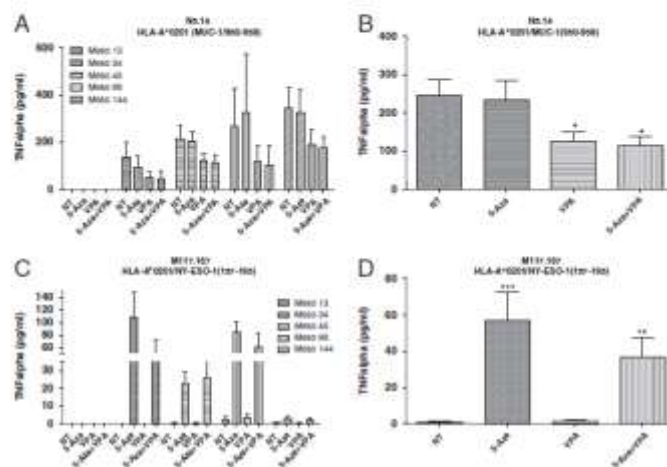
MPM cell lines with a decrease mean of 64% (Fig. 4B). This downregulation was higher to those obtained with VPA which was around 50%. Finally, the TNF response by the MUC1-specific CD8<sup>+</sup> T-cell clone N5.14 was also decreased in response to the four SAHA-treated HLA-A\*0201<sup>+</sup> MPM tumor cell lines with a mean of 28%. As control HLA-A\*0201<sup>-</sup> Meso13, treated or not with VPA, was not recognized by the N5.14 clone.

The results obtained with SAHA were similar to the results obtained with VPA. They confirm that downregulation of MUC1 expression by MPM cells is due to the effect of these drugs on HDAC. Thus, our results show that HDACi decreases MUC1 expression by MPM cells and their recognition by MUC1-specific T cells.

**Concluding remarks**

In this study, we described downregulation of MUC1 expression on the surface of human MPM tumor cells following treatment with HDACi. This downregulation lasts for several days and decreases recognition of tumor cells by MUC1-specific cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells. In this study and our previous one [16], we also show that the hypomethylating drug 5-azaCdr in synergy with HDACi induces expression of NYESO-1 and recognition of MPM cells by a NYESO-1-specific CD8<sup>+</sup> T-cell clone.

Recently, in collaboration with the group of Dr. F. Valette, we characterized the mechanisms of the combination of 5-aza-Cdr/



**Figure 3.** Recognition of MUC1 on the surface of MPM cell lines by an HLA-A\*0201/MUC1(950-958)-specific CD8<sup>+</sup> T-cell clone is downregulated by VPA treatment. MPM tumor cell lines were treated with 5-azaCdr, VPA or a combination of both molecules. After 48 h, TNF production in response to tumor cell lines was measured using N5.14 and M17.167 CD8<sup>+</sup> T-cell clones. (A, C) Data are shown as mean ± SD of results obtained from each MPM cell line and (B, D) data are shown as mean ± SD of results obtained with the 4 HLA-A\*0201<sup>+</sup> recognized MPM cell lines. Data are shown as mean ± SD from triplicates of three experiments. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001; Mann-Whitney U-test followed by Dunn's post test.

VPA on induction of NYESO-1 expression (Carton et al., submitted). We show that NYESO-1 expression in MPM cells is repressed by the presence of methylated CpG in NYESO-1 promoter and that the use of 5-azaCdr, which is an analog of cytidine, impairs methylation of the promoter. The use of HDACi further increases transcription of the NYESO-1 gene by inhibiting the deacetylation induced by HDAC, notably HDAC1, which regulates this gene through the cyclical recruitment of HDAC1-mSin3a-NCOR1, Dnmt3b-HDAC1-Egr1 and Dnmt1-PCNA-UHRF1-G9a complexes. Our laboratory is currently studying the mechanisms by which HDACi downregulate MUC1 expression in MPM.

The downregulation of MUC1 expression induced by HDACi may have beneficial, as well as detrimental, consequences for treatment of this cancer. Indeed, overexpression of MUC1 is now thought to play an oncogenic role in tumor cells [19–21]. The downregulation of MUC1 expression by HDACi may represent an interesting approach to limit the role of MUC1 in survival and migration of tumor cells. Furthermore, HDACi associated with hypomethylating drugs, such as 5-azaCdr, have been proposed to induce the expression of a certain class of TAA, the CTA, such as NY-ESO-1 [14–16], which would allow the subsequent targeting of these antigens in immunotherapeutic approaches [24, 27]. However, our observations that HDACi can also induce the downregulation of expression of other TAA, such as MUC1, and their recognition by the immune system, suggest that a strategy combining epigenetic drugs and immunotherapy is not adapted to all TAAs. Thus, a careful choice of antigens must be made for this immunotherapy approach.

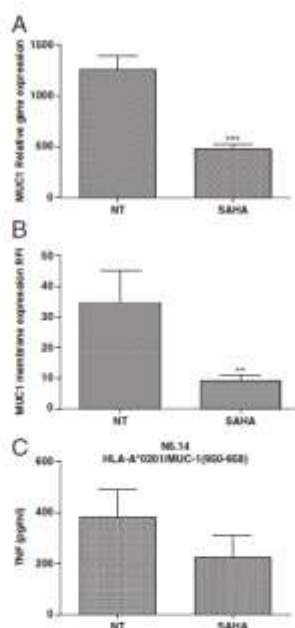
## Materials and methods

### Tumor cell culture

Pleural effusions were obtained by thoracentesis. Diagnosis was established by immunohistochemical staining. All patients were informed and gave signed consent. Human MPM cell lines were established from patients' pleural effusions were characterized and cultured in our laboratory as described [28]. 5-azaCdr, VPA and cell culture reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Cells were treated with 0.5 μM 5-azaCdr for 72 h or 5 mM VPA for 48 h or a combination of both molecules: 0.5 μM 5-azaCdr for the first 72 h followed by 5 mM VPA for the next 48 h. For kinetic experiments, cells were treated with 5 mM VPA for different time periods. In some experiments, cells were treated with 2.5 μM SAHA during 48 h.

### CD8<sup>+</sup> T-cell clone culture

HLA-A\*0201/MUC1(950-958)- or HLA-A\*0201/NY-ESO-1(157-165)-specific CD8<sup>+</sup> T-cell clones were obtained by limiting dilution and cultured as described previously [29]. Briefly, T-cell clones were restimulated with irradiated (35 Gy) feeder cells. The stimulatory medium consisted of RPMI1640 containing 8% pHS, 150 U/mL IL-2 and 1 μg/mL phytohemagglutinin-L (PHA-L, Sigma). T-cell clones were maintained in culture by periodic restimulation.



**Figure 4.** SAHA induces downregulation of MUC1 transcription, membrane expression and recognition by the HLA-A\*0201/MUC1(950-958)-specific CD8<sup>+</sup> T-cell clone. Five MPM tumor cell lines were treated with SAHA. After 48 h, (A) the mean expression of MUC1 genes was measured by RT-PCR, (B) the mean expression of MUC1 glycoprotein was measured by membrane staining with the MUC1-specific antibody and flow cytometry, and (C) the mean TNF production by the NS14 T-cell clone in response to the four HLA-A\*0201<sup>+</sup> tumor cell lines was measured. Data are shown as mean±SD of results obtained from three experiments. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; Mann-Whitney U-test followed by Dunn's post test.

**RNA extraction and real-time RT-PCR**

Total RNA was extracted with the Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Hoerd, France). One microgram of RNA was reverse-transcribed using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). PCR reactions were performed using QuantiTect Primer Assays (Qiagen) and RT<sup>2</sup> Real-Time SYBR-Green/ROX PCR mastermix (Tebu-bio, Le-Perray-en-Yvelines, France).

**Abs and peptides**

Mouse anti-human MUC1 (clone HMFG-1) was purchased from Abcam (Paris, France) and PE-conjugated goat F(ab')<sub>2</sub> fragment anti-mouse IgG (H+L) was purchased from Beckman Coulter (Roissy CDG, France). MUC1(950-958), STAPPVHNV and NY-ESO-1(157-165), SLLMWITQC, peptides were purchased from Eurogentec (Angers, France).

**Immunofluorescence and flow cytometry**

About 5 × 10<sup>4</sup> cells were stained for 30 min at 4°C with 1 µg/ml isotype control or specific mAb. PBS containing 0.1% BSA (Sigma) was used for washing and mAb dilution. A second staining was then performed with PE-conjugated Goat F(ab')<sub>2</sub> Fragment Anti-Mouse IgG (H+L). Fluorescence was measured by flow cytometry (FacsCalibur, BD Biosciences), using the Cellquest software (BD Biosciences). Relative fluorescence intensity (RFI) was calculated as the ratio between the sample mean fluorescence intensity and the isotype control mean fluorescence intensity.

**TNF production assay**

About 5 × 10<sup>4</sup> tumor cells were co-cultured with 3 × 10<sup>4</sup> HLA-A\*0201-restricted, MUC1(950-958) or NY-ESO-1(157-165)-specific CD8<sup>+</sup> T-cell clone in a 96-well plate for 6h at 37°C, in triplicate. TNF released by T cells into culture supernatants was measured after 18h using a colorimetric assay based on cytotoxicity to WEHI 164 clone 13 [30].

**Statistical analysis**

Statistical significance was calculated using GraphPad PRISM. Comparisons between groups versus control were made using the Mann-Whitney U-test followed by Dunn's post test (multiple comparisons). A two-tailed p-value < 0.05 was considered significant. \*p-value < 0.05; \*\*p-value < 0.01; \*\*\*p-value < 0.001.

**Acknowledgements:** This study was financed by INSERM, La ligue inter-régionale contre le Cancer (comités 44 and 79), the ARC (Association pour la recherche contre le cancer), the Nantes University Hospital, and the ARSMESO44 association.

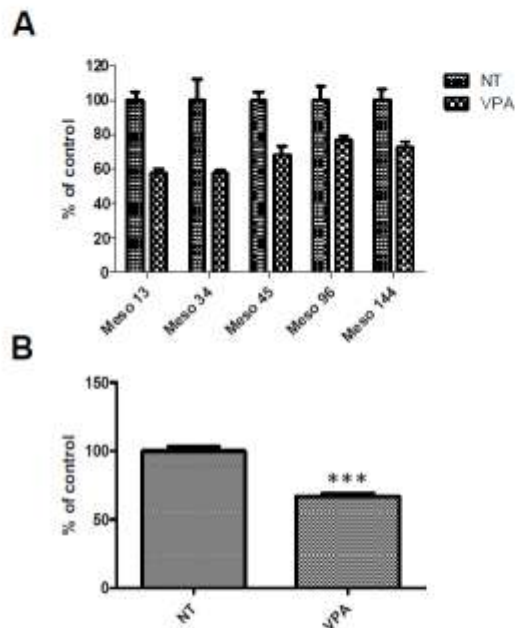
**Conflict of interest:** The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

**References**

- 1 Kazan-Allen, L., Asbestos and mesothelioma: worldwide trends. *Lung Cancer* 2005, 49: 53-58.
- 2 Robinson, B. W., Muzik, A. W. and Lake, R. A., Malignant mesothelioma. *Lancet* 2005, 366: 397-408.
- 3 Scherpereel, A., Astoul, P., Baas, P., Beghmans, T., Clayson, H., de Vuyst, P., Diemans, H. et al., Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur. Respir. J.* 2010, 35: 479-495.
- 4 Krug, L. M., Cusley, T., Schwartz, L., Richardson, S., Marks, P., Chiao, J. and Kelly, W. K., Potential role of histone deacetylase inhibitors in mesothelioma: clinical experience with suberoylanilide hydroxamic acid. *Clin. Lung Cancer* 2006, 7: 257-261.



## Supporting Information Figure 1

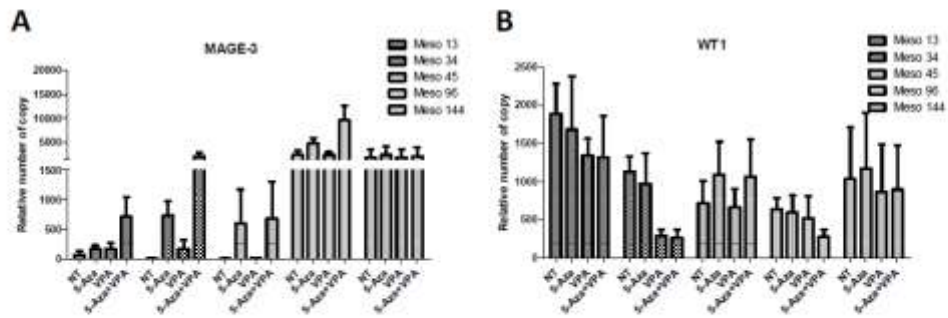


*Supplemental figure 1: Effect of VPA on MPM tumor cell viability: MPM cell lines were treated with 5mM of VPA for 48hrs. Cell viability was measured by Uptibblue and flow cytometry. Viability for each cell lines (A) and mean viability on all cell lines (B) are expressed as percentages (mean with SEM on three experiments).*

*(Determination of cell viability by Uptibblue:*

Cell growth was monitored using Uptibblue (Interchim). Reduction of this compound by the cell results in the formation of a fluorescent compound quantified by measuring fluorescence at 595 nM after excitation at 532 nM using a Typhoon apparatus. Cells were seeded in 96-well plates at a density of  $5 \times 10^3$  cells/well in culture medium. Twenty-four hours later, Uptibblue (5%, v/v) was added to the culture medium for 2h30 min at 37 °C. Fluorescence was measured and was related to the number of cells at day 0. Culture medium containing Uptibblue was replaced by medium with/without HDACi, for 48 h. Uptibblue was then added to the culture medium for 2h30 min at 37 °C. Fluorescence was measured as described above and was related to the number of cells at day 2. Cell growth was defined as the ratio of fluorescence intensity at day 0 to fluorescence intensity at day 2.)

## Supporting Information Figure 2



*Supplemental figure 2: analysis of MAGE-3 and WT1 gene expression after VPA treatment of MPM cell lines: five MPM tumor cell lines were treated with 5-azaCdR, SAHA or combination of both molecules. 48hrs later, expressions of MAGE-3 (A) and WT1 (B) genes were measured by RT-PCR. Histograms show a representative experiment out of three.*

## DISCUSSION

A ce jour, le Mésothéliome Pleural Malin reste un cancer incurable. L'observation de cas de rémissions spontanées, partielles et associées à la présence d'un infiltrat lymphocytaire [78], le meilleur pronostic des patients présentant un fort taux de lymphocytes T CD8+ [81], ou encore la présence d'anticorps dirigés contre la tumeur dans le liquide pleural des patients [79] semblent indiquer l'importance du système immunitaire dans le contrôle de ce cancer.

Partant de ce constat, il paraît évident que des approches d'immunothérapies soient développées pour le traitement de ce cancer. Ces approches peuvent consister en l'utilisation de cytokines, telles que l'IFN- $\beta$  ou l'IL-2 [84]. Cependant, ces stratégies sont non antigène-spécifiques et présentent relativement peu d'effets. Des stratégies plus spécifiques sont aussi développées comme la thérapie ciblée à base d'anticorps, par exemple l'utilisation du bevacizumab, un anticorps bloquant du récepteur au VEGF. Cet anticorps utilisé en combinaison avec de la chimiothérapie n'augmente quasiment pas la médiane de survie des patients (15,6 contre 14,7 mois) [397] et présente donc des effets peu significatifs.

Plus récemment, une autre stratégie d'immunothérapie développée par le groupe de Hegmans, dans un essai clinique de vaccination à base de cellules dendritiques chargées par un lysat tumoral, a permis d'obtenir des résultats intéressants pour le mésothéliome [85]. Cette vaccination semble bien tolérée chez le patient. En ce qui concerne les effets cliniques, trois réponses partielles ont pu être observées, ainsi qu'une réponse stable chez un autre patient. Bien que peu suffisante, cette étude a démontré la faisabilité d'une approche d'immunothérapie visant à stimuler des réponses T spécifiques dans le MPM. Cependant l'un des problèmes majeurs rencontrés dans le développement des stratégies de vaccination est l'absence de cibles antigéniques identifiées. Ces cibles antigéniques sont utiles aussi bien pour le développement de vaccination ciblée que pour le suivi de l'efficacité des traitements immuno-thérapeutiques chez le patient.

Mon projet de thèse a donc consisté à rechercher des antigènes du MPM. Pour cela, j'ai dans un premier temps utilisé une approche d'immunologie classique. Afin d'identifier des antigènes du MPM, les cellules présentes dans les liquides pleuraux de patients ont été isolées. Les lignées tumorales des patients ont été obtenues d'une part, et les populations lymphocytaires T (TIL pour tumor infiltrating lymphocytes) ont été isolées et amplifiées d'autre part. Au cours de ma thèse, j'ai obtenu et testé 10 couples TIL-tumeur et sur l'ensemble de ces couples, seul un présentait une

activité faible et spécifique des lymphocytes T dirigés contre la lignée tumorale autologue. De par la faible activité de reconnaissance, l'identification de l'antigène reconnu n'a pas pu être réalisée.

Le MPM semble donc être un cancer relativement peu immunogène en comparaison avec d'autres cancers décrits comme très immunogènes, comme le mélanome. En effet, dans les mélanomes, on observe une fréquence de 40 à 50% des patients présentant des TIL réactifs vis-à-vis de la lignée tumorale autologue. Ces TILs peuvent reconnaître un grand nombre d'antigènes différents [398-399]. Pour le MPM, mes résultats ont montré que cette fréquence est de l'ordre de 10%. Cette faible reconnaissance des lignées tumorales de MPM par les lymphocytes T autologues suggère donc que le MPM est un cancer spontanément peu immunogène. Bien qu'il y ait une présence de lymphocytes T dans les liquides pleuraux de patients, ces derniers ne semblent pas être réactifs vis-à-vis de la tumeur. Toutefois, la présence d'un cas de rémission partielle spontanée associée à un infiltrat lymphocytaire [78], ainsi que certaines études montrant un meilleur pronostic lors de la présence de lymphocytes T soulignent l'importance des lymphocytes T dans cette pathologie [79].

Cette absence de réponse pourrait s'expliquer par un contexte tumoral immuno-régulateur, notamment par la présence de cytokines inhibant cette réponse T spécifique, telles que l'IL-10 ou encore le TGF- $\beta$  [22]. Plus récemment, il a également été décrit l'expression par les cellules tumorales et les lymphocytes T de récepteurs et de ligands bloquant la réponse immunitaire appartenant à la famille des molécules B7, comme PD-1 et son ligand PD-L1, ou encore Tim-3. L'expression de ces molécules inhibitrices par les lymphocytes T (PD-L1 et Tim-3) empêche ainsi l'activation de ces derniers et est impliquée dans l'échappement tumoral. Des études ont démontré la possibilité de restaurer une réponse T efficace en bloquant ces récepteurs [167-168]. Dans l'équipe, il a été récemment observé que les TILs de patients exprimaient fortement PD-L1 et Tim-3. Il serait donc intéressant de développer cet aspect dans le futur et de déterminer si l'inhibition de ces molécules nous permettrait de mettre en évidence des réponses T dirigées contre la tumeur. D'ailleurs, l'équipe de BW Robinson a déjà montré le bénéfice anti-tumoral de l'utilisation d'un tel anticorps, dans un modèle murin de MPM [400]. Cela suggère que l'utilisation d'anticorps inhibant PD-1 ou PD-L1 pourrait être efficace en combinaison avec d'autres stratégies comme l'immunothérapie, la thérapie ciblée ou encore la chimiothérapie [401].

L'approche d'immunologie directe se révélant infructueuse dans la recherche de cibles antigéniques du MPM, une autre approche a donc été choisie. Il s'agit de l'approche d'immunologie inverse. Dans cette dernière, il s'agit de vérifier si des lymphocytes T peuvent reconnaître

spécifiquement des antigènes candidats exprimés par le cancer d'intérêt. Ces antigènes candidats sont décrits en fonction des données de la littérature, mais aussi des données de puces pangénomiques.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux protéines MSLN et MUC1, car ces antigènes ont été décrits par notre équipe comme étant surexprimés [390-391]. Concernant la reconnaissance de ces antigènes par des lymphocytes T dans le cadre du MPM, une étude avait décrit la reconnaissance d'une seule lignée de MPM par un clone spécifique de la MSLN [87], et aucune donnée de littérature n'était disponible faisant état de réponses T spécifiques de MUC1 et dirigées contre des lignées tumorales de MPM.

Partant de ces données, j'ai donc obtenu des clones T spécifiques dirigés contre des épitopes de la MSLN et de MUC1. Nous avons obtenu plusieurs clones T CD8+ spécifiques de ces deux antigènes. Cependant, parmi ces clones, seul un spécifique de l'épitope HLA-A\*0201/MUC1(950-958) était capable de reconnaître spécifiquement les lignées tumorales HLA-A\*0201 de MPM. Ceci montre bien toute la difficulté d'identifier des antigènes de tumeur par immunologie inverse. En effet, une des limites de l'immunologie inverse est l'absence de reconnaissance des cellules tumorales qui expriment l'antigène candidat. Une réponse aux cellules T2 chargées en peptides ne signifie pas que ces peptides sont effectivement présentés par la cellule tumorale. On peut retrouver des exemples dans la littérature comme l'épitope de HLA-A\*0201/HER-2/neu(369-377) [192] ou encore l'antigène HLA-A2\*0201/MAGE 3(271-279) [193]. Les premiers outils d'algorithme de prédiction de peptides se basaient uniquement sur la possibilité de liaison de ces peptides aux molécules HLA d'intérêt. Cependant, une autre donnée importante est à prendre en compte : il s'agit des sites de clivages par le protéasome. On retrouve ainsi de nouveaux outils tels que MAPPP (<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP/>) qui associe prédiction de clivage par le protéasome et probabilité de liaison aux molécules du CMH. En plus de cette complexité, il arrive également que certains peptides soient modifiés, ou résultent d'un clivage et réassociation de deux peptides, avant d'être présentés à la surface cellulaire, ne pouvant ainsi pas être prédits par les algorithmes existants [402]. Tout ceci contribue à augmenter la difficulté d'identifier les peptides par une approche d'immunologie inverse. Une seconde hypothèse peut également expliquer cette absence de réponse. Il est possible que les clones T ne soient pas assez affins pour le complexe CMH/peptide, et qu'il n'y ait donc pas assez d'épitopes présentés par les cellules tumorales pour conduire à une activation des clones T. Cette hypothèse est d'ailleurs confortée par les résultats de ma thèse. En effet, sur les deux clones spécifiques de l'épitope HLA-A\*0201/MUC1(950-958), seul le clone le plus affiné reconnaissait les cellules tumorales.

L'étude par immunologie inverse de la réponse T et dirigée contre l'épitope HLA-A\*0201/MUC1(950-958) m'a permis de décrire un nouvel antigène du mésothéliome. Tout d'abord, l'étude de l'expression de MUC1 à la surface cellulaire grâce à des anticorps spécifiques soit d'un état hypoglycosylé de MUC1, soit reconnaissant toutes les formes de MUC1, m'a donc permis de mettre en évidence une hétérogénéité tant au niveau de la quantité de protéine MUC1 exprimée à la surface cellulaire que dans l'état d'hypoglycosylation de cette protéine. En effet, j'ai démontré que l'ensemble des lignées de MPM expriment MUC1 avec une grande variabilité dans le niveau d'expression à la surface des cellules. J'ai ensuite remarqué que certaines lignées présentent un fort marquage des anticorps reconnaissant la protéine MUC1 hypoglycosylée (SM-3 et VU-3-C6), alors que d'autres au contraire sont très peu reconnues par ces anticorps. J'ai également observé qu'il y a une grande variabilité dans le niveau d'expression des ARN messagers de MUC1 et que cette expression n'est pas corrélée au niveau d'expression de MUC1 à la surface cellulaire. Cela peut s'expliquer de plusieurs façons. Tout d'abord, les anticorps dirigés contre la protéine MUC1 reconnaissent la région VNTR, dont le nombre est polymorphique. Il est possible qu'il y ait la fixation de plusieurs anticorps par molécules MUC1 et donc que l'intensité de marquage soit ainsi plus ou moins forte en fonction du nombre de VNTR par molécules MUC1 [314]. Une autre explication possible est que nous observons l'expression de MUC1 à la surface cellulaire et il est possible que cette expression ne reflète pas entièrement le niveau d'expression protéique totale de MUC1. En effet, une partie des protéines MUC1 produites peut être clivée notamment en CA15-3, un marqueur soluble de certains cancers [403-404].

J'ai ensuite étudié la reconnaissance des lignées de MPM par le clone T CD8+ N5.14 spécifique de MUC1. Concernant cette reconnaissance, j'ai obtenu deux clones présentant des affinités différentes pour le complexe CMH/peptide. Seul le clone N5.14, reconnaissant les cellules présentatrices chargées avec les plus faibles concentrations de peptide, est capable de reconnaître les cellules tumorales. Cela suggère l'importance de l'affinité du TCR pour la reconnaissance du complexe CMH/peptide dans la reconnaissance des cellules tumorales. La suite du travail a donc été effectuée avec le clone N5.14. Toutes les lignées de MPM HLA-A\*0201 sont reconnues à des niveaux variables. Nous avons tenté de voir s'il y a une corrélation entre le niveau de reconnaissance et le taux d'expression des ARN messager, ou encore le niveau d'hypoglycosylation. Du fait de la variation du marquage MUC1 à cause des VNTR, nous n'avons pas observé de corrélation avec le niveau

d'expression de MUC1 à la surface cellulaire. Concernant le taux d'expression des ARN messagers, ces résultats ne sont pas présentés dans la thèse, mais il y a une certaine corrélation entre le niveau des ARN messagers et le niveau de reconnaissance par le clone T CD8+ spécifique de MUC1. Concernant le niveau d'hypoglycosylation, aucune corrélation avec la reconnaissance du clone T n'a pu être mise en évidence. Afin de vérifier que le niveau d'hypoglycosylation n'intervient pas dans la reconnaissance de cet épitope, nous avons traité les lignées de MPM avec un inhibiteur compétitif des O-glycosylations. Nous avons d'abord observé que cet inhibiteur était bien actif puisqu'il y avait une forte augmentation du marquage par les anticorps spécifiques de la forme hypoglycosylée. Cependant, cette augmentation de l'hypoglycosylation n'est pas associée à une augmentation de la reconnaissance des lignées par le clone MUC1 N5.14. De plus, au cours de ma thèse, j'ai observé que les cellules dendritiques expriment la protéine MUC1 hyperglycosylée et qu'elles peuvent être reconnues de façon spécifique par le clone N5.14 dirigé contre l'épitope HLA-A\*0201/MUC1(950-958) lorsqu'elles expriment la molécule HLA-A\*0201. Cela suggère que la reconnaissance de l'épitope HLA-A\*0201/MUC1(950-958) n'est pas dépendante de la glycosylation.

Dans la littérature, l'importance des glycosylations dans la reconnaissance de MUC1 par des clones T spécifiques n'est pas très claire. Certaines études supposent qu'une plus grande hypoglycosylation de la protéine MUC1 est associée à une meilleure reconnaissance [405]. Cela pourrait s'expliquer par un blocage du protéasome en présence d'une protéine MUC1 hyperglycosylée [406]. En effet, la protéine MUC1 hyperglycosylée est efficacement clivée par le protéasome, afin de produire des peptides se fixant sur les molécules CMH II, cependant ces glycosylations semblent empêcher la production de peptide pouvant se fixer sur la molécule du CMH I. La protéine MUC1 hyperglycosylée permettrait donc l'apparition de réponses T CD4+ mais pas CD8+ [407].

Cette reconnaissance des cellules dendritiques semble donc en contradiction avec les études précédentes et pose la question de la place de la glycosylation normale ou anormale de MUC1 dans l'activation d'une réponse MUC1 spécifique et effectrice. En effet, ces glycosylations pourraient être importantes dans les stratégies de vaccination dirigées contre MUC1. Il apparaît que la vaccination avec des peptides glycosylés pourrait conduire à l'apparition d'une réponse tolérogène vis-à-vis de MUC1, alors que l'utilisation de peptides présentant des glycosylations anormales pourrait au contraire favoriser l'établissement d'une réponse T spécifique de MUC1 [337, 339].

L'ensemble de ces travaux a démontré que la protéine MUC1 est un antigène candidat du MPM, exprimée par une très large majorité de lignées tumorales. Cette expression permet la

reconnaissance de l'ensemble des lignées HLA-A\*0201+ par le clone T spécifique de HLA-A\*0201/MUC1(950-958). Il existe actuellement deux stratégies vaccinales principales ciblant MUC1 et utilisées dans le cancer du poumon : le TG4010 de Transgène et le L-BLP25 de Stimuvax. Ces stratégies sont en essais cliniques de phase III dans le cancer du poumon et il serait intéressant de savoir si ces approches pourraient être appliquées au MPM. Plus largement, il existe un grand nombre de stratégies ciblant MUC1 en phase d'essai clinique ou encore en phase de développement dans les laboratoires de recherche. J'ai rédigé à la fin de ma thèse une revue qui décrit l'ensemble de ces stratégies (Annexe 2). Ces nouvelles approches pourraient elles aussi être appliquées au MPM, après confirmation de leur faisabilité et de leur efficacité.

Le MPM étant un cancer présentant un contexte immuno-régulateur fort, il serait également intéressant de coupler ces stratégies de vaccination avec des approches permettant de réverser ce contexte immuno-régulateur. C'est l'un des objectifs de l'équipe du Dr. Marc Grégoire qui travaille sur deux approches thérapeutiques susceptibles de favoriser une réponse immunitaire anti-tumorale. La première est l'utilisation d'une souche vaccinale du virus de la rougeole afin de tuer les cellules tumorales de MPM et d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale, travaux auxquels j'ai participé (Annexe 3). La seconde est l'utilisation d'une combinaison de drogues épigénétiques (iDNMT et iHDAC). Il a déjà été décrit précédemment que les cellules tumorales pouvaient exprimer un certain nombre de CTA sous l'influence des iDNMT tels que le 5-aza-CdR [408]. L'équipe du Dr. Marc Grégoire, ainsi que d'autres groupes, ont démontré l'intérêt d'utiliser ces deux agents en combinaison (iDNMT et iHDAC). En effet, dans le MPM, la combinaison de ces deux molécules permet d'induire l'expression des CTA, tels que NY-ESO-1, tout en augmentant la toxicité des iHDACs à plus faibles concentrations. De plus, ces cellules co-traitées sont alors reconnues par des clones de lymphocytes T spécifiques de NY-ESO-1. L'équipe a également mis en évidence la présence d'un infiltrat lymphocytaire important chez les souris portant une tumeur et traitées par l'iHDAC seul ou en combinaison avec un agent déméthylant l'ADN [308-309]. Une étude clinique dans les leucémies a également mis en évidence chez des patients l'établissement de réponses T dirigées contre les antigènes de la famille MAGE après l'utilisation d'une combinaison de drogues épigénétiques [311]. Ces études démontrent l'intérêt de ces approches et notamment la capacité à induire des réponses T spécifiques, à la fois dans les modèles murins et chez le patient.

C'est donc dans ce contexte que je me suis intéressé à l'impact de ce co-traitement sur l'expression de l'antigène MUC1 et sur la réponse T CD8+ spécifique du clone N5.14. En effet, ces approches de traitement des cellules tumorales par des drogues épigénétiques se sont majoritairement intéressées à l'impact des traitements sur l'expression des *cancer testis antigens*,



mais beaucoup moins à l'expression des autres catégories d'antigènes. Dans cette étude, j'ai démontré d'une manière intéressante que les deux iHDACs étudiés, le VPA et le SAHA, induisent une inhibition de l'expression de MUC1.

Cette inhibition se retrouve à la fois au niveau des ARN messagers et de l'expression de la protéine à la surface cellulaire. Cette inhibition de l'expression de MUC1 est également stable pendant 7 jours lors d'un traitement par le VPA. De plus, nous avons démontré que cette inhibition de l'expression des ARN messagers et de la protéine MUC1 est responsable d'une plus faible reconnaissance des cellules tumorales de MPM par le clone N5.14 T CD8+ spécifique de MUC1. Dans cette étude, j'ai également confirmé les résultats précédemment obtenus dans l'équipe en ce qui concerne l'induction de NY-ESO-1 par les drogues épigénétiques, ainsi que sa reconnaissance par un clone T spécifique de NY-ESO-1. Ces résultats suggèrent donc que les cellules tumorales sont toujours capables de présenter des antigènes tumoraux et d'activer des lymphocytes T.

Cette étude soulève deux points importants. Le premier est que si l'on envisage d'utiliser les drogues épigénétiques en combinaison avec de l'immunothérapie, il faut faire attention à l'antigène qui est ciblé. Cette approche pourrait être réalisable si l'on veut cibler les CTA, mais ne serait pas adaptée pour d'autres antigènes comme MUC1. D'une manière plus générale, la chimiothérapie peut avoir un impact négatif sur l'expression de certains antigènes de tumeur. Ces éléments sont donc à prendre en compte lorsque des patients sous chimiothérapie sont recrutés dans des essais d'immunothérapie. Cette étude nous renseigne également sur la régulation épigénétique de MUC1. En effet, l'utilisation de drogues épigénétiques a la capacité d'inhiber l'expression de MUC1. Cela suggère que des mécanismes épigénétiques, notamment de modulation de l'acétylation du promoteur de MUC1, peuvent entrer en jeu. Le promoteur de MUC1 est relativement bien connu [374], cependant sa régulation épigénétique l'est beaucoup moins. Seule une étude décrit l'implication de la méthylation de l'ADN ainsi que l'acétylation et la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 dans le contrôle de l'expression de MUC1 [389]. Selon ce modèle, nous aurions dû nous attendre à une surexpression de MUC1 dans le MPM et non pas à une inhibition suite au traitement par les iHDAC. Cela suggère donc que d'autres mécanismes (épigénétiques ou non) doivent entrer en jeu dans cette régulation. Ces mécanismes pourraient être la présence de la modulation d'autres marques histones, la surexpression ou l'inhibition de facteurs impliqués dans la régulation de MUC1 [374] ou encore la modulation de la voie STAT3, connue pour être impliquée dans la régulation de MUC1 [409].

Dans la littérature, il apparaît également de plus en plus que MUC1 est une protéine pro-oncogénique, favorisant la migration cellulaire et les processus tumoraux [375]. Son ciblage et son inhibition permettent de réduire l'agressivité des tumeurs et de les rendre plus sensibles aux agents de chimiothérapie, tels que la doxorubicine [410]. Une meilleure compréhension de sa régulation serait donc utile afin de pouvoir cibler spécifiquement cette protéine et essayer d'éteindre ou de réduire son expression.

En conclusion, nous avons décrit que la protéine MUC1 est un antigène du MPM pouvant être reconnu par des lymphocytes T CD8+. Sa surexpression par l'ensemble des lignées de MPM en fait donc une cible d'intérêt dans l'élaboration de stratégies de vaccination thérapeutique. Actuellement, il existe deux stratégies principales ciblant MUC1 : le TG4010 et le BLP25. Ces stratégies sont actuellement en essais cliniques de phase IIB et III dans le cancer du poumon [358, 362]. En fonction des résultats de ces essais, il serait intéressant de réfléchir à leurs développements dans le MPM.

Dans la seconde partie de ma thèse, j'ai démontré que les drogues épigénétiques peuvent moduler l'expression d'antigènes de tumeur et que dans une optique de combinaison avec de l'immunothérapie, les cibles antigéniques doivent être choisies avec précaution. En effet, ces drogues ont la capacité d'induire l'expression de nouveaux antigènes de tumeur, pas encore présentés au système immunitaire, comme les CTA, et donc ayant un fort pouvoir activateur de ce dernier. Mais elles peuvent également moduler négativement l'expression d'antigènes de tumeur déjà exprimés comme je l'ai montré pour MUC1. Plus globalement, cette constatation soulève un problème dans l'utilisation de la chimiothérapie en combinaison avec l'immunothérapie. Les agents chimiothérapeutiques peuvent avoir un effet délétère sur le système immunitaire et/ou sur l'expression des antigènes de tumeur. Le choix des cibles antigéniques dans ces combinaisons, doit donc être réalisé avec précaution.

En perspective, l'ensemble de ce travail de thèse a permis de mettre en évidence l'intérêt de la protéine MUC1 en tant que cible antigénique du MPM. Il existe un grand nombre de stratégies ciblant MUC1 dans différents types de cancer. Parmi ces stratégies, deux sont actuellement en phase d'essai clinique de phase III dans le cancer du poumon (TG4010 et L-BLB25). Il serait donc intéressant d'adapter ces différentes stratégies dans le MPM. Plus largement, les autres approches thérapeutiques moins avancées (phase I et II) ciblant MUC1 pourraient elles aussi être adaptées au MPM.

La démonstration que MUC1 est un antigène du MPM, est également une donnée pouvant se révéler utile pour l'immuno-monitoring des réponses T induites par des stratégies d'immunothérapies du MPM. Il serait intéressant, par exemple, de regarder dans les essais cliniques qui visent à stimuler une réponse immunitaire par des cytokines comme l'IL-2, mais aussi par des stratégies de vaccinations comme l'injection des DC chargées avec du lysat tumoral si des réponses T dirigées contre MUC1 sont induites. L'obtention d'un clone T dirigé contre MUC1, pourrait également permettre la validation d'un tétramère spécifique de l'épitope HLA-A\*0201/MUC1 (950-958), ce qui améliorerait l'immuno-monitoring.

Notre équipe a démontré que les approches de combinaison de drogues épigénétiques sont intéressantes dans le MPM, puisqu'elles permettent de faire exprimer des antigènes de tumeurs, notamment ceux appartenant à la famille des CTA. Ces drogues pourraient donc être utilisées dans le MPM en combinaison avec des stratégies de vaccination ciblant NY-ESO-1 ou d'autres CTA dont l'expression est induite par le traitement. Cependant, l'effet de ces drogues n'avait pas été testé sur l'expression d'autres TAA. Mes travaux de thèses montrent que les drogues épigénétiques peuvent avoir des effets négatifs sur l'expression et la reconnaissance de certains antigènes de tumeur par les lymphocytes T spécifiques. Une stratégie de combinaison des drogues épigénétiques avec de l'immunothérapie serait donc adaptée pour certains TAA, comme les CTA, mais ne le serait pas pour d'autres, comme MUC1. D'une manière générale, ma thèse pose la question de l'effet de la chimiothérapie sur des approches immuno-thérapeutiques.

Il serait de plus intéressant de comprendre comment l'expression de la protéine MUC1 est inhibée par les iHDACs étant donné l'accumulation de données récentes dans la littérature suggérant un rôle pro-oncogénique de MUC1. Pour ce faire, plusieurs stratégies peuvent être utilisées, la première consiste à faire un screening par immuno-précipitation de la chromatine des marques histones et d'observer si certaines de ces marques sont modulées par les iHDACs. Dans un second temps et en fonction des résultats précédents, il est possible que les iHDACs modulent l'expression de facteurs de transcription ou de facteurs inhibant l'expression de MUC1. Sur la base des données précédentes, il pourrait être utile de rechercher immuno-précipitation de la chromatine une variation de fixation de ces facteurs et déterminer si des complexes protéiques sont dérégulés au niveau du promoteur de MUC1 par les iHDACs. Cette étude devrait permettre d'améliorer les connaissances sur la régulation de MUC1 et participer au développement de molécules ciblant MUC1, non pas pour ses propriétés antigéniques, mais oncogéniques.

**BIBLIOGRAPHIE**

1. Wagner, J.C., C.A. Sleggs, and P. Marchand, *Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province*. Br J Ind Med, 1960. **17**: p. 260-71.
2. Testa, J.R., et al., *A multi-institutional study confirms the presence and expression of simian virus 40 in human malignant mesotheliomas*. Cancer Res, 1998. **58**(20): p. 4505-9.
3. Baris, I., et al., *Epidemiological and environmental evidence of the health effects of exposure to erionite fibres: a four-year study in the Cappadocian region of Turkey*. Int J Cancer, 1987. **39**(1): p. 10-7.
4. Holt, P.F., *Translocation of inhaled dust to the pleura*. Environ Res, 1983. **31**(1): p. 212-20.
5. Adamson, I.Y. and J. Bakowska, *KGF and HGF are growth factors for mesothelial cells in pleural lavage fluid after intratracheal asbestos*. Exp Lung Res, 2001. **27**(7): p. 605-16.
6. Jaurand, M.C. and J. Fleury-Feith, *Pathogenesis of malignant pleural mesothelioma*. Respirology, 2005. **10**(1): p. 2-8.
7. Jaurand, M.C., et al., *Phagocytosis of chrysotile fibers by pleural mesothelial cells in culture*. Am J Pathol, 1979. **94**(3): p. 529-38.
8. Liu, W., J.D. Ernst, and V.C. Broaddus, *Phagocytosis of crocidolite asbestos induces oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in mesothelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(3): p. 371-8.
9. Yegles, M., et al., *Induction of metaphase and anaphase/telophase abnormalities by asbestos fibers in rat pleural mesothelial cells in vitro*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1993. **9**(2): p. 186-91.
10. Levresse, V., et al., *Analysis of cell cycle disruptions in cultures of rat pleural mesothelial cells exposed to asbestos fibers*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **17**(6): p. 660-71.
11. Zanella, C.L., et al., *Asbestos causes stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1 mitogen-activated protein kinase cascade after phosphorylation of the epidermal growth factor receptor*. Cancer Res, 1996. **56**(23): p. 5334-8.
12. Carbone, M., et al., *New developments about the association of SV40 with human mesothelioma*. Oncogene, 2003. **22**(33): p. 5173-80.
13. Weiner, S.J. and S. Neragi-Miandoab, *Pathogenesis of malignant pleural mesothelioma and the role of environmental and genetic factors*. J Cancer Res Clin Oncol, 2009. **135**(1): p. 15-27.
14. Bocchetta, M., et al., *Human mesothelial cells are unusually susceptible to simian virus 40-mediated transformation and asbestos cocarcinogenicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 10214-9.
15. Cacciotti, P., et al., *SV40-dependent AKT activity drives mesothelial cell transformation after asbestos exposure*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5256-62.
16. Pietruska, J.R. and A.B. Kane, *SV40 oncoproteins enhance asbestos-induced DNA double-strand breaks and abrogate senescence in murine mesothelial cells*. Cancer Res, 2007. **67**(8): p. 3637-45.
17. Hill, J.K., et al., *Localized benign pleural mesothelioma arising in a radiation field*. Clin Imaging, 1997. **21**(3): p. 189-94.
18. Carpenter, P.M., et al., *Radiation-induced CA 125 production by mesothelial cells*. Gynecol Oncol, 1996. **63**(3): p. 328-32.
19. Ascoli, V., et al., *Mesothelioma in blood related subjects: report of 11 clusters among 1954 Italy cases and review of the literature*. Am J Ind Med, 2007. **50**(5): p. 357-69.
20. Balsara, B.R., et al., *Comparative genomic hybridization and loss of heterozygosity analyses identify a common region of deletion at 15q11.1-15 in human malignant mesothelioma*. Cancer Res, 1999. **59**(2): p. 450-4.
21. Bjorkqvist, A.M., et al., *Deletions at 14q in malignant mesothelioma detected by microsatellite marker analysis*. Br J Cancer, 1999. **81**(7): p. 1111-5.

22. Robinson, B.W. and R.A. Lake, *Advances in malignant mesothelioma*. N Engl J Med, 2005. **353**(15): p. 1591-603.
23. Kops, G.J., B.A. Weaver, and D.W. Cleveland, *On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(10): p. 773-85.
24. De Rienzo, A., S.C. Jhanwar, and J.R. Testa, *Loss of heterozygosity analysis of 13q and 14q in human malignant mesothelioma*. Genes Chromosomes Cancer, 2000. **28**(3): p. 337-41.
25. Murthy, S.S. and J.R. Testa, *Asbestos, chromosomal deletions, and tumor suppressor gene alterations in human malignant mesothelioma*. J Cell Physiol, 1999. **180**(2): p. 150-7.
26. Toyooka, S., et al., *Progressive aberrant methylation of the RASSF1A gene in simian virus 40 infected human mesothelial cells*. Oncogene, 2002. **21**(27): p. 4340-4.
27. Wong, L., et al., *Inactivation of p16INK4a expression in malignant mesothelioma by methylation*. Lung Cancer, 2002. **38**(2): p. 131-6.
28. Lee, A.Y., et al., *Update on the molecular biology of malignant mesothelioma*. Cancer, 2007. **109**(8): p. 1454-61.
29. Ramos-Nino, M.E., C.R. Timblin, and B.T. Mossman, *Mesothelial cell transformation requires increased AP-1 binding activity and ERK-dependent Fra-1 expression*. Cancer Res, 2002. **62**(21): p. 6065-9.
30. Uematsu, K., et al., *Wnt pathway activation in mesothelioma: evidence of Dishevelled overexpression and transcriptional activity of beta-catenin*. Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4547-51.
31. Abutailly, A.S., J.E. Collins, and W.R. Roche, *Cadherins, catenins and APC in pleural malignant mesothelioma*. J Pathol, 2003. **201**(3): p. 355-62.
32. Kohno, H., et al., *Aberrant promoter methylation of WIF-1 and SFRP1, 2, 4 genes in mesothelioma*. Oncol Rep, 2010. **24**(2): p. 423-31.
33. Marzo, A.L., et al., *Antisense oligonucleotides specific for transforming growth factor beta2 inhibit the growth of malignant mesothelioma both in vitro and in vivo*. Cancer Res, 1997. **57**(15): p. 3200-7.
34. Ilavaska, S., et al., *Immunological monitoring in workers occupationally exposed to asbestos*. Toxicology, 2005. **206**(2): p. 299-308.
35. Liu, Z. and J. Klominek, *Chemotaxis and chemokinesis of malignant mesothelioma cells to multiple growth factors*. Anticancer Res, 2004. **24**(3a): p. 1625-30.
36. Masood, R., et al., *Malignant mesothelioma growth inhibition by agents that target the VEGF and VEGF-C autocrine loops*. Int J Cancer, 2003. **104**(5): p. 603-10.
37. Belli, C., et al., *Will antiangiogenic agents be a future for mesothelioma therapy?* Curr Med Chem, 2010. **17**(27): p. 3069-79.
38. Dhaene, K., et al., *Expression profile of telomerase subunits in human pleural mesothelioma*. J Pathol, 2000. **190**(1): p. 80-5.
39. Scherpereel, A., et al., *Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma*. Eur Respir J, 2010. **35**(3): p. 479-95.
40. Rakha, E.A., et al., *The sensitivity of cytologic evaluation of pleural fluid in the diagnosis of malignant mesothelioma*. Diagn Cytopathol, 2010. **38**(12): p. 874-9.
41. Zahid, I., et al., *What is the best way to diagnose and stage malignant pleural mesothelioma?* Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2011. **12**(2): p. 254-9.
42. van der Bij, S., et al., *Markers for the non-invasive diagnosis of mesothelioma: a systematic review*. Br J Cancer, 2011. **104**(8): p. 1325-33.
43. Robinson, B.W., et al., *Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma*. Lancet, 2003. **362**(9396): p. 1612-6.
44. Robinson, B.W., et al., *Soluble mesothelin-related protein--a blood test for mesothelioma*. Lung Cancer, 2005. **49 Suppl 1**: p. S109-11.

45. Kao, S.C., et al., *Molecular biomarkers in malignant mesothelioma: state of the art*. Pathology, 2011. **43**(3): p. 201-12.
46. Park, E.K., et al., *Osteopontin levels in an asbestos-exposed population*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(4): p. 1362-6.
47. Grigoriu, B.D., et al., *Utility of osteopontin and serum mesothelin in malignant pleural mesothelioma diagnosis and prognosis assessment*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(10): p. 2928-35.
48. Pass, H.I., et al., *Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels*. N Engl J Med, 2005. **353**(15): p. 1564-73.
49. Creaney, J., et al., *Comparison of osteopontin, megakaryocyte potentiating factor, and mesothelin proteins as markers in the serum of patients with malignant mesothelioma*. J Thorac Oncol, 2008. **3**(8): p. 851-7.
50. Iwahori, K., et al., *Megakaryocyte potentiating factor as a tumor marker of malignant pleural mesothelioma: evaluation in comparison with mesothelin*. Lung Cancer, 2008. **62**(1): p. 45-54.
51. Wolf, A.S., J. Daniel, and D.J. Sugarbaker, *Surgical techniques for multimodality treatment of malignant pleural mesothelioma: extrapleural pneumonectomy and pleurectomy/decortication*. Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **21**(2): p. 132-48.
52. Soysal, O., et al., *Pleurectomy/decortication for palliation in malignant pleural mesothelioma: results of surgery*. Eur J Cardiothorac Surg, 1997. **11**(2): p. 210-3.
53. Flores, R.M., et al., *Extrapleural pneumonectomy versus pleurectomy/decortication in the surgical management of malignant pleural mesothelioma: results in 663 patients*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2008. **135**(3): p. 620-6, 626 e1-3.
54. Sugarbaker, D.J. and A.S. Wolf, *Surgery for malignant pleural mesothelioma*. Expert Rev Respir Med, 2010. **4**(3): p. 363-72.
55. Muers, M.F., et al., *Active symptom control with or without chemotherapy in the treatment of patients with malignant pleural mesothelioma (MS01): a multicentre randomised trial*. Lancet, 2008. **371**(9625): p. 1685-94.
56. Scherpereel, A., *Guidelines of the French Speaking Society for Chest Medicine for management of malignant pleural mesothelioma*. Respir Med, 2007. **101**(6): p. 1265-76.
57. Vogelzang, N.J., et al., *Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma*. J Clin Oncol, 2003. **21**(14): p. 2636-44.
58. Carreras, C.W. and D.V. Santi, *The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 721-62.
59. Chattopadhyay, S., R.G. Moran, and I.D. Goldman, *Pemetrexed: biochemical and cellular pharmacology, mechanisms, and clinical applications*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(2): p. 404-17.
60. Chatelut, E., *[Pharmacology of platinum compounds: differences between the three molecules and factors of interpatient variability]*. Bull Cancer, 2011. **98**(11): p. 1253-61.
61. Berghmans, T., et al., *Activity of chemotherapy and immunotherapy on malignant mesothelioma: a systematic review of the literature with meta-analysis*. Lung Cancer, 2002. **38**(2): p. 111-21.
62. Baldini, E.H., *External beam radiation therapy for the treatment of pleural mesothelioma*. Thorac Surg Clin, 2004. **14**(4): p. 543-8.
63. Jakobsen, J.N. and J.B. Sorensen, *Review on clinical trials of targeted treatments in malignant mesothelioma*. Cancer Chemother Pharmacol, 2011. **68**(1): p. 1-15.
64. Govindan, R., et al., *Gefitinib in patients with malignant mesothelioma: a phase II study by the Cancer and Leukemia Group B*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(6): p. 2300-4.
65. Garland, L.L., et al., *Phase II study of erlotinib in patients with malignant pleural mesothelioma: a Southwest Oncology Group Study*. J Clin Oncol, 2007. **25**(17): p. 2406-13.

66. Richly, H., et al., *Results of a Phase I trial of sorafenib (BAY 43-9006) in combination with doxorubicin in patients with refractory solid tumors*. *Ann Oncol*, 2006. **17**(5): p. 866-73.
67. Hassan, R., et al., *Phase I clinical trial of the chimeric anti-mesothelin monoclonal antibody MORAb-009 in patients with mesothelin-expressing cancers*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(24): p. 6132-8.
68. Boisgerault, N., F. Tangy, and M. Gregoire, *New perspectives in cancer virotherapy: bringing the immune system into play*. *Immunotherapy*, 2010. **2**(2): p. 185-99.
69. Liu, T.C. and D. Kirn, *Systemic efficacy with oncolytic virus therapeutics: clinical proof-of-concept and future directions*. *Cancer Res*, 2007. **67**(2): p. 429-32.
70. Parato, K.A., et al., *Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(12): p. 965-76.
71. Gauvrit, A., et al., *Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response*. *Cancer Res*, 2008. **68**(12): p. 4882-92.
72. Li, H., et al., *Oncolytic measles viruses encoding interferon beta and the thyroidal sodium iodide symporter gene for mesothelioma virotherapy*. *Cancer Gene Ther*, 2010. **17**(8): p. 550-8.
73. Deroanne, C.F., et al., *Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling*. *Oncogene*, 2002. **21**(3): p. 427-36.
74. Marks, P.A., et al., *Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs*. *Curr Opin Oncol*, 2001. **13**(6): p. 477-83.
75. Krug, L.M., et al., *Potential role of histone deacetylase inhibitors in mesothelioma: clinical experience with suberoylanilide hydroxamic acid*. *Clin Lung Cancer*, 2006. **7**(4): p. 257-61.
76. Ramalingam, S.S., et al., *Phase II study of belinostat (PXD101), a histone deacetylase inhibitor, for second line therapy of advanced malignant pleural mesothelioma*. *J Thorac Oncol*, 2009. **4**(1): p. 97-101.
77. Scherpereel, A., et al., *Valproate-doxorubicin: promising therapy for progressing mesothelioma. A phase II study*. *Eur Respir J*, 2011. **37**(1): p. 129-35.
78. Robinson, B.W., C. Robinson, and R.A. Lake, *Localised spontaneous regression in mesothelioma -- possible immunological mechanism*. *Lung Cancer*, 2001. **32**(2): p. 197-201.
79. Robinson, C., B.W. Robinson, and R.A. Lake, *Sera from patients with malignant mesothelioma can contain autoantibodies*. *Lung Cancer*, 1998. **20**(3): p. 175-84.
80. Anraku, M., et al., *Impact of tumor-infiltrating T cells on survival in patients with malignant pleural mesothelioma*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2008. **135**(4): p. 823-9.
81. Yamada, N., et al., *CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes predict favorable prognosis in malignant pleural mesothelioma after resection*. *Cancer Immunol Immunother*, 2010. **59**(10): p. 1543-9.
82. Hegmans, J.P., et al., *Mesothelioma environment comprises cytokines and T-regulatory cells that suppress immune responses*. *Eur Respir J*, 2006. **27**(6): p. 1086-95.
83. Gregoire, M., *What's the place of immunotherapy in malignant mesothelioma treatments?* *Cell Adh Migr*, 2010. **4**(1): p. 153-61.
84. Bograd, A.J., et al., *Immune responses and immunotherapeutic interventions in malignant pleural mesothelioma*. *Cancer Immunol Immunother*, 2011. **60**(11): p. 1509-27.
85. Hegmans, J.P., et al., *Consolidative dendritic cell-based immunotherapy elicits cytotoxicity against malignant mesothelioma*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. **181**(12): p. 1383-90.
86. Webster, I., J.W. Cochrane, and K.R. Burkhardt, *Immunotherapy with BCG vaccine in 30 cases of mesothelioma*. *S Afr Med J*, 1982. **61**(8): p. 277-8.
87. Yokokawa, J., et al., *Identification of novel human CTL epitopes and their agonist epitopes of mesothelin*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(17): p. 6342-51.

88. May, R.J., et al., *Peptide epitopes from the Wilms' tumor 1 oncoprotein stimulate CD4+ and CD8+ T cells that recognize and kill human malignant mesothelioma tumor cells*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4547-55.
89. Ehrlich, P., *Über den jetzigen Stand der Chemotherapie*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1909. **42**(1): p. 17-47.
90. Burnet, M., *Cancer; a biological approach. I. The processes of control*. Br Med J, 1957. **1**(5022): p. 779-86.
91. Thomas, L., *Discussion*. In: *Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states*. Hoeber-Harper, New York, 1959: p. 529.
92. Burnet, F.M., *The concept of immunological surveillance*. Prog Exp Tumor Res, 1970. **13**: p. 1-27.
93. Flanagan, S.P., *'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse*. Genet Res, 1966. **8**(3): p. 295-309.
94. Maleckar, J.R. and L.A. Sherman, *The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice*. J Immunol, 1987. **138**(11): p. 3873-6.
95. Ikehara, S., et al., *Functional T cells in athymic nude mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(3): p. 886-8.
96. Herberman, R.B. and H.T. Holden, *Natural cell-mediated immunity*. Adv Cancer Res, 1978. **27**: p. 305-77.
97. Kaplan, D.H., et al., *Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7556-61.
98. van den Broek, M.E., et al., *Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice*. J Exp Med, 1996. **184**(5): p. 1781-90.
99. Russell, J.H. and T.J. Ley, *Lymphocyte-mediated cytotoxicity*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 323-70.
100. Shankaran, V., et al., *IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
101. Shinkai, Y., et al., *RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement*. Cell, 1992. **68**(5): p. 855-67.
102. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 329-60.
103. Penn, I., *Malignant melanoma in organ allograft recipients*. Transplantation, 1996. **61**(2): p. 274-8.
104. Knuth, A., et al., *T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(11): p. 3511-5.
105. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1960-4.
106. Gooden, M.J., et al., *The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis*. Br J Cancer, 2011. **105**(1): p. 93-103.
107. Kopp, E. and R. Medzhitov, *Recognition of microbial infection by Toll-like receptors*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(4): p. 396-401.
108. Fidler, I.J. and A.J. Schroit, *Recognition and destruction of neoplastic cells by activated macrophages: discrimination of altered self*. Biochim Biophys Acta, 1988. **948**(2): p. 151-73.
109. Lewis, C.E. and J.W. Pollard, *Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 605-12.
110. Pearce, E.J., C.M. Kane, and J. Sun, *Regulation of dendritic cell function by pathogen-derived molecules plays a key role in dictating the outcome of the adaptive immune response*. Chem Immunol Allergy, 2006. **90**: p. 82-90.



111. Palucka, K. and J. Banchereau, *Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity*. J Clin Immunol, 1999. **19**(1): p. 12-25.
112. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces*. Nat Immunol, 2009. **10**(12): p. 1237-44.
113. Schott, M., *Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(3): p. 779-95.
114. Steinman, R.M., *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 271-96.
115. Villadangos, J.A. and P. Schnorrer, *Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(7): p. 543-55.
116. Macagno, A., et al., *Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation*. Trends Immunol, 2007. **28**(5): p. 227-33.
117. Bevan, M.J., *Antigen recognition. Class discrimination in the world of immunology*. Nature, 1987. **325**(6101): p. 192-4.
118. Bevan, M.J., *Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay*. J Exp Med, 1976. **143**(5): p. 1283-8.
119. Simpson, E. and R.D. Gordon, *Responsiveness to HY antigen Ir gene complementation and target cell specificity*. Immunol Rev, 1977. **35**: p. 59-75.
120. Zinkernagel, R.M., *On cross-priming of MHC class I-specific CTL: rule or exception?* Eur J Immunol, 2002. **32**(9): p. 2385-92.
121. Nestle, F.O., et al., *Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells*. Nat Med, 1998. **4**(3): p. 328-32.
122. Bauer, S., et al., *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. Science, 1999. **285**(5428): p. 727-9.
123. Gasser, S., et al., *The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor*. Nature, 2005. **436**(7054): p. 1186-90.
124. Park, M.J., et al., *Induction of NKG2D ligands and increased sensitivity of tumor cells to NK cell-mediated cytotoxicity by hematoporphyrin-based photodynamic therapy*. Immunol Invest, 2011. **40**(4): p. 367-82.
125. Costello, R.T., et al., *NK cells: innate immunity against hematological malignancies?* Trends Immunol, 2004. **25**(6): p. 328-33.
126. Hao, N.B., et al., *Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 948098.
127. Cooper, M.D., et al., *The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken*. J Exp Med, 1966. **123**(1): p. 75-102.
128. Cooper, M.D., R.D. Peterson, and R.A. Good, *Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken*. Nature, 1965. **205**: p. 143-6.
129. LeBien, T.W. and T.F. Tedder, *B lymphocytes: how they develop and function*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1570-80.
130. Fagraeus, A., *The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro*. J Immunol, 1948. **58**(1): p. 1-13.
131. Mauri, C. and A. Bosma, *Immune regulatory function of B cells*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 221-41.
132. Li, Q., et al., *In vivo sensitized and in vitro activated B cells mediate tumor regression in cancer adoptive immunotherapy*. J Immunol, 2009. **183**(5): p. 3195-203.
133. Li, Q., et al., *Adoptive transfer of tumor reactive B cells confers host T-cell immunity and tumor regression*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(15): p. 4987-95.
134. Namm, J.P., et al., *B lymphocytes as effector cells in the immunotherapy of cancer*. J Surg Oncol, 2012. **105**(4): p. 431-5.

135. Rouse, B.T., M. Rollinghoff, and N.L. Warner, *Anti-theta serum-induced suppression of the cellular transfer of tumour-specific immunity to a syngeneic plasma cell tumour*. *Nat New Biol*, 1972. **238**(82): p. 116-7.
136. Kripke, M.L., *Immunologic mechanisms in UV radiation carcinogenesis*. *Adv Cancer Res*, 1981. **34**: p. 69-106.
137. Old, L.J., *Cancer immunology: the search for specificity--G. H. A. Clowes Memorial lecture*. *Cancer Res*, 1981. **41**(2): p. 361-75.
138. Topalian, S.L., D. Solomon, and S.A. Rosenberg, *Tumor-specific cytotoxicity by lymphocytes infiltrating human melanomas*. *J Immunol*, 1989. **142**(10): p. 3714-25.
139. Chen, Q. and P. Hersey, *MHC-restricted responses of CD8+ and CD4+ T-cell clones from regional lymph nodes of melanoma patients*. *Int J Cancer*, 1992. **51**(2): p. 218-24.
140. Choudhary, A., et al., *Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent gamma delta tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma*. *J Immunol*, 1995. **154**(8): p. 3932-40.
141. Gervois, N., et al., *Selective expansion of a specific anti-tumor CD8+ cytotoxic T lymphocyte clone in the bulk culture of tumor-infiltrating lymphocytes from a melanoma patient: cytotoxic activity and T cell receptor gene rearrangements*. *Eur J Immunol*, 1990. **20**(4): p. 825-31.
142. Traversari, C., et al., *Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes*. *Immunogenetics*, 1992. **35**(3): p. 145-52.
143. van der Bruggen, P., et al., *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. *Science*, 1991. **254**(5038): p. 1643-7.
144. Wang, R.F. and S.A. Rosenberg, *Human tumor antigens for cancer vaccine development*. *Immunol Rev*, 1999. **170**: p. 85-100.
145. Germain, R.N., *MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation*. *Cell*, 1994. **76**(2): p. 287-99.
146. Holling, T.M., et al., *Activated human T cells accomplish MHC class II expression through T cell-specific occupation of class II transactivator promoter III*. *J Immunol*, 2002. **168**(2): p. 763-70.
147. Bjorkman, P.J., et al., *Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2*. *Nature*, 1987. **329**(6139): p. 506-12.
148. Bjorkman, P.J., et al., *The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens*. *Nature*, 1987. **329**(6139): p. 512-8.
149. Rammensee, H.G., T. Friede, and S. Stevanovic, *MHC ligands and peptide motifs: first listing*. *Immunogenetics*, 1995. **41**(4): p. 178-228.
150. Parham, P., *Immunology. Deconstructing the MHC*. *Nature*, 1992. **360**(6402): p. 300-1.
151. Madden, D.R., D.N. Garboczi, and D.C. Wiley, *The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2*. *Cell*, 1993. **75**(4): p. 693-708.
152. Falk, K., et al., *Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules*. *Nature*, 1991. **351**(6324): p. 290-6.
153. Ruppert, J., et al., *Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules*. *Cell*, 1993. **74**(5): p. 929-37.
154. Bertolino, P. and C. Rabourdin-Combe, *The MHC class II-associated invariant chain: a molecule with multiple roles in MHC class II biosynthesis and antigen presentation to CD4+ T cells*. *Crit Rev Immunol*, 1996. **16**(4): p. 359-79.
155. Joffre, O.P., et al., *Cross-presentation by dendritic cells*. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(8): p. 557-69.
156. Fonteneau, J.F., et al., *Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells*. *Blood*, 2003. **102**(13): p. 4448-55.

157. Neijssen, J., et al., *Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions*. Nature, 2005. **434**(7029): p. 83-8.
158. Tewari, M.K., et al., *A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent*. Nat Immunol, 2005. **6**(3): p. 287-94.
159. Ahrens, S., et al., *F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells*. Immunity, 2012. **36**(4): p. 635-45.
160. Crozat, K., et al., *The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells*. J Exp Med, 2010. **207**(6): p. 1283-92.
161. Poulin, L.F., et al., *Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells*. J Exp Med, 2010. **207**(6): p. 1261-71.
162. Lauterbach, H., et al., *Mouse CD8alpha+ DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC*. J Exp Med, 2010. **207**(12): p. 2703-17.
163. Zhang, J.G., et al., *The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments*. Immunity, 2012. **36**(4): p. 646-57.
164. Dustin, M.L. and D. Depoil, *New insights into the T cell synapse from single molecule techniques*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(10): p. 672-84.
165. Artyomov, M.N., et al., *CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(39): p. 16916-21.
166. Krummel, M.F. and J.P. Allison, *CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 459-65.
167. Sakuishi, K., et al., *Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity*. J Exp Med, 2010. **207**(10): p. 2187-94.
168. Fourcade, J., et al., *Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients*. J Exp Med, 2010. **207**(10): p. 2175-86.
169. Scott-Browne, J.P., et al., *Germline-encoded amino acids in the alphabeta T-cell receptor control thymic selection*. Nature, 2009. **458**(7241): p. 1043-6.
170. Garcia, K.C., et al., *The molecular basis of TCR germline bias for MHC is surprisingly simple*. Nat Immunol, 2009. **10**(2): p. 143-7.
171. Call, M.E., et al., *The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex*. Cell, 2002. **111**(7): p. 967-79.
172. Valitutti, S., et al., *Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes*. Nature, 1995. **375**(6527): p. 148-51.
173. Iezzi, G., K. Karjalainen, and A. Lanzavecchia, *The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells*. Immunity, 1998. **8**(1): p. 89-95.
174. Shresta, S., et al., *How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?* Curr Opin Immunol, 1998. **10**(5): p. 581-7.
175. Stinchcombe, J.C., et al., *The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges*. Immunity, 2001. **15**(5): p. 751-61.
176. Caldwell, S.A., et al., *The Fas/Fas ligand pathway is important for optimal tumor regression in a mouse model of CTL adoptive immunotherapy of experimental CMS4 lung metastases*. J Immunol, 2003. **171**(5): p. 2402-12.
177. Andersen, M.H., et al., *Cytotoxic T cells*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(1): p. 32-41.
178. Shrikant, P.A., et al., *Regulating functional cell fates in CD8 T cells*. Immunol Res, 2010. **46**(1-3): p. 12-22.
179. Chen, M., et al., *The development and function of follicular helper T cells in immune responses*. Cell Mol Immunol, 2012.
180. Reiner, S.L., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia, *Division of labor with a workforce of one: challenges in specifying effector and memory T cell fate*. Science, 2007. **317**(5838): p. 622-5.

181. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity*. Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2076-82.
182. Hirahara, K., et al., *Helper T-cell differentiation and plasticity: insights from epigenetics*. Immunology, 2011. **134**(3): p. 235-45.
183. Zhou, L., M.M. Chong, and D.R. Littman, *Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 646-55.
184. Boel, P., et al., *BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes*. Immunity, 1995. **2**(2): p. 167-75.
185. Bakker, A.B., et al., *Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes*. J Exp Med, 1994. **179**(3): p. 1005-9.
186. Jager, D., et al., *Identification of tumor antigens as potential target antigens for immunotherapy by serological expression cloning*. Cancer Immunol Immunother, 2004. **53**(3): p. 144-7.
187. Yasuda, M., et al., *Identification of a tumour associated antigen in lung cancer patients with asbestos exposure*. Anticancer Res, 2010. **30**(7): p. 2631-9.
188. Chen, Y.T., et al., *A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1914-8.
189. Rammensee, H., et al., *SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs*. Immunogenetics, 1999. **50**(3-4): p. 213-9.
190. Parker, K.C., M.A. Bednarek, and J.E. Coligan, *Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains*. J Immunol, 1994. **152**(1): p. 163-75.
191. Holzhutter, H.G., C. Frommel, and P.M. Kloetzel, *A theoretical approach towards the identification of cleavage-determining amino acid motifs of the 20 S proteasome*. J Mol Biol, 1999. **286**(4): p. 1251-65.
192. Zaks, T.Z. and S.A. Rosenberg, *Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu+ tumors*. Cancer Res, 1998. **58**(21): p. 4902-8.
193. Valmori, D., et al., *Modulation of proteasomal activity required for the generation of a cytotoxic T lymphocyte-defined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3*. J Exp Med, 1999. **189**(6): p. 895-906.
194. Coulie, P.G., et al., *A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 7976-80.
195. Sensi, M. and A. Anichini, *Unique tumor antigens: evidence for immune control of genome integrity and immunogenic targets for T cell-mediated patient-specific immunotherapy*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(17): p. 5023-32.
196. Linard, B., et al., *A ras-mutated peptide targeted by CTL infiltrating a human melanoma lesion*. J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4802-8.
197. Scanlan, M.J., A.J. Simpson, and L.J. Old, *The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary*. Cancer Immun, 2004. **4**: p. 1.
198. Caballero, O.L. and Y.T. Chen, *Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy*. Cancer Sci, 2009. **100**(11): p. 2014-21.
199. Cartron, P.F., et al., *HDAC1-mSin3a-NCOR1, Dnmt3b-HDAC1-Egr1 and Dnmt1-PCNA-UHRF1-G9a regulate the NY-ESO1 gene expression*. Mol Oncol, 2012.
200. Rensing, M.E., et al., *Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A\*0201-binding peptides*. J Immunol, 1995. **154**(11): p. 5934-43.
201. Bocchia, M., et al., *Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides*. Blood, 1996. **87**(9): p. 3587-92.

202. Topfer, K., et al., *Tumor evasion from T cell surveillance*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 918471.
203. Yee, C., et al., *Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo*. J Exp Med, 2000. **192**(11): p. 1637-44.
204. Meissner, M., et al., *Defects in the human leukocyte antigen class I antigen processing machinery in head and neck squamous cell carcinoma: association with clinical outcome*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(7): p. 2552-60.
205. Korkolopoulou, P., et al., *Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer*. Br J Cancer, 1996. **73**(2): p. 148-53.
206. Sanda, M.G., et al., *Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(4): p. 280-5.
207. Maleno, I., et al., *Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21*. Immunogenetics, 2004. **56**(4): p. 244-53.
208. Maleno, I., et al., *LOH at 6p21.3 region and HLA class I altered phenotypes in bladder carcinomas*. Immunogenetics, 2006. **58**(7): p. 503-10.
209. Bicknell, D.C., A. Rowan, and W.F. Bodmer, *Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(11): p. 4751-5.
210. Seliger, B., *Molecular mechanisms of MHC class I abnormalities and APM components in human tumors*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(11): p. 1719-26.
211. Piali, L., et al., *Endothelial vascular cell adhesion molecule 1 expression is suppressed by melanoma and carcinoma*. J Exp Med, 1995. **181**(2): p. 811-6.
212. Weishaupt, C., et al., *T-cell distribution and adhesion receptor expression in metastatic melanoma*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(9): p. 2549-56.
213. Medema, J.P., et al., *Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11515-20.
214. Griffith, T.S., et al., *Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells*. J Immunol, 1998. **161**(6): p. 2833-40.
215. Peli, J., et al., *Oncogenic Ras inhibits Fas ligand-mediated apoptosis by downregulating the expression of Fas*. EMBO J, 1999. **18**(7): p. 1824-31.
216. Shin, M.S., et al., *Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers*. Cancer Res, 2001. **61**(13): p. 4942-6.
217. Zou, W. and L. Chen, *Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 467-77.
218. Ranges, G.E., et al., *Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1987. **166**(4): p. 991-8.
219. Pockaj, B.A., et al., *Reduced T-cell and dendritic cell function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E2 secretion in patients with breast cancer*. Ann Surg Oncol, 2004. **11**(3): p. 328-39.
220. Perillo, N.L., et al., *Apoptosis of T cells mediated by galectin-1*. Nature, 1995. **378**(6558): p. 736-9.
221. Hahne, M., et al., *Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape*. Science, 1996. **274**(5291): p. 1363-6.
222. Shiraki, K., et al., *Expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human hepatocellular carcinoma*. Int J Oncol, 2005. **26**(5): p. 1273-81.

223. Baay, M., et al., *Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy*. Clin Dev Immunol, 2011. **2011**: p. 565187.
224. Sakaguchi, S., et al., *Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 8-27.
225. Almand, B., et al., *Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1755-66.
226. Izzi, V., et al., *Differential effects of malignant mesothelioma cells on THP-1 monocytes and macrophages*. Int J Oncol, 2009. **34**(2): p. 543-50.
227. Sharma, S., et al., *Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+ CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5211-20.
228. Fitzpatrick, D.R., D.J. Peroni, and H. Bielefeldt-Ohmann, *The role of growth factors and cytokines in the tumorigenesis and immunobiology of malignant mesothelioma*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **12**(5): p. 455-60.
229. Waddington, C.H., *The epigenotype. 1942*. Int J Epidemiol, 2012. **41**(1): p. 10-3.
230. Feinberg, A.P. and B. Tycko, *The history of cancer epigenetics*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 143-53.
231. Labrie, V., S. Pai, and A. Petronis, *Epigenetics of major psychosis: progress, problems and perspectives*. Trends Genet, 2012.
232. Rodriguez-Rodero, S., et al., *Aging genetics and aging*. Aging Dis, 2011. **2**(3): p. 186-95.
233. Iacobuzio-Donahue, C.A., *Epigenetic changes in cancer*. Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 229-49.
234. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
235. Goll, M.G. and T.H. Bestor, *Eukaryotic cytosine methyltransferases*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 481-514.
236. Ng, H.H. and A. Bird, *DNA methylation and chromatin modification*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(2): p. 158-63.
237. Davuluri, R.V., I. Grosse, and M.Q. Zhang, *Computational identification of promoters and first exons in the human genome*. Nat Genet, 2001. **29**(4): p. 412-7.
238. Guo, D., et al., *A possible gene silencing mechanism: Hypermethylation of the Keap1 promoter abrogates binding of the transcription factor Sp1 in lung cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2012.
239. Defossez, P.A. and I. Stancheva, *Biological functions of methyl-CpG-binding proteins*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2011. **101**: p. 377-98.
240. Xie, S., et al., *Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family*. Gene, 1999. **236**(1): p. 87-95.
241. Bestor, T.H., *The DNA methyltransferases of mammals*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(16): p. 2395-402.
242. Thiagarajan, D., R.R. Dev, and S. Khosla, *The DNA methyltransferase Dnmt2 participates in RNA processing during cellular stress*. Epigenetics, 2011. **6**(1): p. 103-13.
243. Bruniquel, D. and R.H. Schwartz, *Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 235-40.
244. Metivier, R., et al., *Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter*. Nature, 2008. **452**(7183): p. 45-50.
245. Kim, M.S., et al., *DNA demethylation in hormone-induced transcriptional derepression*. Nature, 2009. **461**(7266): p. 1007-12.
246. Wu, S.C. and Y. Zhang, *Active DNA demethylation: many roads lead to Rome*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(9): p. 607-20.
247. Wu, H. and Y. Zhang, *Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation*. Genes Dev, 2011. **25**(23): p. 2436-52.

248. Cortellino, S., et al., *Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair*. Cell, 2011. **146**(1): p. 67-79.
249. Mercher, T., et al., *[In cauda venenum or the importance of TET(2)]*. Med Sci (Paris), 2011. **27**(12): p. 1064-6.
250. Williamson, R., *Properties of rapidly labelled deoxyribonucleic acid fragments isolated from the cytoplasm of primary cultures of embryonic mouse liver cells*. J Mol Biol, 1970. **51**(1): p. 157-68.
251. Olins, A.L. and D.E. Olins, *Spheroid chromatin units (v bodies)*. Science, 1974. **183**(4122): p. 330-2.
252. Oudet, P., M. Gross-Bellard, and P. Chambon, *Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit*. Cell, 1975. **4**(4): p. 281-300.
253. Kornberg, R.D. and J.O. Thomas, *Chromatin structure; oligomers of the histones*. Science, 1974. **184**(4139): p. 865-8.
254. Kornberg, R.D., *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*. Science, 1974. **184**(4139): p. 868-71.
255. Phillips, D.M. and E.W. Johns, *A Fractionation of the Histones of Group F2a from Calf Thymus*. Biochem J, 1965. **94**: p. 127-30.
256. Fullgrabe, J., E. Kavanagh, and B. Joseph, *Histone onco-modifications*. Oncogene, 2011. **30**(31): p. 3391-403.
257. Cosgrove, M.S. and C. Wolberger, *How does the histone code work?* Biochem Cell Biol, 2005. **83**(4): p. 468-76.
258. Groth, A., et al., *Regulation of replication fork progression through histone supply and demand*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1928-31.
259. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
260. Kusch, T. and J.L. Workman, *Histone variants and complexes involved in their exchange*. Subcell Biochem, 2007. **41**: p. 91-109.
261. Shilatifard, A., *Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 243-69.
262. Dawson, M.A. and T. Kouzarides, *Cancer epigenetics: from mechanism to therapy*. Cell, 2012. **150**(1): p. 12-27.
263. Shogren-Knaak, M. and C.L. Peterson, *Switching on chromatin: mechanistic role of histone H4-K16 acetylation*. Cell Cycle, 2006. **5**(13): p. 1361-5.
264. Shogren-Knaak, M., et al., *Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions*. Science, 2006. **311**(5762): p. 844-7.
265. Shahbazian, M.D. and M. Grunstein, *Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 75-100.
266. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
267. Owen, D.J., et al., *The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p*. EMBO J, 2000. **19**(22): p. 6141-9.
268. Carrozza, M.J., et al., *The diverse functions of histone acetyltransferase complexes*. Trends Genet, 2003. **19**(6): p. 321-9.
269. Marmorstein, R. and S.Y. Roth, *Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(2): p. 155-61.
270. Allis, C.D., et al., *New nomenclature for chromatin-modifying enzymes*. Cell, 2007. **131**(4): p. 633-6.
271. Gregoret, I.V., Y.M. Lee, and H.V. Goodson, *Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis*. J Mol Biol, 2004. **338**(1): p. 17-31.
272. Holbert, M.A. and R. Marmorstein, *Structure and activity of enzymes that remove histone modifications*. Curr Opin Struct Biol, 2005. **15**(6): p. 673-80.

273. MacDonald, V.E. and L.J. Howe, *Histone acetylation: where to go and how to get there*. Epigenetics, 2009. **4**(3): p. 139-43.
274. Minucci, S. and P.G. Pelicci, *Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(1): p. 38-51.
275. Xu, W.S., R.B. Parmigiani, and P.A. Marks, *Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action*. Oncogene, 2007. **26**(37): p. 5541-52.
276. Greer, E.L. and Y. Shi, *Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(5): p. 343-57.
277. Shi, Y., et al., *Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1*. Cell, 2004. **119**(7): p. 941-53.
278. Nguyen, C.T., et al., *Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine*. Cancer Res, 2002. **62**(22): p. 6456-61.
279. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer*. Cell, 2007. **128**(4): p. 683-92.
280. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.
281. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts*. Nature, 1983. **301**(5895): p. 89-92.
282. Gama-Sosa, M.A., et al., *The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors*. Nucleic Acids Res, 1983. **11**(19): p. 6883-94.
283. Esteller, M., *Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome*. Hum Mol Genet, 2007. **16 Spec No 1**: p. R50-9.
284. Greger, V., et al., *Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma*. Hum Genet, 1989. **83**(2): p. 155-8.
285. Sakai, T., et al., *Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene*. Am J Hum Genet, 1991. **48**(5): p. 880-8.
286. Tachibana, M., et al., *G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription*. EMBO J, 2008. **27**(20): p. 2681-90.
287. Cedar, H. and Y. Bergman, *Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(5): p. 295-304.
288. Zhao, Q., et al., *PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(3): p. 304-11.
289. Vaissiere, T., C. Sawan, and Z. Herceg, *Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing*. Mutat Res, 2008. **659**(1-2): p. 40-8.
290. Wang, G.G., C.D. Allis, and P. Chi, *Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications*. Trends Mol Med, 2007. **13**(9): p. 363-72.
291. Fraga, M.F., et al., *Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer*. Nat Genet, 2005. **37**(4): p. 391-400.
292. Deckert, J. and K. Struhl, *Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(8): p. 2726-35.
293. Kotake, Y., et al., *pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene*. Genes Dev, 2007. **21**(1): p. 49-54.
294. Christman, J.K., *5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy*. Oncogene, 2002. **21**(35): p. 5483-95.
295. Sorm, F., et al., *5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic*. Experientia, 1964. **20**(4): p. 202-3.
296. Yoo, C.B. and P.A. Jones, *Epigenetic therapy of cancer: past, present and future*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(1): p. 37-50.



297. Silverman, L.R., et al., *Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B*. J Clin Oncol, 2002. **20**(10): p. 2429-40.
298. Kantarjian, H.M., et al., *Results of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia*. Cancer, 2003. **98**(3): p. 522-8.
299. Fandy, T.E., H. Carraway, and S.D. Gore, *DNA demethylating agents and histone deacetylase inhibitors in hematologic malignancies*. Cancer J, 2007. **13**(1): p. 40-8.
300. Marks, P.A. and R. Breslow, *Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(1): p. 84-90.
301. Finnin, M.S., et al., *Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors*. Nature, 1999. **401**(6749): p. 188-93.
302. Blanquart, C., et al., *Pharmacological characterization of histone deacetylase inhibitor and tumor cell-growth inhibition properties of new benzofuranone compounds*. Curr Cancer Drug Targets, 2011. **11**(8): p. 919-28.
303. Zhao, Y., et al., *Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(44): p. 16090-5.
304. Xu, Y., *Regulation of p53 responses by post-translational modifications*. Cell Death Differ, 2003. **10**(4): p. 400-3.
305. Jeong, J.W., et al., *Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation*. Cell, 2002. **111**(5): p. 709-20.
306. Mann, B.S., et al., *FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma*. Oncologist, 2007. **12**(10): p. 1247-52.
307. Marchion, D. and P. Munster, *Development of histone deacetylase inhibitors for cancer treatment*. Expert Rev Anticancer Ther, 2007. **7**(4): p. 583-98.
308. Leclercq, S., et al., *A 5-aza-2'-deoxycytidine/valproate combination induces cytotoxic T-cell response against mesothelioma*. Eur Respir J, 2011. **38**(5): p. 1105-16.
309. Guillot, F., et al., *Vaccination with epigenetically treated mesothelioma cells induces immunisation and blocks tumour growth*. Vaccine, 2011. **29**(33): p. 5534-43.
310. Guo, Z.S., et al., *De novo induction of a cancer/testis antigen by 5-aza-2'-deoxycytidine augments adoptive immunotherapy in a murine tumor model*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 1105-13.
311. Goodyear, O., et al., *Induction of a CD8+ T-cell response to the MAGE cancer testis antigen by combined treatment with azacitidine and sodium valproate in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia*. Blood, 2010. **116**(11): p. 1908-18.
312. Mundlos, S., et al., *Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues*. Development, 1993. **119**(4): p. 1329-41.
313. Oji, Y., et al., *Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth*. Jpn J Cancer Res, 1999. **90**(2): p. 194-204.
314. Gendler, S.J., et al., *Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin*. J Biol Chem, 1990. **265**(25): p. 15286-93.
315. Lan, M.S., et al., *Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA*. J Biol Chem, 1990. **265**(25): p. 15294-9.
316. Muller, S., et al., *High density O-glycosylation on tandem repeat peptide from secretory MUC1 of T47D breast cancer cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18165-72.
317. Burchell, J., et al., *Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin*. Cancer Res, 1987. **47**(20): p. 5476-82.

318. Girling, A., et al., *A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas*. *Int J Cancer*, 1989. **43**(6): p. 1072-6.
319. Lloyd, K.O., et al., *Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(52): p. 33325-34.
320. Barnd, D.L., et al., *Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(18): p. 7159-63.
321. Noto, H., et al., *Cytotoxic T lymphocytes derived from bone marrow mononuclear cells of multiple myeloma patients recognize an underglycosylated form of MUC1 mucin*. *Int Immunol*, 1997. **9**(5): p. 791-8.
322. Ioannides, C.G., et al., *Cytotoxic T cells from ovarian malignant tumors can recognize polymorphic epithelial mucin core peptides*. *J Immunol*, 1993. **151**(7): p. 3693-703.
323. Takahashi, T., et al., *Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient*. *J Immunol*, 1994. **153**(5): p. 2102-9.
324. Jerome, K.R., et al., *Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells*. *Cancer Res*, 1991. **51**(11): p. 2908-16.
325. Hinoda, Y., et al., *Enhancement of reactivity of anti-MUC1 core protein antibody and killing activity of anti-MUC1 cytotoxic T cells by deglycosylation of target tissues or cells*. *J Gastroenterol*, 1998. **33**(2): p. 164-71.
326. Domenech, N., R.A. Henderson, and O.J. Finn, *Identification of an HLA-A11-restricted epitope from the tandem repeat domain of the epithelial tumor antigen mucin*. *J Immunol*, 1995. **155**(10): p. 4766-74.
327. Apostolopoulos, V., et al., *Induction of HLA-A2-restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen*. *J Immunol*, 1997. **159**(11): p. 5211-8.
328. Brossart, P., et al., *Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies*. *Blood*, 1999. **93**(12): p. 4309-17.
329. Brossart, P., et al., *The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes*. *Cancer Res*, 2001. **61**(18): p. 6846-50.
330. Peat, N., et al., *Tissue-specific expression of a human polymorphic epithelial mucin (MUC1) in transgenic mice*. *Cancer Res*, 1992. **52**(7): p. 1954-60.
331. Rowse, G.J., et al., *Tolerance and immunity to MUC1 in a human MUC1 transgenic murine model*. *Cancer Res*, 1998. **58**(2): p. 315-21.
332. Soares, M.M., V. Mehta, and O.J. Finn, *Three different vaccines based on the 140-amino acid MUC1 peptide with seven tandemly repeated tumor-specific epitopes elicit distinct immune effector mechanisms in wild-type versus MUC1-transgenic mice with different potential for tumor rejection*. *J Immunol*, 2001. **166**(11): p. 6555-63.
333. Kohlgraf, K.G., et al., *Tumor-specific immunity in MUC1.Tg mice induced by immunization with peptide vaccines from the cytoplasmic tail of CD227 (MUC1)*. *Cancer Immunol Immunother*, 2004. **53**(12): p. 1068-84.
334. Tempero, R.M., et al., *CD4+ lymphocytes provide MUC1-specific tumor immunity in vivo that is undetectable in vitro and is absent in MUC1 transgenic mice*. *J Immunol*, 1998. **161**(10): p. 5500-6.
335. Tempero, R.M., et al., *Passively transferred anti-MUC1 antibodies cause neither autoimmune disorders nor immunity against transplanted tumors in MUC1 transgenic mice*. *Int J Cancer*, 1999. **80**(4): p. 595-9.

336. Budiu, R.A., et al., *A conditional mouse model for human MUC1-positive endometriosis shows the presence of anti-MUC1 antibodies and Foxp3+ regulatory T cells*. *Dis Model Mech*, 2009. **2**(11-12): p. 593-603.
337. Ryan, S.O., et al., *Tumor-associated MUC1 glycopeptide epitopes are not subject to self-tolerance and improve responses to MUC1 peptide epitopes in MUC1 transgenic mice*. *Biol Chem*, 2009. **390**(7): p. 611-8.
338. Tang, C.K., et al., *Oxidized and reduced mannan mediated MUC1 DNA immunization induce effective anti-tumor responses*. *Vaccine*, 2008. **26**(31): p. 3827-34.
339. Ryan, S.O., et al., *Tumor antigen epitopes interpreted by the immune system as self or abnormal-self differentially affect cancer vaccine responses*. *Cancer Res*, 2010. **70**(14): p. 5788-96.
340. Trumpfheller, C., et al., *Dendritic cell-targeted protein vaccines: a novel approach to induce T-cell immunity*. *J Intern Med*, 2012. **271**(2): p. 183-92.
341. Jeon, Y.H., et al., *In vivo bioluminescence visualization of antitumor effects by human MUC1 vaccination*. *Mol Imaging*, 2007. **6**(5): p. 297-303.
342. Sugiura, D., et al., *Differential effector mechanisms induced by vaccination with MUC1 DNA in the rejection of colon carcinoma growth at orthotopic sites and metastases*. *Cancer Sci*, 2008. **99**(12): p. 2477-84.
343. Rong, Y., et al., *Induction of protective and therapeutic anti-pancreatic cancer immunity using a reconstructed MUC1 DNA vaccine*. *BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 191.
344. Masse, D., et al., *Increased expression of inducible HSP70 in apoptotic cells is correlated with their efficacy for antitumor vaccine therapy*. *Int J Cancer*, 2004. **111**(4): p. 575-83.
345. Choi, Y., et al., *Treatment with mANT2 shRNA enhances antitumor therapeutic effects induced by MUC1 DNA vaccination*. *Mol Ther*, 2011. **19**(5): p. 979-89.
346. Wright, S.E., et al., *Retention of immunogenicity produced by mucin 1 peptides with glycosylation site substitutions*. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2010. **32**(4): p. 647-55.
347. Chen, J., et al., *Human dendritic cells transfected with amplified MUC1 mRNA stimulate cytotoxic T lymphocyte responses against pancreatic cancer in vitro*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011. **26**(10): p. 1509-18.
348. Kobukai, S., et al., *Induction of antitumor immunity by dendritic cells loaded with membrane-translocating mucin 1 Peptide antigen*. *Transl Oncol*, 2011. **4**(1): p. 1-8.
349. Kovjazin, R., et al., *ImMucin: a novel therapeutic vaccine with promiscuous MHC binding for the treatment of MUC1-expressing tumors*. *Vaccine*, 2011. **29**(29-30): p. 4676-86.
350. Lakshminarayanan, V., et al., *Immune recognition of tumor-associated mucin MUC1 is achieved by a fully synthetic aberrantly glycosylated MUC1 tripartite vaccine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(1): p. 261-6.
351. Deguchi, T., et al., *Increased immunogenicity of tumor-associated antigen, mucin 1, engineered to express alpha-gal epitopes: a novel approach to immunotherapy in pancreatic cancer*. *Cancer Res*, 2010. **70**(13): p. 5259-69.
352. Choi, D.H., et al., *A novel chimeric DNA vaccine: enhancement of preventive and therapeutic efficacy of DNA vaccine by fusion of Mucin 1 to a heat shock protein 70 gene*. *Mol Med Report*, 2011. **4**(5): p. 885-90.
353. Sangha, R. and S. North, *L-BLP25: a MUC1-targeted peptide vaccine therapy in prostate cancer*. *Expert Opin Biol Ther*, 2007. **7**(11): p. 1723-30.
354. Sharma, S., et al., *MUC1 peptide vaccine mediated antitumor activity in non-small cell lung cancer*. *Expert Opin Biol Ther*, 2011. **11**(8): p. 987-90.
355. Palmer, M., et al., *Phase I study of the BLP25 (MUC1 peptide) liposomal vaccine for active specific immunotherapy in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer*. *Clin Lung Cancer*, 2001. **3**(1): p. 49-57; discussion 58.

356. Ohyanagi, F., et al., *Safety of BLP25 liposome vaccine (L-BLP25) in Japanese patients with unresectable stage III NSCLC after primary chemoradiotherapy: preliminary results from a Phase I/II study*. Jpn J Clin Oncol, 2011. **41**(5): p. 718-22.
357. Butts, C., et al., *Updated survival analysis in patients with stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer receiving BLP25 liposome vaccine (L-BLP25): phase IIB randomized, multicenter, open-label trial*. J Cancer Res Clin Oncol, 2011. **137**(9): p. 1337-42.
358. Wu, Y.L., et al., *INSPIRE: A phase III study of the BLP25 liposome vaccine (L-BLP25) in Asian patients with unresectable stage III non-small cell lung cancer*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 430.
359. Ramlau, R., et al., *A phase II study of Tg4010 (Mva-Muc1-IL2) in association with chemotherapy in patients with stage III/IV Non-small cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2008. **3**(7): p. 735-44.
360. Dreicer, R., et al., *MVA-MUC1-IL2 vaccine immunotherapy (TG4010) improves PSA doubling time in patients with prostate cancer with biochemical failure*. Invest New Drugs, 2009. **27**(4): p. 379-86.
361. Oudard, S., et al., *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 Immunol Immunother, 2011. **60**(2): p. 261-71.
362. Quoix, E., et al., *Therapeutic vaccination with TG4010 and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a controlled phase 2B trial*. Lancet Oncol, 2011. **12**(12): p. 1125-33.
363. Apostolopoulos, V., et al., *Pilot phase III immunotherapy study in early-stage breast cancer patients using oxidized mannan-MUC1 [ISRCTN71711835]*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(3): p. R27.
364. Butts, C., et al., *A multicenter open-label study to assess the safety of a new formulation of BLP25 liposome vaccine in patients with unresectable stage III non-small-cell lung cancer*. Clin Lung Cancer, 2010. **11**(6): p. 391-5.
365. Wright, S.E., et al., *Tumor burden influences cytotoxic T cell development in metastatic breast cancer patients--a phase I/II study*. Immunol Invest, 2009. **38**(8): p. 820-38.
366. Lepisto, A.J., et al., *A phase I/II study of a MUC1 peptide pulsed autologous dendritic cell vaccine as adjuvant therapy in patients with resected pancreatic and biliary tumors*. Cancer Ther, 2008. **6**(B): p. 955-964.
367. Kondo, H., et al., *Adoptive immunotherapy for pancreatic cancer using MUC1 peptide-pulsed dendritic cells and activated T lymphocytes*. Anticancer Res, 2008. **28**(1B): p. 379-87.
368. Dobrzanski, M.J., et al., *Immunotherapy with IL-10- and IFN-gamma-producing CD4 effector cells modulate "Natural" and "Inducible" CD4 TReg cell subpopulation levels: observations in four cases of patients with ovarian cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(6): p. 839-54.
369. Mohebtash, M., et al., *A pilot study of MUC-1/CEA/TRICOM poxviral-based vaccine in patients with metastatic breast and ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(22): p. 7164-73.
370. Ibrahim, N.K., et al., *Randomized phase II trial of letrozole plus anti-MUC1 antibody AS1402 in hormone receptor-positive locally advanced or metastatic breast cancer*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(21): p. 6822-30.
371. Pegram, M.D., et al., *Phase I dose escalation pharmacokinetic assessment of intravenous humanized anti-MUC1 antibody AS1402 in patients with advanced breast cancer*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(5): p. R73.
372. Rittig, S.M., et al., *Intradermal vaccinations with RNA coding for TAA generate CD8+ and CD4+ immune responses and induce clinical benefit in vaccinated patients*. Mol Ther, 2011. **19**(5): p. 990-9.
373. Senapati, S., S. Das, and S.K. Batra, *Mucin-interacting proteins: from function to therapeutics*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(4): p. 236-45.

374. Jonckheere, N. and I. Van Seuning, *The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers*. *Biochimie*, 2010. **92**(1): p. 1-11.
375. Kufe, D., *Oncogenic function of the MUC1 receptor subunit in gene regulation*. *Oncogene*, 2010. **29**(42): p. 5663-6.
376. Yu, L.G., et al., *Galectin-3 interaction with Thomsen-Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(1): p. 773-81.
377. Schroeder, J.A., et al., *Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(16): p. 13057-64.
378. Ramasamy, S., et al., *The MUC1 and galectin-3 oncoproteins function in a microRNA-dependent regulatory loop*. *Mol Cell*, 2007. **27**(6): p. 992-1004.
379. Ahmad, R., et al., *MUC1 oncoprotein activates the I $\kappa$ B kinase beta complex and constitutive NF- $\kappa$ B signalling*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(12): p. 1419-27.
380. Ren, J., et al., *MUC1 oncoprotein is targeted to mitochondria by heregulin-induced activation of c-Src and the molecular chaperone HSP90*. *Oncogene*, 2006. **25**(1): p. 20-31.
381. Ren, J., et al., *Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents*. *Cancer Cell*, 2004. **5**(2): p. 163-75.
382. Yamamoto, M., et al., *Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(19): p. 12492-4.
383. Schroeder, J.A., et al., *MUC1 alters beta-catenin-dependent tumor formation and promotes cellular invasion*. *Oncogene*, 2003. **22**(9): p. 1324-32.
384. Bitler, B.G., et al., *Intracellular MUC1 peptides inhibit cancer progression*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(1): p. 100-9.
385. Raina, D., et al., *Targeting cysteine-mediated dimerization of the MUC1-C oncoprotein in human cancer cells*. *Int J Oncol*, 2012. **40**(5): p. 1643-9.
386. Raina, D., et al., *Dependence on the MUC1-C oncoprotein in non-small cell lung cancer cells*. *Mol Cancer Ther*, 2011. **10**(5): p. 806-16.
387. Brayman, M.J., et al., *MUC1 expression is repressed by protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription- $\gamma$* . *Mol Endocrinol*, 2007. **21**(11): p. 2725-37.
388. Dorn, D.C., U. Harnack, and G. Pecher, *Down-regulation of the human tumor antigen mucin by gemcitabine on the pancreatic cancer cell line capan-2*. *Anticancer Res*, 2004. **24**(2B): p. 821-5.
389. Yamada, N., et al., *MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells*. *Cancer Res*, 2008. **68**(8): p. 2708-16.
390. Sapede, C., et al., *Aberrant splicing and protease involvement in mesothelin release from epithelioid mesothelioma cells*. *Cancer Sci*, 2008. **99**(3): p. 590-4.
391. Gueugnon, F., et al., *Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma*. *Am J Pathol*, 2011. **178**(3): p. 1033-42.
392. Blanquart, C., et al., *CCL2, galectin-3, and SMRP combination improves the diagnosis of mesothelioma in pleural effusions*. *J Thorac Oncol*, 2012. **7**(5): p. 883-9.
393. Krug, L.M., et al., *WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8 T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer*. *Cancer Immunol Immunother*, 2010. **59**(10): p. 1467-79.
394. Thomas, A.M., et al., *Mesothelin-specific CD8(+) T cell responses provide evidence of in vivo cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients*. *J Exp Med*, 2004. **200**(3): p. 297-306.

395. Fonteneau, J.F., et al., *Generation of high quantities of viral and tumor-specific human CD4+ and CD8+ T-cell clones using peptide pulsed mature dendritic cells*. J Immunol Methods, 2001. **258**(1-2): p. 111-26.
396. Roulois, D., et al., *Recognition of pleural mesothelioma by mucin-1(950-958)/human leukocyte antigen A\*0201-specific CD8+ T-cells*. Eur Respir J, 2011. **38**(5): p. 1117-26.
397. Kindler, H.L., et al., *Multicenter, double-blind, placebo-controlled, randomized phase II trial of gemcitabine/cisplatin plus bevacizumab or placebo in patients with malignant mesothelioma*. J Clin Oncol, 2012. **30**(20): p. 2509-15.
398. Benlalam, H., et al., *Comprehensive analysis of the frequency of recognition of melanoma-associated antigen (MAA) by CD8 melanoma infiltrating lymphocytes (TIL): implications for immunotherapy*. Eur J Immunol, 2001. **31**(7): p. 2007-15.
399. Labarriere, N., et al., *Therapeutic efficacy of melanoma-reactive TIL injected in stage III melanoma patients*. Cancer Immunol Immunother, 2002. **51**(10): p. 532-8.
400. Currie, A.J., et al., *Dual control of antitumor CD8 T cells through the programmed death-1/programmed death-ligand 1 pathway and immunosuppressive CD4 T cells: regulation and counterregulation*. J Immunol, 2009. **183**(12): p. 7898-908.
401. Blank, C., T.F. Gajewski, and A. Mackensen, *Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**(4): p. 307-14.
402. Warren, E.H., et al., *An antigen produced by splicing of noncontiguous peptides in the reverse order*. Science, 2006. **313**(5792): p. 1444-7.
403. Bafna, S., S. Kaur, and S.K. Batra, *Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells*. Oncogene, 2010. **29**(20): p. 2893-904.
404. Klee, G.G. and W.E. Schreiber, *MUC1 gene-derived glycoprotein assays for monitoring breast cancer (CA 15-3, CA 27.29, BR): are they measuring the same antigen?* Arch Pathol Lab Med, 2004. **128**(10): p. 1131-5.
405. Hiltbold, E.M., et al., *Presentation of MUC1 tumor antigen by class I MHC and CTL function correlate with the glycosylation state of the protein taken up by dendritic cells*. Cell Immunol, 1999. **194**(2): p. 143-9.
406. Vlad, A.M., et al., *Complex carbohydrates are not removed during processing of glycoproteins by dendritic cells: processing of tumor antigen MUC1 glycopeptides for presentation to major histocompatibility complex class II-restricted T cells*. J Exp Med, 2002. **196**(11): p. 1435-46.
407. Madsen, C.B., et al., *Cancer associated aberrant protein o-glycosylation can modify antigen processing and immune response*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50139.
408. Sigalotti, L., et al., *Cancer testis antigens expression in mesothelioma: role of DNA methylation and bioimmunotherapeutic implications*. Br J Cancer, 2002. **86**(6): p. 979-82.
409. Ahmad, R., et al., *MUC1-C oncoprotein promotes STAT3 activation in an autoinductive regulatory loop*. Sci Signal, 2011. **4**(160): p. ra9.
410. Uchida, Y., et al., *Inhibition of the MUC1-C oncoprotein is synergistic with cytotoxic agents in the treatment of breast cancer cells*. Cancer Biol Ther, 2012. **14**(2).

## ANNEXES

### **Annexe 1: The combination of CCL2, LGALS3 and soluble mesothelin related peptide biomarkers improves the diagnosis of Mesothelioma in pleural effusions**

**The combination of CCL2, LGALS3 and soluble mesothelin related peptide biomarkers improves the diagnosis of Mesothelioma in pleural effusions.** Blanquart C, Gueugnon F, Nguyen JM, Roulois D, Cellerin L, Sagan C, Perigaud C, Scherpereel A, and Gregoire M. J. Thor. Oncol., 7(5):883-889. 2012.

#### OBJECTIFS ET RESULTATS PRINCIPAUX:

La recherche de nouveaux biomarqueurs du MPM est un enjeu majeur dans la prise en charge de cette maladie. En effet, le diagnostic différentiel entre un MPM et une métastase d'un autre cancer, notamment des métastases d'adénocarcinome pulmonaire, est parfois très difficile. Il est donc important de trouver de nouveaux biomarqueurs, permettant de diagnostiquer plus précocement, avec une robustesse plus grande les patients atteints d'un MPM.

Dans cette étude, des dosages Elisa ont été réalisés à partir d'une collection d'échantillons de liquides pleuraux de patients, afin de comparer le potentiel diagnostique de nouveaux marqueurs CCL2, SLP1 et galectine-3 par rapport à des peptides solubles de la mésothéline (SMRP). Cela permet aussi d'évaluer l'intérêt de combiner ces différents marqueurs pour obtenir un diagnostic fiable.

Dans cette étude, une augmentation significative de la SMRP, de CCL2 et de SLP1 a été observée dans les liquides pleuraux de patients atteints d'un mésothéliome. La galectine-3 qui est quant à elle présente à un niveau plus élevé dans les liquides pleuraux de patients atteints d'un adénocarcinome pulmonaire.

Une analyse statistique a permis de mettre en évidence que la combinaison du dosage de trois de ces biomarqueurs SMRP/CCL2/galectine-3 permet d'augmenter la robustesse du diagnostic de cette maladie en comparaison de l'utilisation de la SMRP seule.

Cette combinaison de biomarqueurs semble donc être prometteuse afin de réaliser un diagnostic différentiel des patients atteints d'un MPM ou d'une métastase d'adénocarcinome pulmonaire, à partir des liquides pleuraux.

## CCL2, Galectin-3, and SMRP Combination Improves the Diagnosis of Mesothelioma in Pleural Effusions

Christophe Blanquart, PhD,\* Fabien Gueugnon, PhD,\* Jean-Michel Nguyen, MD,\*†  
David Roulois, PhD Student,\* Laurent Cellerin, MD,‡ Christine Sagan, MD,§  
Christian Perigaud, MD,‡ Arnaud Scherpereel, MD, PhD,||¶ and Marc Gregoire, PhD\*

**Introduction:** Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a highly aggressive tumor with poor prognosis. One major challenge for this disease is the development of new, early, and highly reliable diagnostic markers. The aim of this study was to compare the diagnostic value of the chemokine chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), galectin-3, and the secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) with soluble mesothelin-related peptides (SMRP), and to evaluate the diagnostic performance of marker combinations.

**Methods:** The levels of the different markers were measured by enzyme-linked immunosorbent assay in pleural fluids from patients with MPM ( $n = 61$ ), adenocarcinomas (ADCA,  $n = 25$ ), or with benign pleural effusions (BPE,  $n = 15$ ).

**Results:** SMRP, SLPI, and CCL2 concentrations were significantly higher in pleural effusions from mesothelioma patients. Conversely, galectin-3 levels seemed to be elevated in patients with pulmonary ADCA. Receiver operating characteristic curve analysis revealed that SMRP (area under the curve [AUC] = 0.9059), CCL2 (AUC = 0.7912), galectin-3 (AUC = 0.7584), and SLPI (AUC = 0.7219) were potentially interesting biomarkers for the differentiation of MPM patients from those with BPE or ADCA. Of interest, we showed that the combination of SMRP/CCL2/galectin-3 greatly improved MPM diagnosis (AUC = 0.9680), when compared with SMRP alone.

**Conclusion:** The combination of SMRP/CCL2/galectin-3 seems to represent a promising panel of biomarkers for the reliable diagnosis of MPM in pleural fluids.

**Key Words:** Mesothelioma, Tumor markers, Diagnosis, Pleural effusions, Mesothelin.

(*J Thorac Oncol.* 2012;7: 883–889)

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a rare cancer, usually associated with asbestos exposure. As a consequence of the widespread use of asbestos over the past century, and the long latency period between asbestos exposure and tumor development, the worldwide incidence of MPM is expected to continue to rise substantially over the next 2 decades.<sup>1,2</sup>

The diagnosis of MPM is difficult because (1) the disease may arise in patients up to 40 years after asbestos exposure, (2) the clinical and imaging signs of this cancer are rather nonspecific and may appear late, and (3) a definitive diagnosis, which relies on histology, can sometimes be very difficult to achieve.<sup>3</sup> It can also be difficult to distinguish MPM from benign pleural effusions (BPE)<sup>4</sup> or from other cancers, notably adenocarcinoma (ADCA).<sup>5,6</sup> In some cases, it is impossible to obtain a definitive diagnosis even after histological analysis of pleural biopsies or because tumor tissue was not available from frail patients. To date, no single marker or panel of soluble (dedicated) biomarkers has been established to obtain a clear diagnosis of MPM.<sup>7</sup> Such a marker or combination of markers could be very helpful for clinicians for an earlier diagnosis of mesothelioma, and perhaps for the management of the disease (disease monitoring, prediction of response to treatment, and prognostic evaluation).

Soluble markers are already used routinely in the diagnosis and/or tumor monitoring of several types of cancer.<sup>8,9</sup> Soluble markers, such as osteopontin<sup>10</sup> or soluble mesothelin-related peptides (SMRP)<sup>11–15</sup> have recently been identified as potentially useful in the evaluation of mesothelioma. The potential diagnostic value of SMRP in MPM was also supported by our study showing that SMRP results from an aberrant alternative messenger RNA splicing and metalloprotease shedding of mesothelin in mesothelioma cells.<sup>16</sup> However, SMRP is not secreted by some MPM, in particular the sarcomatoid mesothelioma subtype, which strongly limits its value in clinical practice. The identification and validation of new soluble markers are, thus, urgently needed to improve the noninvasive diagnosis of MPM. Because pleural effusion analysis is very often the first diagnostic step in patients

\*INSERM, U892, Institut de Recherche Thérapeutique Université de Nantes, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Nantes, France; †SEB (Service d'Epidémiologie et de Biostatistiques) PIMESP - Hôpital St Jacques - CHU Nantes, France; ‡Service d'Oncologie Médicale Thoracique et Digestive, Hôpital Laënnec, CHU de Nantes, France; §Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Laënnec, CHU de Nantes, France; ¶Service de Pneumologie et Oncologie Thoracique, CHRU de Lille, Faculté de Médecine Henri-Warembourg, Université de Lille - Nord de France; and ||Université de Lille-II, INSERM, U1019, CHU, Lille, France. Christophe Blanquart and Fabien Gueugnon contributed equally to this work.

Supported by INSERM and grants from la Ligue Interregionale Contre le Cancer (Comités Départementaux du Grand Ouest : CD44, CD85, CD72 and CD56), l'Association ARSMeso44 and la Région Pays de la Loire (Cancéropôle Grand Ouest).

Disclosure: The authors declare no conflict of interest.

Address for correspondence: Marc Gregoire, INSERM, U892, CRCNA, 8 quai Moncoussu, 44007 Nantes Cedex 01, France. E-mail: marc.gregoire@nantes.inserm.fr

Copyright © 2012 by the International Association for the Study of Lung Cancer  
ISSN: 1556-0864/12/883-889



suspected of MPM, we focused on the assessment of soluble biomarkers in pleural fluids.

The aim of this study was to compare and combine the diagnostic value for MPM of previously and newly identified soluble markers. In a previous study, we identified the chemokine, chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), and galectin-3 (LGALS3) as new, potential soluble markers for MPM diagnosis notably to differentiate MPM from lung adenocarcinoma.<sup>17</sup> In the present study, levels of CCL2, galectin-3, SMRP, and secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in pleural effusions from patients with suspected MPM or ADCA were compared. In addition, the expression of these soluble markers was also determined in the supernatants of cell lines (17 MPM and ADCA cell lines) that we established from pleural fluids. Individual- or combined-expression analyses of all soluble markers were performed to determine their abilities to obtain an accurate diagnosis of MPM.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

Pleural-effusion samples from patients consulting for chest pain or shortness of breath with a suspicion of MPM, or with a recent diagnosis of MPM, were aseptically collected by thoracentesis at the Laënnec Hospital (St.-Herblain, France) between 1998 and 2010. Samples were centrifuged at 1000 g in a Heraeus Multifuge for 20 minutes at +4°C and supernatants were aliquoted and stored at -80°C. Diagnoses were established by both fluid cytology and immunohistochemical staining of pleural biopsies performed by our pathology department, Laënnec Hospital (St.-Herblain, France), then externally confirmed by Mesopath, the French panel of pathology experts for the diagnosis of mesothelioma, dividing the patients into three groups (Table 1): 61 patients with MPM, 25 patients with metastasis from ADCA, and 15 patients with benign pleural effusions (BPE). All recruited patients had received no prior anticancer therapy and gave signed, informed consent.

### Enzyme-Linked Immunosorbent Assays

Pleural effusions were centrifuged and aliquots of pleural fluids were stored at -80°C until tested. Culture supernatants were collected as follows:  $2 \times 10^4$  cells were plated by well in 6-well plates. After 24 hours, three rinses were performed with complete, fetal calf serum (FCS)-free Roswell Park Memorial Institute 1640 medium. Two milliliters of complete Roswell

Park Memorial Institute 1640 medium containing 2% FCS were added to each well and culture supernatants were collected 24 hours later, centrifuged at 1000 g for 10 minutes, aliquoted and stored at -80°C. SMRP, SLPI, CCL2, and galectin-3 titrations were performed, respectively, with the MESOMARK immunoassay kit (CIS Bio International, Gif sur Yvette, France), the Human SLPI Assay Kit Quantikine (R&D Systems), the Human MCP-1 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (PromoKine), and the Human Galectin-3 ELISA kit (PromoKine) following the manufacturers' recommendations.

### Statistical Analysis

Comparisons of each population distribution were carried out using the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's post test. Biomarkers yielding  $p$  values < 0.05 in the univariate analyses were entered into a multiple logistic regression model. The final model included the biomarkers independently associated with the presence of MPM. Performances of the models were assessed by the Hosmer-Lemeshow statistical test and the measurement of the areas under receiver operating characteristic (ROC) curves. The best theoretical cutoffs were calculated by minimizing the distance between the point with specificity = 1 and sensitivity = 1 and the points on the ROC curves. Analyses were performed with  $R$  statistical software and GraphPad Prism (Prism 5 for Windows).

## RESULTS

### Determination of SMRP and SLPI Levels in Pleural Fluids

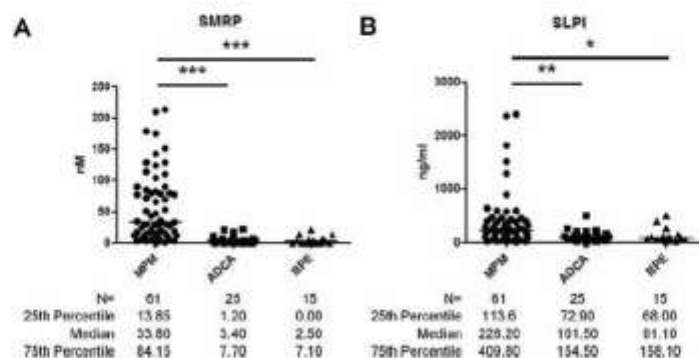
According to cytological and histological diagnoses, we established a collection of 61 pleural fluid samples from patients with MPM (49 epithelioid mesothelioma [EM], four mixed mesothelioma [MM], four sarcomatoid mesothelioma [SM] and four unspecified), 25 samples from patients with ADCA metastasis and 15 samples from patients with BPE (Table 1). We initially measured SMRP levels in pleural fluids by ELISA. As shown in Figure 1A, SMRP was present at higher levels in pleural effusions from patients with MPM (median, 33.80 nM) than those from patients with ADCA metastasis (median, 3.40 nM) or BPE (median, 2.50 nM), with  $p < 0.001$  for all comparisons. Areas under ROC were  $0.902 \pm 0.032$  and  $0.912 \pm 0.035$  to differentiate MPM from ADCA and MPM from BPE, respectively (Table 2). Specificities and sensitivities obtained were 81.97% and 84.00% for a cutoff of 11.45 nM to differentiate MPM from ADCA, and 75.41% and 93.33% with a cutoff of 14.60 nM to differentiate MPM from BPE (Table 3).

In a previous study,<sup>17</sup> we identified SLPI as a potential marker for MPM. To evaluate the MPM diagnostic value of SLPI, we measured its level in our collection of pleural fluids using ELISA. SLPI concentrations were higher in pleural fluids from patients with MPM (median, 228.20 ng/ml) than those with ADCA (median, 101.50 ng/ml) or BPE (median, 91.10 ng/ml) (Fig. 1B). The areas under ROC curves were  $0.730 \pm 0.054$  and  $0.706 \pm 0.070$  to differentiate MPM from ADCA and BPE, respectively (Table 2). A specificity of 70.49% and a sensitivity of 80.00% were obtained to differentiate MPM

TABLE 1. Description of Groups and Demographic Characteristics of Recruited Patients

	BPE	MPM	ADCA
Description	15	49 epithelioid 4 mixed 4 sarcomatoid 4 unspecified	10 lung 9 others 6 unspecified
Age, y (mean $\pm$ SD)	68.0 $\pm$ 15.7	67.4 $\pm$ 18.1	67.4 $\pm$ 17.9
Male sex, (%)	86.6	83.6	32.0
Confirmed asbestos exposure (%)	26.6	44.2	16.0

BPE, benign pleural effusion; MPM, malignant pleural mesothelioma; ADCA, adenocarcinoma.



**FIGURE 1.** Measurements and diagnostic value of soluble mesothelin-related peptides (SMRP) and secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) in pleural fluids of patients. Pleural fluid SMRP (A) and SLPI (B) values in malignant pleural mesothelioma patients compared with adenocarcinoma and benign pleural effusion patients. Horizontal lines, median values. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

from ADCA or BPE, with cutoffs of 168.20 ng/ml and 163.60 ng/ml, respectively (Table 3).

A major limit for the use of SMRP in diagnosing MPM is the lack of sensitivity of this marker, and especially in the nondetection of the sarcomatoid histological subtype. To determine whether our new soluble markers could improve MPM diagnosis, we analyzed the expression of CCL2, galectin-3, and SLPI in each subtype of cancer (Fig. 2). Pleural fluid SMRP, CCL2, and galectin-3 levels differed among patients with mesothelioma (epithelioid [EM], sarcomatoid [SM], and mixed [MM] subtypes), ADCA (lung and other origins), and BPE ( $p < 0.0001$ ). The difference in SLPI levels among subgroups of patients was also found to be significant, but to a lesser extent ( $p = 0.0052$ ). SMRP levels were significantly higher in EM (median: 48.30 nM) than in ADCA (pulmonary ADCA median, 2.80 nM and other ADCA median, 3.40 nM) and BPE patients (median, 2.50 nM) (Fig. 2A). Whereas SMRP levels seemed to be higher in EM patients than in SM and MM subgroups, no statistically significant variation between these subgroups of MPM patients was observed. CCL2 levels were significantly higher in EM and, interestingly, in SM

**TABLE 2.** ROC Curve Data for Ability of SMRP and SLPI to Differentiate MPM from ADCA or BPE

Marker	AUC	95% Confidence Interval	SE	p
SMRP MPM vs. ADCA	0.902	0.8385–0.9655	0.03239	<0.0001
SMRP MPM vs. BPE	0.912	0.8433–0.9818	0.03533	<0.0001
SLPI MPM vs. ADCA	0.730	0.6250–0.8365	0.05395	0.0005
SLPI MPM vs. BPE	0.706	0.5670–0.8450	0.07090	0.013

ROC, receiver operating characteristic; SMRP, soluble mesothelin-related peptides; SLPI, secretory leukocyte peptidase inhibitor; BPE, benign pleural effusion; MPM, malignant pleural mesothelioma; ADCA, adenocarcinoma; AUC, area under the curve.

**TABLE 3.** Theoretical Best Cut-off Values to Differentiate MPM from ADCA or BPE

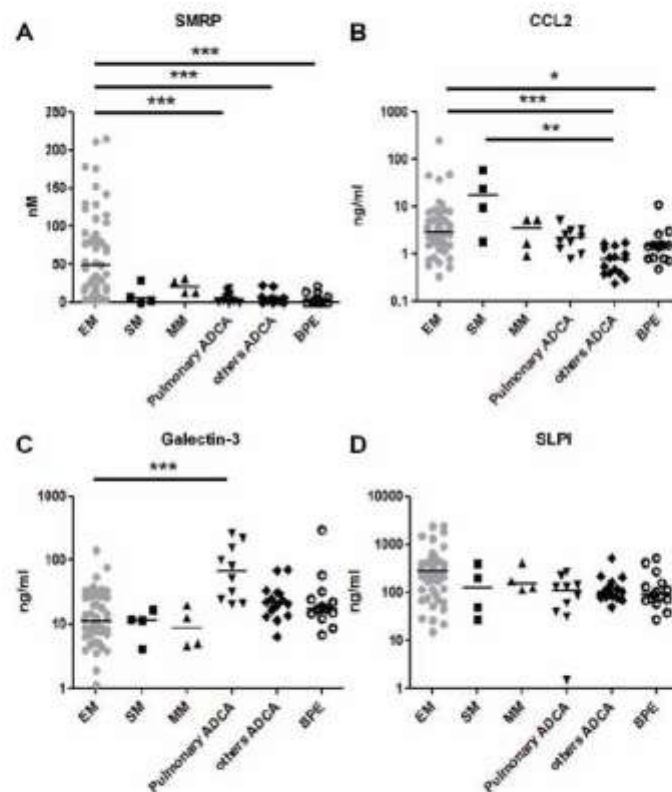
Marker	Cutoff	Specificity %	Sensitivity %
SMRP MPM vs. ADCA	11.45 nM	81.97	84.00
SMRP MPM vs. BPE	14.60 nM	75.41	93.33
SLPI MPM vs. ADCA	168.20 ng/ml	70.49	80.00
SLPI MPM vs. BPE	163.60 ng/ml	70.49	80.00

MPM, malignant pleural mesothelioma; ADCA, adenocarcinoma; BPE, benign pleural effusion; SMRP, soluble mesothelin-related peptides; SLPI, secretory leukocyte peptidase inhibitor.

patients (median, 2.82 ng/ml and 16.73 ng/l, respectively) than in other ADCA patients (median, 0.80 ng/ml). CCL2 levels were also higher in EM (median, 16.73 ng/ml) than BPE patients (median, 1.47 ng/ml) (Fig. 2B). By contrast, pulmonary ADCA patients presented significantly higher levels of galectin-3 (median, 67.33 ng/ml) in pleural fluids than did all subtypes of MPM (EM median, 11.10 ng/ml,  $p < 0.0001$ ; SM median, 11.65 ng/ml,  $p < 0.05$ ; and MM median, 8.79 ng/ml,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2C). No significant differences in the level of SLPI were observed among all patient subgroups (Fig. 2D).

### Measurement of Soluble Markers in Cell-Culture Supernatants

Over several years we have developed a collection of MPM and ADCA cell lines established from pleural fluids of patients. Using this collection, we performed a transcriptomic study to compare MPM and ADCA cell lines, allowing the identification of new soluble markers.<sup>17</sup> To confirm these results, we measured the expression of CCL2, galectin-3, SLPI, and SMRP in cell-culture supernatants by ELISA (Fig. 3). SMRP secretion was higher in MPM than in ADCA cell-culture supernatants (22.54 nM/10<sup>6</sup> cells/24 hours and 10.68 nM/10<sup>6</sup> cells/24 hours [median values], respectively) (Fig. 3A). Likewise, CCL2 levels were higher in the supernatants of MPM than in ADCA cell cultures (13.03 ng/ml/10<sup>6</sup> cells/24 hours and



**FIGURE 2.** Pleural fluid levels of SMRP, CCL2, galectin-3, and SLPI in the subgroups studied. Pleural fluid SMRP (A), CCL2 (B), galectin-3 (C), and SLPI (D) values in patients with epithelioid MPM (EM), sarcomatoid MPM (SM), mixed MPM (MM), pulmonary adenocarcinoma, other ADCA (ovarian, breast and unspecified) and BPE. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . SMRP, soluble mesothelin-related peptides; SLPI, secretory leukocyte peptidase inhibitor; MPM, malignant pleural mesothelioma; EM, epithelioid mesothelioma; SM, sarcomatoid mesothelioma; MM, mixed mesothelioma; ADCA, adenocarcinoma; BPE, benign pleural effusion.

2.41 ng/ml/ $10^6$  cells/24 hours (median values), respectively) (Fig. 3B). Conversely, ADCA cells secreted higher levels of galectin-3 than did MPM cells (4.20 ng/ml/ $10^6$  cells/24 hours and 1.87 ng/ml/ $10^6$  cells/24 hours [median values], respectively) (Fig. 3C). Finally, SLPI levels were higher in MPM than in ADCA cell-culture supernatants (1114 pg/ml/ $10^6$  cells/24 hours and 39.27 pg/ml/ $10^6$  cells/24 hours [median values], respectively) (Fig. 3D). However, because of the spread of the values and the number of ADCA cell lines analyzed, the results observed were not statistically significant using the Mann-Whitney test.

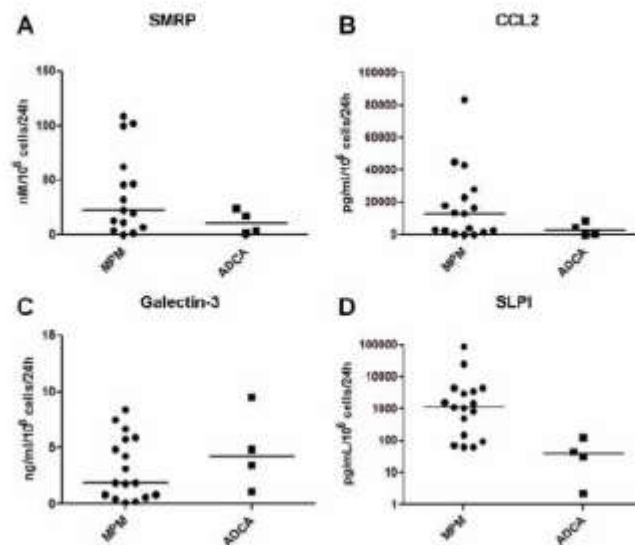
#### Diagnostic Value of SMRP, SLPI, CCL2, and Galectin-3, Alone or in Combination

Figure 4A shows that SMRP remains the best soluble marker to differentiate MPM from ADCA and BPE (area under the curve [AUC] =  $0.9059 \pm 0.0283$ ), as compared with CCL2 (AUC =  $0.7912 \pm 0.0454$ ),

galectin-3 (AUC =  $0.7584 \pm 0.0475$ ), and SLPI (AUC =  $0.7219 \pm 0.0516$ ) (Table 4). The specificity and sensitivity for SMRP to differentiate MPM from ADCA and BPE were 63.93% and 100.00%, respectively, for a cutoff of 24.05 nM (Table 5). Specificities and sensitivities were 80.33% and 72.50% with a cutoff of 1.61 ng/ml for CCL2, 67.21% and 82.50% with a cutoff of 14.60 ng/ml for LGALS3, and 70.49% and 80.00% with a cutoff of 168.20 ng/ml for SLPI (Table 5). Of interest, the SMRP/CCL2/galectin-3 marker combination reached an AUC of 0.968 (Fig. 4B) (Table 4).

#### DISCUSSION

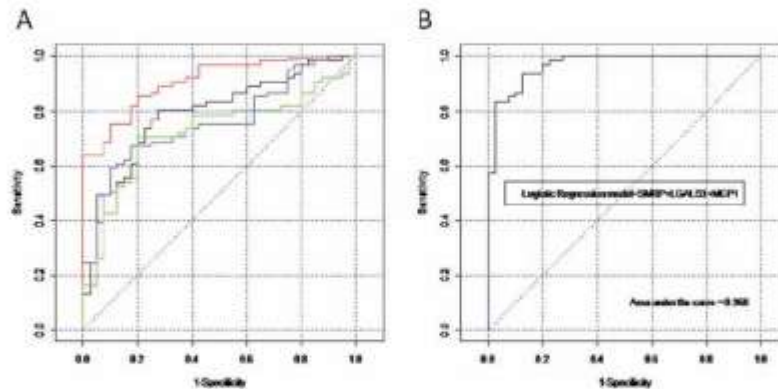
MPM is a highly aggressive tumor associated with long-term asbestos exposure. The main challenge for this disease is its early and specific diagnosis. Accurate identification of MPM should improve the medical care of patients. Soluble markers seem to be interesting tools for rapid MPM diagnosis and for monitoring treatment response. In a previous study,



**FIGURE 3.** Measurements of SMRP, CCL2, galectin-3, and SLPI in cell culture supernatants. Culture supernatant SMRP (A), CCL2 (B), galectin-3 (C), and SLPI (D) values in MPM cells compared with ADCA cells. Horizontal lines, median values. SMRP, soluble mesothelin-related peptides; SLPI, secretory leukocyte peptidase inhibitor; MPM, malignant pleural mesothelioma; ADCA, adenocarcinoma.

we performed a transcriptomic study to compare MPM and pulmonary ADCA cell lines established from pleural fluids of patients.<sup>17</sup> From this work, we identified CCL2 and galectin-3 as new soluble markers to differentiate MPM from ADCA or BPE. We also found that SLPI mRNA was overexpressed in MPM cells. In this study, using commercially available ELISA

assays we evaluated the levels of these biomarkers in pleural fluids collected over a 10-year period from patients with suspected MPM. As previously reported,<sup>12,13</sup> we found that in addition to SMRP, CCL2, galectin-3, and SLPI are good markers for differentiating MPM from ADCA and BPE in pleural fluids. Moreover, we have determined that an analytic



**FIGURE 4.** Diagnostic values of SMRP, SLPI, CCL2, and galectin-3, alone or in combination. (A) ROC curve for SMRP (red), SLPI (green), CCL2 (black) or galectin-3 (blue) to distinguish between patients with MPM and patients with ADCA or BPE. (B) ROC curve for the combination SMRP, CCL2, and galectin-3 to distinguish between patients with MPM and patients with ADCA or BPE. SMRP, soluble mesothelin-related peptides; SLPI, secretory leukocyte peptidase inhibitor; ROC, receiver operating characteristic; MPM, malignant pleural mesothelioma; ADCA, adenocarcinoma; BPE, benign pleural effusion.

**TABLE 4.** ROC Curve Data for Ability of Biomarkers to Differentiate MPM from ADCA and BPE

Marker	AUC	95% confidence interval	SE	P
SMRP	0.9059	0.8503–0.9616	0.02838	<0.0001
CCL2	0.7912	0.7020–0.8803	0.04547	<0.0001
LGALS3	0.7584	0.6652–0.8516	0.04752	<0.0001
SLPI	0.7219	0.6207–0.8231	0.05161	<0.001
SMRP/CCL2 and LGALS3	0.9680	0.9120–0.9930	0.0168	<0.0001

ROC, receiver operating characteristic; MPM, malignant pleural mesothelioma; ADCA, adenocarcinoma; BPE, benign pleural effusion; SMRP, soluble mesothelin-related peptide; LGALS3, galectin-3; SLPI, secretory leukocyte peptidase inhibitor.

**TABLE 5.** Best Cut-Off Values to Differentiate MPM from ADCA and BPE

Marker	Cut-off	Specificity %	Sensitivity %
SMRP	24.05 nM	63.93	100.00
CCL2	1.61 ng/ml	80.33	72.50
LGALS3	14.60 ng/ml	67.21	82.50
SLPI	168.20 ng/ml	70.49	80.00

MPM, malignant pleural mesothelioma; ADCA, adenocarcinoma; BPE, benign pleural effusion; SMRP, soluble mesothelin-related peptide; LGALS3, galectin-3; SLPI, secretory leukocyte peptidase inhibitor.

combination of SMRP, CCL2, and galectin-3 improves the differential diagnosis of MPM up to an AUC of 0.968, whereas SMRP alone is, in our use, 0.9059. This value is slightly higher than those reported by others, but in the same range.<sup>12,13,18,19</sup>

As previously observed, SMRP levels were higher in pleural fluids from patients with EM than in those from patients with SM or MM, ADCA or BPE.<sup>12</sup> The nondetection of SM by SMRP represented the main limitation of this marker.<sup>12</sup> Several attempts were made to improve MPM diagnosis by combining SMRP with biomarkers used for the diagnosis of other cancers, such as cytokeratin fragment, carcinoembryonic antigen, carbohydrate antigen 15-3, carbohydrate 125, and osteopontin. However, all of these combinations showed poor, or no, benefit compared with the biomarker alone.<sup>20</sup> We showed previously that chemokine CCL2 levels were higher in patients with MPM, whatever the subtype. However, when we performed a more detailed evaluation of the ADCA group, we found that the ability of CCL2 to discriminate MPM from pulmonary ADCA was not as good as expected. This suggested that a combination of SMRP and CCL2 allows the detection of MPM, including SM. However, this combination does not clearly distinguish MPM from pulmonary ADCA, which is unsatisfying for the diagnosis of MPM. Thus, the high levels of galectin-3 measured in the pleural fluids of pulmonary ADCA patients as compared with those of MPM and its subgroups justified its association with SMRP and CCL2. SLPI is an alarm antiprotease overexpressed in ovarian-cancer cells and associated with the promotion of malignancy.<sup>21,22</sup> Pleural fluid levels of SLPI were mainly elevated in epithelioid MPM patients, whereas SLPI levels were elevated in the other MPM

subtypes, and the ADCA and BPE groups were similar, as observed for SMRP.

The results obtained from the experiments conducted with pleural liquids were reinforced by the analysis of culture supernatants from MPM and ADCA cell lines established from pleural fluids.<sup>17</sup> MPM cell lines produced higher levels of SMRP, CCL2, and SLPI than did ADCA cell lines. Conversely, ADCA cell lines produced higher levels of galectin-3 than did MPM cell lines. These data were in parallel with biomarker determinations in pleural fluids and confirmed their specificities.

The complementarities of these biomarkers were studied using multiple logistic regressions that showed CCL2 ( $p = 0.002$ ), LGALS3 ( $p = 0.035$ ), and SMRP ( $p = 0.001$ ) as statistically significant biomarkers, whereas SLPI was not significant ( $p = 0.28$ ) when adjusted with the other biomarkers, demonstrating its correlation with the other biomarkers. Moreover, ROC curve analysis using the combination SMRP/galectin-3/CCL2 (AUC = 0.968) showed an interesting improvement in MPM diagnosis as compared with SMRP alone (AUC = 0.9059). Using the SMRP/CCL2/galectin-3 combination to classify the pleural fluids, according to their best cutoff values, only seven of 106 samples were misclassified (one false positive and six false negatives). In all cases of false negatives, the reason for the misclassification of the sample was a high galectin-3 level. In two cases, the diagnoses were ambiguous and for two others, atypical cells were observed in the pleural fluid cytological examination. The false-positive sample was from a patient with rheumatoid polyarthritis presenting a bilateral pleurisy characterized by low levels of SMRP and galectin-3, and a high level of CCL2, probably resulting from his pathology.<sup>23</sup> Despite the existence of limits represented by these seven samples, the SMRP/CCL2/galectin-3 combination could clearly improve the diagnosis of MPM on the basis of the determination of their levels in pleural fluids. This combination should now be evaluated in multicenter studies to validate its potential utility for MPM diagnosis.

The determination of these new biomarkers in serum samples also represents an interesting option that avoids recourse to an invasive procedure, such as thoracoscopy. SMRP measurements in serum samples have previously been performed and shown diagnostic performance similar to those in pleural fluids.<sup>12,13,24</sup> Thus, at the least, CCL2 and galectin-3 determinations should be carried out on serum samples to evaluate their diagnostic value. As for SMRP, the correlation of CCL2 and galectin-3 levels in pleural fluids and in blood samples should be studied to determine whether these data are correlated or complementary.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by INSERM and grants from la Ligue Interrégionale Contre le Cancer (Comités Départementaux du Grand Ouest: CD85, CD49, CD72, CD56 and CD79), la Fondation de l'Avenir, la Fondation pour la Recherche Médicale, l'Association ARSMeso44 and la Région Pays de la Loire (Cancéropôle Grand Ouest).

## REFERENCES

- Peto J, Decarli A, La Vecchia C, Levi F, Negri E. The European mesothelioma epidemic. *Br J Cancer* 1999;79:666-672.
- Musk AW de Klerk NH. Epidemiology of malignant mesothelioma in Australia. *Lung Cancer* 2004;45 Suppl 1:S21-S23.
- Scherpereel A, Astoul P, Bana E, et al.; European Respiratory Society/ European Society of Thoracic Surgeons Task Force. Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J* 2010;35:479-495.
- Allen TC. Recognition of histopathologic patterns of diffuse malignant mesothelioma in differential diagnosis of pleural biopsies. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129:1415-1420.
- Miettinen OS, Yankelovitz DE, Henschke CI. Evaluation of screening for a cancer: annotated catechism of the Gold Standard creed. *J Eval Clin Pract* 2003;9:145-150.
- Ordóñez NG. Immunohistochemical diagnosis of epithelioid mesothelioma: an update. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129:1407-1414.
- Husain AN, Colby TV, Ordóñez NG, et al. Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: a consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:1317-1331.
- Giudicci A, Cosio S, Carpi A, Nicolini A, Genazzani AR. Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer. *Biomol Pharmacother* 2004;58:24-38.
- Duffy MJ, van Dalen A, Haghand C, et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* 2003;39:718-727.
- Pass HI, Lott D, Leonardo F, et al. Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels. *N Engl J Med* 2005;353:1564-1573.
- Robinson BW, Creaney J, Lake R, et al. Soluble mesothelin-related protein—a blood test for mesothelioma. *Lung Cancer* 2005;49 Suppl 1:S109-S111.
- Scherpereel A, Grigoriu B, Conti M, et al. Soluble mesothelin-related peptides in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1155-1160.
- Pass HI, Wali A, Tang N, et al. Soluble mesothelin-related peptide level elevation in mesothelioma serum and pleural effusions. *Ann Thorac Surg* 2008;85:265-72; discussion 272.
- Creaney J, Robinson BW. Serum and pleural fluid biomarkers for mesothelioma. *Curr Opin Pulm Med* 2009;15:366-370.
- Creaney J, Francis RJ, Dick IM, et al. Serum soluble mesothelin concentrations in malignant pleural mesothelioma: relationship to tumor volume, clinical stage and changes in tumor burden. *Clin Cancer Res* 2011;17:1181-1189.
- Sapede C, Gauvrit A, Barboux I, et al. Aberrant splicing and protease involvement in mesothelin release from epithelioid mesothelioma cells. *Cancer Sci* 2008;99:590-594.
- Gueugnon F, Leclercq S, Blanquart C, et al. Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Pathol* 2011;178:1033-1042.
- Creaney J, Younan D, Naumoff LK, et al. Soluble mesothelin in effusions: a useful tool for the diagnosis of malignant mesothelioma. *Thorax* 2007;62:569-576.
- Davies HE, Sadler RS, Bielan S, et al. Clinical impact and reliability of pleural fluid mesothelin in undiagnosed pleural effusions. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:437-444.
- Tomasetti M, Santarelli L. Biomarkers for early detection of malignant mesothelioma: diagnostic and therapeutic application. *Cancers* 2010;2:523-548.
- Devoogdt N, Hassanzadeh Ghassabeh G, Zhang J, Brys L, De Baetselier P, Revets H. Secretory leukocyte protease inhibitor promotes the tumorigenic and metastatic potential of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5778-5782.
- Devoogdt N, Rasool N, Hoskins E, Simpkins F, Tchabo N, Kohn EC. Overexpression of protease inhibitor-dead secretory leukocyte protease inhibitor causes more aggressive ovarian cancer in vitro and in vivo. *Cancer Sci* 2009;100:434-440.
- Stankovic A, Stavic V, Stamenkovic B, Kamenov B, Bojanovic M, Mitrovic DR. Serum and synovial fluid concentrations of CCL2 (MCP-1) chemokine in patients suffering rheumatoid arthritis and osteoarthritis reflect disease activity. *Braz J Lek Lisy* 2009;110:641-646.
- Creaney J, Robinson BW. Detection of malignant mesothelioma in asbestos-exposed individuals: the potential role of soluble mesothelin-related protein. *Hematol Oncol Clin North Am* 2005;19:1025-40, v.

## **Annexe 2: MUC1-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer therapy: induction and challenge**

**MUC1-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer therapy: induction and challenge.** D. Roulois, M. Grégoire, and J.F. Fonteneau. BioMed Research International, 2013

### RESUME

La protéine MUC1 est souvent retrouvée surexprimée et hypoglycosylée dans un grand nombre de tumeurs. Depuis la découverte de cette protéine, MUC1 est devenue une cible attractive pour le développement de stratégies immuno-thérapeutiques anticancéreuses. En effet, des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré la présence de réponses T spécifiques dirigées contre MUC1. Des réponses indépendantes du contexte HLA ont dans un premier temps été décrites, avant d'observer des réponses lymphocytaires T dépendantes du HLA. Des études utilisant des modèles murins ont également pu mettre en évidence l'établissement de réponses tolérogéniques vis-à-vis de MUC1. L'ensemble de ces observations a donc permis de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant MUC1 et ayant la capacité d'induire des réponses T CD8+ spécifiques dirigées contre MUC1. Parmi ces nouvelles stratégies, certaines sont déjà développées dans des essais cliniques de phase I à III. A ce jour, des résultats encourageants ont été observés dans les études cliniques de phase III. Cette revue, fait donc un recensement des connaissances sur la protéine MUC1 en tant qu'antigène de tumeur, décrivant les résultats actuels des essais cliniques ciblant cette protéine, mais aussi les nouvelles stratégies actuellement en cours de développement dans les laboratoires.

Hindawi Publishing Corporation  
 BioMed Research International  
 Volume 2013, Article ID 871936, 10 pages  
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/871936>

## Review Article

# MUC1-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Cancer Therapy: Induction and Challenge

David Roulois,<sup>1,2,3</sup> Marc Grégoire,<sup>1,2,3</sup> and Jean-François Fonteneau<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>UMR892, INSERM, Institut de Recherche Thérapeutique, Université de Nantes, 8 quai Moncoussu, BP70721, 44007 Nantes Cedex 1, France

<sup>2</sup>CNRS, UMR6299, Institut de Recherche Thérapeutique, Université de Nantes, 8 quai Moncoussu, BP70721, 44007 Nantes Cedex 1, France

<sup>3</sup>Faculté de Médecine, Université de Nantes, 44035 Nantes Cedex 1, France

Correspondence should be addressed to Jean-François Fonteneau; jean-francois.fonteneau@inserm.fr

Received 18 May 2012; Accepted 6 July 2012

Academic Editor: Julie Curtsinger

Copyright © 2013 David Roulois et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

MUC1 glycoprotein is often found overexpressed and hypoglycosylated in tumor cells from numerous cancer types. Since its discovery MUC1 has been an attractive target for antitumor immunotherapy. Indeed, *in vitro* and *in vivo* experiments have shown T-cell-specific responses against MUC1 in an HLA-restricted and HLA-unrestricted manner, although some animal models have highlighted the possible development of tolerogenic responses against this antigen. These observations permit the development of new T-cell vaccine strategies capable of inducing an MUC1-specific cytotoxic T cell response in cancer patients. Some of these strategies are now being tested in clinical trials against different types of cancer. To date, encouraging clinical responses have been observed with some MUC1 vaccines in phase II/III clinical trials. This paper compiles knowledge regarding MUC1 as a promising tumor antigen for antitumor therapeutic vaccines applicable to numerous cancers. We also summarize the results of MUC1-vaccine-based clinical trials.

## 1. Introduction

With the increasing number of cancers, the development of innovative cancer therapies is a great challenge. One of these innovative strategies is immunotherapy. Since the discovery that the immune system can control cancer progression, which has been conceptualized in the “three Es” theory [1] for “elimination, equilibrium, and escape,” supporting the implications of the immune system in the control and selection of tumor cells, scientists and clinicians have tried to exploit this phenomenon to induce an antitumor immune response in cancer patients. Major goals in the field of immunotherapy are to understand how the immune system can be specifically activated against cancer cells and to identify relevant antigenic cancer targets.

The first human tumor-associated antigen (TAA) to be discovered, recognized by cytotoxic CD8+ T lymphocytes (CTL), was MAGE-A1 which was identified from tumor-infiltrating lymphocytes obtained after culture of a melanoma

biopsy [2]. Since then, many other TAAs have been identified (for review see [3]). Certain TAAs are restricted to one or a few cancer types, such as the “mutated TAA” (BCR-ABL fusion, B-raf, k-ras, N-ras, p53, etc.), or the “differentiation TAA” (Melan-A/MART1, gp100, CEA, PSA, etc.), whereas others are shared between a wide range of cancers, such as the “shared tumor-specific TAA” (MAGE, NYESO-1, SSX, etc.) or the “overexpressed TAA” (HER-2/Neu, p53, Telomerase, MUC1, etc.) (<http://www.archive.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>).

Mucin 1 (MUC1) belongs to the “overexpressed TAA” category, even if this overexpression is not the only hallmark of MUC1 in tumor cells, since it is often accompanied by modification of MUC1 glycosylation status. In healthy cells, MUC1 is a glycoprotein expressed at the apical surface of epithelial cells and characterized by a high glycosylation level. In cancers, this glycoprotein is often overexpressed by tumor cells, with a loss of polarity and, interestingly, a modification of its glycosylation pattern [4]. Both the



overexpression and the modification of its glycosylation status make this protein highly immunogenic and, thus, an interesting target in cancer immunotherapy. In this paper, we focus on the immunogenic properties of the MUC1 glycoprotein. However, it should be noted that MUC1 has also been described as having an oncogenic role (for review see: [5, 6]). Firstly, we describe the differences between MUC1 expression in healthy cells and tumor cells which renders MUC1 more immunogenic when it is expressed by tumor cells. Secondly, we discuss the problem of induction of tolerance against MUC1 which can impair the antitumor immune response. We list the immunotherapy strategies for inducing an antitumor response in patients, which are being developed *in vitro* and in mouse models. Finally, we discuss MUC1-based immunotherapy clinical trials against cancers.

## 2. MUC1: An Overexpressed, Hypoglycosylated, Tumor-Associated Antigen

The *MUC1* gene was cloned in the early 1990s [7, 8]. It belongs to the mucin family, comprising 21 members. *MUC1* encodes a highly glycosylated, type I transmembrane glycoprotein, with a variable number of 20-amino-acid repeat sequences referred to as “variable number tandem repeat” (VNTR) (Figure 1). The number of VNTR is variable from one allele to another, varying from 25 to 120 VNTR per MUC1 molecule, with the alleles containing 40 and 66 VNTR being the most frequent in the northern European population [7]. Each VNTR contains five potential sites of O-glycosylation on serine or threonine.

Towards the end of the 1980s, differences between the MUC1 expressed by healthy mammary cells and by breast cancer cells were observed using the monoclonal antibody, SM-3, specific for the MUC1 core protein stripped of sugars [9, 10]. Indeed, SM-3 mAb used in histology recognized 91% of breast cancer samples, but showed little or no reactivity with healthy mammary cells [9]. The SM-3 mAb was also reactive against lung, colon, and ovarian carcinoma, but failed to stain the healthy cell counterparts [10]. These studies showed that, in different types of carcinoma, MUC1 is hypoglycosylated. This hypoglycosylation allows recognition by the SM-3 mAb. Since then, MUC1 was considered to be a “tumor-associated antigen” which can be targeted in immunotherapy using monoclonal antibodies. It has subsequently been shown that the glycosylation structures of MUC1 expressed by normal breast cells and tumor cells are different. Indeed, in healthy cells MUC1 contains extended, core 2-based glycans that are formed by N-acetylglucosamine attachment to the GalNAc of core 1, while on the MUC1 expressed by tumor cells the glycans are shorter, core 1-based and richer in ST, Tn, and T glycans [11–13].

These differences observed between MUC1 expressed by tumor cells and healthy cells prompted research on the capacity of T lymphocytes to recognize tumoral MUC1

epitopes. T lymphocytes usually recognize, with their T-cell receptors, peptides from endogenous or exogenous antigens presented in association with MHC molecules. Surprisingly, the first report of recognition of MUC1 by T lymphocytes was shown to be non-MHC-restricted [14]. Indeed the T lymphocytes obtained from a pancreatic cancer patient did not recognize an MUC1 peptide presented by an MHC molecule, but rather, directly, the hypoglycosylated core of MUC1. This unusual antigen recognition was confirmed by other groups [15–18]. The reactivity of these T cells was inhibited by SM-3 mAb, which showed that these T cells recognize the hypoglycosylated core of MUC1. Furthermore, these T cells failed to recognize healthy epithelial cells, which were not stained by the SM-3 mAb. Finally, Hinoda and colleagues described an increased recognition of gastric tumor cells cultured with benzyl-2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranoside (BGN), a competitive inhibitor of O-glycosylation, by an HLA-unrestricted, MUC1-specific CTL line [19]. All of these results suggest that a non-MHC-restricted, hypoglycosylated, MUC1-specific T-cell response can be present spontaneously in cancer patients.

In the mid 1990s, efforts were made to identify HLA-restricted, MUC1-specific T-cell responses. Indeed, progress made in the understanding of the T-lymphocyte response against tumor cells allowed the development of new strategies to identify TAA, such as “reverse immunology”. This consists of inducing *in vitro* T-lymphocyte responses against peptides from a candidate TAA. Peptides are selected for their capacity to bind a particular HLA allele. The capacity of peptide-responding T cells to recognize a tumor cell line which expresses the candidate TAA and the particular HLA allele is then tested to validate the epitope. Using this approach, Domenech and colleagues identified a peptide encoded by the VNTR (STAPPAHGTV) with the ability to bind to several HLA class I alleles: HLA-A1, -A2.1, -A3, and -A11 [20]. They were able to generate cytotoxic CD8+ T lymphocytes specific for HLA-A11/STAPPAHGTV, but did not validate the presentation of this peptide by HLA-A11+ tumor cells. Using HLA-A\*0201/Kb transgenic mice, Apostolopoulos and colleagues identified two peptides from the VNTR able to bind HLA-A\*0201 molecule, which are the most common HLA class I allele in the Caucasian population: the peptide, STAPPAHGTV, previously described by Domenech’s team, and a new peptide, APDTRPA [21]. These peptides were able to induce CD8+ cytotoxic T-cell responses in HLA-A\*0201/Kb mice. The T cells were able to lyse the HLA-A\*0201+ MUC1+ breast cancer cell line, MCF-7. Brossart and colleagues then selected two other peptides from MUC1: MUC1(20–28) LLLLTVLTV and MUC1(950–958) STAPPVHNV, which exhibit a good affinity for the HLA-A\*0201 molecule [22]. The STAPPVHNV peptide is not encoded by the VNTR, but by the region flanking it, whereas the LLLLTVLTV peptide is encoded by the signal sequence of MUC1. Brossart and colleagues generated two CD8+ T-cell clones specific for the HLA-A\*0201/MUC1(20–28) and HLA-A\*0201/MUC1(950–958) complexes. These clones were able to recognize MUC1+ HLA-A\*0201+ tumor cell lines from different types of

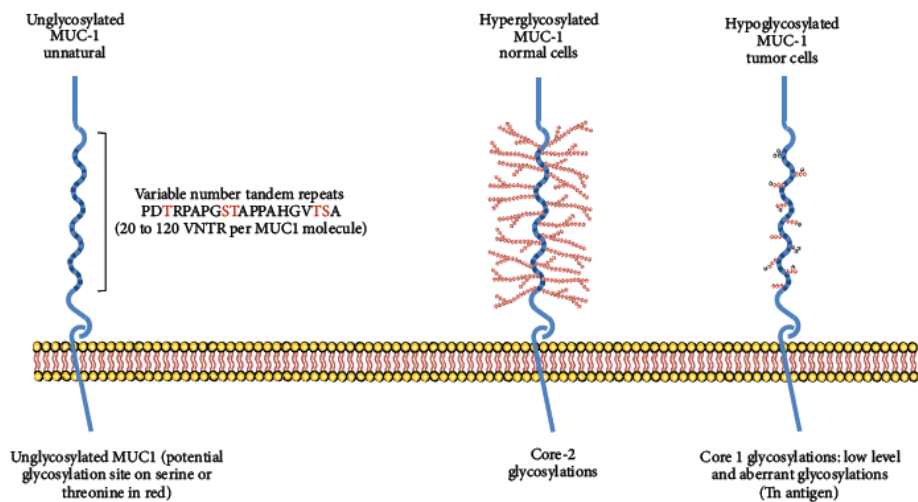


FIGURE 1: Structure of the MUC1 glycoprotein in normal and tumor cells.

cancer: breast, pancreatic, and renal. In another study, the same researchers showed that these MUC1-specific T-cell clones were also able to recognize multiple myeloma cells and primary acute myelogenous leukemia blasts [23]. More recently, we showed that MUC1(950-958) peptide is presented to MUC1-specific CD8<sup>+</sup> T cells by HLA-A\*0201+malignant pleural mesothelioma cell lines [24]. In addition, Ninkovic and colleagues reported that some glycosylated peptides from the VNTR of MUC1, notably the decamer SAP10 [SAPDT(GalNAc)RPAPG], can be generated by the immunoproteasome of dendritic cells [25]. This glycosylated peptide can be presented by HLA class I molecules and recognized by CD8<sup>+</sup> T cells. The nonglycosylated peptide was also recognized by CD8<sup>+</sup> T cells, whereas a peptide with a longer sugar chain (Gal-GalNAc) did not bind the HLA-A\*0201 molecule. Finally, MUC1 can also be recognized by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. However, in this case, only one HLA-DR3-restricted epitope encoded by the VNTR has been identified by "reverse immunology" [26]. Unfortunately, the capacity for presentation by tumor cells was not tested since they do not express HLA class II molecules.

Regarding the recognition of MUC1 peptides by HLA-restricted T lymphocytes, the importance of the MUC1 glycosylation status is not as clear as in the case of HLA-unrestricted recognition of MUC1. We showed recently that the MUC1 glycosylation level does not affect the recognition of mesothelioma tumor cells by an HLA-A\*0201/MUC1(950-958)-specific CD8<sup>+</sup> T-cell clone [24]. Indeed, we observed that some tumor cell lines recognized by the CD8<sup>+</sup> T-cell clone were weakly stained with the SM-3 antibody and another mAb specific for hypoglycosylated MUC1, VU-3-C6. Furthermore, MPM

cell lines treated with benzyl-2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranoside (BGN), a competitive inhibitor of O-glycosylation, were not better recognized by the T-cell clone, despite an increased staining with the SM-3 and VU-3-C6 mAb. However, other HLA-restricted MUC1 epitopes seem to be dependent on the hypoglycosylation status of MUC1, at least for the induction of the MUC1-specific T-cell response by antigen-presenting cells such as dendritic cells (DC). Indeed, Hiltbold and Colleagues reported that glycosylation of long peptides, consisting of five MUC1 tandem-repeat regions, decreased the processing and the HLA-A1 restricted cross-presentation to CD8<sup>+</sup> T cells by DC of a nine-amino-acid peptide contained in this long peptide [27]. Furthermore, the modification of MUC1 glycosylation in cancer cells may increase the capacity of DC to acquire this antigen for cross-presentation. Indeed, in cancer, soluble MUC1 presents an aberrant pattern of glycosylation, notably the Tn antigen, which can be recognized and internalized by the C-type lectin receptor macrophage galactose-type lectin (CLR MGL) present on DC and macrophages [28, 29]. This internalization of the soluble form of this tumoral form of MUC1 antigen by DC has also been shown to be mediated by the mannose receptor [30]. However, the retention of internalized MUC1 in the early endosome by this receptor inhibits its presentation to CD4<sup>+</sup> T cells, whereas the nonglycosylated form of the antigen is well presented. Conversely, Vlad and colleagues reported that DC exposed to a long-glycosylated MUC1 peptide were able to process and present a glycosylated shorter peptide, in association with class II HLA, to CD4<sup>+</sup> T cells suggesting that glycosylated MUC1 peptide can be processed by dendritic cells. [28]. In addition, it has been shown that the glycosylation status

influences, but does not inhibit, the cleavage of MUC1 by the immunoproteasome expressed by mature DC [31]. All of these studies underline the capacity of dendritic cells (DC) to distinguish normal from aberrant MUC1. This shows the importance of MUC1 glycosylation, which affects differently the presentation of abnormal MUC1 in MHC class I and II molecules according to the MUC1 epitope studied.

### 3. Human MUC1 Mouse Model and Tolerance

With the goal of studying the immunogenicity of MUC1 *in vivo* and of developing MUC1-based cancer immunotherapy, human MUC1 transgenic mouse (TG mice) tumor models were set up by the group of Papadimitriou [32]. These authors reported that the expression of human MUC1 in TG mice was closely similar to that observed in human tissue. Since then, different teams have used these TG mice to study tolerance against MUC1 and how to induce *in vivo* an MUC1 tumor-specific T-cell response [33–35]. Rowse and colleagues compared tumor growth of MUC1+ tumors in TG or Wt mice [35]. They also compared the induction of an MUC1-specific humoral response after immunization with MUC1 peptide. MUC1+ tumors grew in TG mice, whereas they were rejected in Wt mice, suggesting that a tolerance to MUC1 is present in TG mice. MUC1 immunization of Wt mice also allowed a switch of immunoglobulin to the IgG subtype, whilst this switch was not observed in TG mice. Two other studies have also demonstrated the establishment of tolerance against MUC1 in TG mice [36, 37]. In a first study, the authors showed that a CD4+ T-cell response against MUC1 occurred in Wt mice following challenge with MUC1-expressing B16 tumor cells, whereas this response was absent in TG mice [37]. When CD4+ T cells were transferred from B16-bearing Wt mice to B16-bearing TG mice, an increase in survival was observed. Furthermore, Wt mice challenged with MUC1-expressing B16 tumors mounted an IgG response against MUC1, whereas this IgG response was absent in TG mice [36]. Human MUC1 TG mice have since been crossed with conditional-endometriosis transgenic mice, showing the presence of regulatory Foxp3+ T cells and antibodies against MUC1 during endometriosis, with potential implications for cancer progression [38]. All of these studies, thus, show that a certain degree of MUC1 tolerance is established *in vivo*. MUC1-based immunotherapy strategies should take into account this phenomenon.

Indeed, these *in vivo* studies highlight the potential problem of MUC1 tolerance in humans. MUC1 is naturally expressed, and tolerogenic responses can occur in patients leading to tumor escape against the immune system. The MUC1 TG mouse tumor model seems to back up the idea of tolerance against MUC1 in humans, but the modifications of MUC1 glycosylation observed in human cancer cells were not taken into account in these studies. *In vivo* investigations using vaccination against MUC1 with glycosylated or nonglycosylated peptide suggest that tolerance is not established against epitopes of MUC1 carrying a tumor-specific pattern of glycosylation, such as the Tn antigen [39–41]. Thus, abnormal glycosylation patterns can be recognized as foreign

rather than selfantigen, which seems to be important in the induction of a specific T-cell response [39, 40]. MUC1 can, thus, be considered as an “abnormal selfantigen” when its glycosylation status is modified in tumor cells and this is an interesting property that could be exploited in immunotherapy [42].

### 4. Strategy to Induce MUC1-Specific T-Cell Responses

Different approaches have been developed to induce MUC1-specific T-cell responses in cancer patients. The majority of these are based on the capacity of DC to activate specific T-cell immune responses [53]. We have summarized these approaches in Table 1 and focus on the two most-studied strategies: MUC1-encoding nucleic acids or peptidic vaccination.

One approach consists of the utilization of MUC1 DNA as a vaccine [50, 52, 54]. This strategy has the advantage of activating different populations of lymphocytes, contrary to the use of MHC class I or class II peptides. In these studies, injections of MUC1 cDNA vaccine to tumor-bearing mice were able to induce tumor regressions. However, in two studies, the effector T cells were identified as CD8+ cytotoxic T cells [52, 54], whereas in the last one, the antitumor response was attributed to CD4+ T cells [50]. Studies are now being performed to improve this approach, notably by adding to the MUC1 cDNA a maturation signal for DC. Indeed, one approach consists of coupling MUC1 DNA with DNA corresponding to the expression of a heat shock protein (HSP70) which has already been reported to improve the stimulatory properties of DC [55]. In this study, MUC1/HSP70-coupled DNA increased the capacity of DC to induce effective cytotoxic T-cell responses and inhibited tumor cell growth [45]. Another strategy which has been developed to improve MUC1 cDNA vaccination consists of combining the vaccine with a tumor-cell-death inducer, such as a cDNA interfering with the expression of ANT2, a protein implicated in carcinogenesis [51]. CD8+ T-cell responses were more effective using this combination than with the use of MUC1 cDNA alone. To target MUC1 cDNA expression only to DC, *in vitro* transfection of human DC with MUC1 mRNA has also been developed [46]. These MUC1-mRNA-transfected DC were able to induce MUC1-specific CD8+ T lymphocytes that can kill pancreatic cancer cells. Finally, to improve the MUC1 cDNA strategies, another interesting study suggested the use of a modified MUC1 sequence, in order to prevent normal glycosylation of the MUC1 protein in dendritic and cancer cells [47].

Another vaccination strategy which has been studied preclinically, in mice, consists of the use of MUC1 peptide or glycopeptides. For this strategy, the use of glycopeptides with tumor-specific sugar motifs, such as the Tn antigen, seems to be more efficient than the use of normal peptides in eliciting an effective immune response [39, 40]. The MUC1 peptide can also be modified to increase its penetration into antigen-presenting cells, for example, the MUC1-MPA(11)P peptide which improved the induction of tumor regression in

TABLE 1: Strategies for the induction of anti-MUC1 T cell responses that are being studied *in vitro* and *in vivo*.

Author	Strategy	Cancer Model	Effect
Deguchi et al. [43]	$\alpha$ -gal epitope to increase immunogenicity of MUC1	Pancreatic cancer mouse model	Antibody induction, mouse tumor regression, induction of T cell responses
Kovjazin et al. [44]	ImMucin peptide 21mer	Mouse/PBMC of patients	CD4+ and CD8+ T lymphocyte responses <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>
Choi et al. [45]	DNA vaccine (MUC1/HSP70)	B16 mice	cytotoxic T cell response induction/ tumor growth inhibition
Chen et al. [46]	MUC1 mRNA, dendritic cell transfection	Pancreatic cancer	MUC1 mRNA-transfected dendritic cells can induce MUC1-specific CD8+ T cell responses
Wright et al. [47]	MUC1 peptide with substitution of O-glycosylation site	Human adenocarcinoma	O-glycosylation site substitution improves immunogenicity
Kobukai et al. [48]	MPA11P vehicle of a 30mer MUC1 peptide	Mouse	Reduction of tumor size, lymphocyte infiltration
Lakshmiarayanan et al. [49]	Tripartite MUC1 vaccine (TLR2, Thelper, MUC1 glycopeptides)	Mouse model of mammary cancer	IgG antibodies, cytotoxic T lymphocytes, activation of innate immune response
Sugiyura et al. [50]	MUC1 DNA vaccine	Mouse/colon	Induction of CD4+ T cell responses, not CD8+ T cell responses against glycosylated peptides, but not unglycosylated peptides
Ryan et al. [39, 40]	TN MUC1 glycopeptide	Mouse	Combination enhanced effects of DNA vaccination, MUC1 CD8+ T cell responses
Choi et al. [51]	MUC1 DNA vaccination, enhanced by mANT2 shRNA	Mouse melanoma	Combination enhanced effects of DNA vaccination, MUC1 CD8+ T cell responses
Jeon et al. [52]	DNA vaccination	Mouse	Tumor growth inhibition, CD8+ IFN- $\gamma$ increased

an animal model [48]. Targeting of MUC1 peptide to antigen-presenting cells can also be improved by adding oxidized (T-cell response, weak antibody level) or reduced mannan (T cell response, high antibody level) [41]. Another interesting approach was recently developed using a plant model which can produce MUC1 glycopeptides that are able to break tolerance in MUC1 Tg mice vaccinated with this peptide by the production of MUC1-specific antibodies [56]. Some long MUC1 peptides containing MHC class I and class II epitopes (21 mer) have also been developed to induce CD8+ and CD4+ T-cell responses [44]. CD8+ T-cell responses obtained in mice with the long peptide seem to be stronger than with an MUC1 9mer peptide. Peptidic MUC1 vaccines have also been combined with other reagents to improve their efficiency. For example, MUC1 glycopeptides have been covalently associated with T-helper peptide and TLR2 agonist in a multimodal vaccine [49]. This vaccine strategy was reported to induce a high level of MUC1-specific antibodies and MUC1-specific cytotoxic T lymphocytes, which showed superior capability to prevent tumors growth in mice than unglycosylated peptides.

### 5. MUC1-Based Immunotherapy: Clinical Studies

Some of these preclinical strategies are now being assessed for MUC1-based immunotherapy in clinical trials for different types of cancers. More than sixty clinical trials interested in MUC1 protein are currently in progress (<http://www.clinicaltrials.gov/>). The majority of these are developing vaccination strategies against MUC1 to treat

cancer. This large number of trials highlights the clinical interest in MUC1 vaccination. Only three clinical studies have reached the phase IIB/III stage. We have summarized in Table 2 the strategies which are currently being developed in these clinical trials. Some of these studies have shown a possible clinical effect of this vaccine in inducing an MUC1-specific T-cell response. Among them, some major strategies have emerged and reached phase III.

The BLP25 liposome vaccine (stimuvax or L-BLP25) is a liposomal vaccine containing a 25-amino-acid MUC1 peptide corresponding to the core peptide of MUC1 (STAP-PAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP) and coupled with a palmitoyl lysine residue at the C terminus which increases incorporation of this lipopeptide into the liposome particle [74, 75]. This strategy is mostly being used in nonsmall-cell lung carcinoma (NSCLC) and is well tolerated [62, 76]. Even though no immunological response was observed, this vaccine seems to have enhanced patient survival for stage IIIB/IV NSCLC in a phase II clinical trial [63]. A phase III study is in progress to confirm this result [64].

Another major strategy is TG4010, from Transgene SA, which is a recombinant virus of the Modified Vaccinia Ankara (MVA), encoding MUC1 and IL-2 (MVA MUC1-IL2). Unlike the L-BLP25 which is being used on NSCLC only, TG4010 is being used against several types of cancer, including prostate cancer, renal cell carcinoma (RCC), and NSCLC [58–60]. In prostate cancer, evidence of biological activity of the vaccine has been observed, with improved prostate-specific antigen (PSA) level doubling time [59]. In RCC, preliminary results were encouraging showing that this vaccine is well tolerated and indicating some evidence of MUC1-specific CD4+ and CD8+ T-cell responses [60]. The

TABLE 2: MUC1-based immunotherapy trials.

Author	Strategy	Clinical trial phase	Major observation	Cancer type
Apostolopoulos et al. [57]	Oxidized Mannan-MUC1	III	Breast cancer recurrence prevention	Breast
Ramlau et al. [58]	TG4010	II	TG4010 can be coupled with chemotherapy	Lung
Dreicer et al. [59]	TG4010	II	Increased PSA doubling time	Prostate
Oudard et al. [60]	TG4010	II	MUC1 T cell responses	RCC
Quoix et al. [61]	TG4010	IIB	Improved survival	Lung
Ohyanagi et al. [62]	BLP25	I/II	Well tolerated, low side effects	Lung
Butts et al. [63]	BLP25	II/B	Increased survival	Lung
WU et al. [64]	BLP25	III inspire	In progress/increased survival	Lung
Butts et al. [65]	BLP25	I/II	New formulation well tolerated	Lung
Wright et al. [66]	MUC1 TIL Transfers	I/II	Influence of the tumor burden on adoptive transfer of MUC1 specific T cells	Breast
Lepisto et al. [67]	Dendritic cells pulsed with MUC1	I/II	Well tolerated, induction of T cell responses	Pancreas
Kondo et al. [68]	Dendritic cells and CTL transfer	I	Clinical response	Pancreas
Dobrzanski et al. [69]	Adoptive transfer CD4 T cells plus IL-10	I	Clinical response	Ovarian
Mohebtash et al. [70]	PANVAC-VF	II	Clinical effects	Breast/ovary
Ibrahim et al. [71]	AS1402 + Letrosole	II	Use of Letrosole incompatible with AS1402 strategy	Breast
Pegram et al. [72]	AS1402	I	Well tolerated, need phase II to evaluate efficacy	Breast
Rittig et al. [73]	ARN muc1	I/II	Induction of CD4+ T cell responses	RCC

best clinical responses using TG4010 were observed for lung cancer. Indeed, TG4010 enhanced the effect of chemotherapy, with an increase in six-month, progression-free survival for patients who received chemotherapy in combination with the vaccine as compared with patients given chemotherapy only [61]. A phase IIB/III trial is currently being performed to evaluate the clinical advantage of combining chemotherapy plus TG4010 in NSCLC.

Encouraging results were also obtained in a pilot phase III clinical trial where early-stage breast cancer patients (stage II) were immunized with oxidized-mannan MUC1 [57]. No resurgence of the disease was observed in the sixteen patients who received the vaccine, whereas four patients among the fifteen who received a placebo relapsed.

Passive vaccination strategies are not the only way to exploit MUC1 T-cells response for immunotherapy. Adoptive immunotherapy (AIT) is another approach, which consists in the purification of patient PBMC (lymphocytes, dendritic cells in particular), followed by *ex vivo* stimulation of T cells and/or dendritic cell loaded with MUC1 peptides. These cells are then adoptively transferred back to the patients. Interest in this strategy is the ability of these T cells to kill patient tumor cells and the capacity of dendritic cells to enhance this T-cell response. The first clinical trial of MUC1 adoptive T-cells transfers showed no clinical response [77]. It was followed by combining the transfer of activated T lymphocytes with MUC1 peptides pulsed dendritic

cells. This second clinical trial showed interesting clinical effects with one patient complete response [68]. At the same time, *Lepisto and colleague* reported that transfers of MUC1 peptide-pulsed dendritic cells can elicit specific MUC1 CD8+ and CD4+ response but did not induce benefit for patient survival [78]. All together, these studies suggest the need of combining T-cells and dendritic cells transfers to obtain optimal response in patients. In another study, *Wright and colleague* showed that tumor burden influences the quality of adoptively transferred MUC1 specific CTL. Indeed, CTL prepared from PBMC of treated breast cancer patients with no evidence of disease can generate CTL that kill cancer cells and produce type 1 cytokine. Inversely, CTL obtained from patients with macroscopic disease were ineffective [79]. More recently, it was shown that TH1 CD4+ lymphocytes transfers in combination with IFN- $\gamma$  and IL-10 were effective to induce clinical response that enhances patient survival [69]. All these studies show the interest of adoptive transfers strategy for MUC1-based immunotherapy. However, the adoptive transfers approach needs *ex vivo* manipulation of cells which could be complex to perform compared to other passive vaccination strategies.

Behind these clinical trials which have reached phase III, many other MUC1 vaccines are being used to explore other ways of inducing specific MUC1 T-cell responses in breast, prostate, ovarian, pancreatic, and lung cancer, as summarized in Table 2. Furthermore, numerous studies have

described MUC1 as an oncogenic protein, advocating the development of pharmacological studies to counteract this protein. This is the case for toxins which target the cytoplasmic tail (see Figure 1) of MUC1 [80, 81] or molecules that downregulate MUC1 protein [82, 83]. Both pharmacological and immunotherapeutic strategies based on MUC1 to treat cancer should now be actively pursued.

### Abbreviations

MPM: Malignant pleural mesothelioma  
MUC1: Mucin1  
TAA: Tumor associated antigen.

### Acknowledgments

This work was financed by INSERM, La ligue régionale contre le Cancer (CSIRGO), the ARC (Association pour la recherche contre le cancer), the Nantes Hospital and the ARSMESO44 association.

### References

- [1] G. P. Dunn, L. J. Old, and R. D. Schreiber, "The three Es of cancer immunoeediting," *Annual Review of Immunology*, vol. 22, pp. 329–360, 2004.
- [2] C. Traversari, P. van der Bruggen, I. F. Luescher et al., "A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 176, no. 5, pp. 1453–1457, 1992.
- [3] J. H. Kessler and C. J. M. Melief, "Identification of T-cell epitopes for cancer immunotherapy," *Leukemia*, vol. 21, no. 9, pp. 1859–1874, 2007.
- [4] S. Müller, K. Alving, J. Peter-Katalinic, N. Zachara, A. A. Gooley, and F. G. Hanisch, "High density O-glycosylation on tandem repeat peptide from secretory MUC1 of T47D breast cancer cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 26, pp. 18165–18172, 1999.
- [5] D. W. Kufe, "Functional targeting of the MUC1 oncogen in human cancers," *Cancer Biology and Therapy*, vol. 8, no. 13, pp. 1197–1203, 2009.
- [6] D. Kufe, "Oncogenic function of the MUC1 receptor subunit in gene regulation," *Oncogene*, vol. 29, no. 42, pp. 5663–5666, 2010.
- [7] S. J. Gendler, C. A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou et al., "Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 25, pp. 15286–15293, 1990.
- [8] M. S. Lan, S. K. Batra, W. N. Qi, R. S. Metzgar, and M. A. Hollingsworth, "Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 25, pp. 15294–15299, 1990.
- [9] J. Burchell, S. Gendler, J. Taylor-Papadimitriou et al., "Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin," *Cancer Research*, vol. 47, no. 20, pp. 5476–5482, 1987.
- [10] A. Girling, J. Bartkova, J. Burchell, S. Gendler, C. Gillett, and J. Taylor-Paradimitriou, "A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas," *International Journal of Cancer*, vol. 43, no. 6, pp. 1072–1076, 1989.
- [11] H. Takeuchi, K. Kato, K. Denda-Nagai, F. G. Hanisch, H. Clausen, and T. Irimura, "The epitope recognized by the unique anti-MUC1 monoclonal antibody MY.1E12 involves sialyl $\alpha$ 2-3galactosyl $\beta$ 1-3N-acetylgalactosaminide linked to a distinct threonine residue in the MUC1 tandem repeat," *Journal of Immunological Methods*, vol. 270, no. 2, pp. 199–209, 2002.
- [12] K. O. Lloyd, J. Burchell, V. Kudryashov, B. W. T. Yin, and J. Taylor-Papadimitriou, "Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines: demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 52, pp. 33325–33334, 1996.
- [13] G. F. Springer, "T and Tn, general carcinoma autoantigens," *Science*, vol. 224, no. 4654, pp. 1198–1206, 1984.
- [14] D. L. Barnd, M. S. Lan, R. S. Metzgar, and O. J. Finn, "Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 86, no. 18, pp. 7159–7163, 1989.
- [15] C. G. Ioannides, B. Fisk, K. R. Jerome, T. Irimura, J. T. Wharton, and O. J. Finn, "Cytotoxic T cells from ovarian malignant tumors can recognize polymorphic epithelial mucin core peptides," *Journal of Immunology*, vol. 151, no. 7, pp. 3693–3703, 1993.
- [16] T. Takahashi, Y. Makiguchi, Y. Hinoda et al., "Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient," *Journal of Immunology*, vol. 153, no. 5, pp. 2102–2109, 1994.
- [17] H. Noto, T. Takahashi, Y. Makiguchi, T. Hayashi, Y. Hinoda, and K. Imai, "Cytotoxic T lymphocytes derived from bone marrow mononuclear cells of multiple myeloma patients recognize an underglycosylated form of MUC1 mucin," *International Immunology*, vol. 9, no. 5, pp. 791–798, 1997.
- [18] K. R. Jerome, D. L. Barnd, K. M. Bendt et al., "Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells," *Cancer Research*, vol. 51, no. 11, pp. 2908–2916, 1991.
- [19] Y. Hinoda, T. Takahashi, T. Hayashi et al., "Enhancement of reactivity of anti-MUC1 core protein antibody and killing activity of anti-MUC1 cytotoxic T cells by deglycosylation of target tissues or cells," *Journal of Gastroenterology*, vol. 33, no. 2, pp. 164–171, 1998.
- [20] N. Domenech, R. A. Henderson, and O. J. Finn, "Identification of an HLA-A11-restricted epitope from the tandem repeat domain of the epithelial tumor antigen mucin," *Journal of Immunology*, vol. 155, no. 10, pp. 4766–4774, 1995.
- [21] V. Apostolopoulos, V. Karanikas, J. S. Haurum, and I. F. C. McKenzie, "Induction of HLA-A2-restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen," *Journal of Immunology*, vol. 159, no. 11, pp. 5211–5218, 1997.
- [22] P. Brossart, K. S. Heinrich, G. Stuhler et al., "Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies," *Blood*, vol. 93, no. 12, pp. 4309–4317, 1999.
- [23] P. Brossart, A. Schneider, P. Dill et al., "The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes," *Cancer Research*, vol. 61, no. 18, pp. 6846–6850, 2001.

- [24] D. Roulois, V. Vignard, F. Guegnon et al., "Recognition of pleural mesothelioma by mucin-1(950-958)/human leukocyte antigen A\*0201-specific CD8<sup>+</sup> T-cells," *European Respiratory Journal*, vol. 38, no. 5, pp. 1117-1126, 2011.
- [25] T. Ninkovic, L. Kinarsky, K. Engelmann et al., "Identification of O-glycosylated decapeptides within the MUC1 repeat domain as potential MHC class I (A2) binding epitopes," *Molecular Immunology*, vol. 47, no. 1, pp. 131-140, 2009.
- [26] E. M. Hiltbold, P. Ciborowski, and O. J. Finn, "Naturally processed class II epitope from the tumor antigen MUC1 primes human CD4<sup>+</sup> T cells," *Cancer Research*, vol. 58, no. 22, pp. 5066-5070, 1998.
- [27] E. M. Hiltbold, M. D. Alter, P. Ciborowski, and O. J. Finn, "Presentation of MUC1 tumor antigen by class I MHC and CTL function correlate with the glycosylation state of the protein taken up by dendritic cells," *Cellular Immunology*, vol. 194, no. 2, pp. 143-149, 1999.
- [28] A. M. Vlad, S. Muller, M. Cudic et al., "Complex carbohydrates are not removed during processing of glycoproteins by dendritic cells: processing of tumor antigen MUC1 glycopeptides for presentation to major histocompatibility complex class II-restricted T cells," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 196, no. 11, pp. 1435-1446, 2002.
- [29] C. Napolitano, A. Rughetti, M. P. Agervig Tarp et al., "Tumor-associated Tn-MUC1 glycoform is internalized through the macrophage galactose-type C-type lectin and delivered to the HLA class I and II compartments in dendritic cells," *Cancer Research*, vol. 67, no. 17, pp. 8358-8367, 2007.
- [30] E. M. Hiltbold, A. M. Vlad, P. Ciborowski, S. C. Watkins, and O. J. Finn, "The mechanism of unresponsiveness to circulating tumor antigen MUC1 is a block in intracellular sorting and processing by dendritic cells," *Journal of Immunology*, vol. 165, no. 7, pp. 3730-3741, 2000.
- [31] T. Ninkovic and F. G. Hanisch, "O-glycosylated human MUC1 repeats are processed *in vitro* by immunoproteasomes," *Journal of Immunology*, vol. 179, no. 4, pp. 2380-2388, 2007.
- [32] N. Peat, S. J. Gendler, E. N. Lalani, T. Duhig, and J. Taylor-Papadimitriou, "Tissue-specific expression of a human polymorphic epithelial mucin (MUC1) in transgenic mice," *Cancer Research*, vol. 52, no. 7, pp. 1954-1960, 1992.
- [33] M. M. Soares, V. Mehta, and O. J. Finn, "Three different vaccines based on the 140-amino acid MUC1 peptide with seven tandemly repeated tumor-specific epitopes elicit distinct immune effector mechanisms in wild-type versus MUC1-transgenic mice with different potential for tumor rejection," *Journal of Immunology*, vol. 166, no. 11, pp. 6555-6563, 2001.
- [34] K. G. Kohlgraf, A. J. Gawron, M. Higashi et al., "Tumor-specific immunity in MUC1.Tg mice induced by immunization with peptide vaccines from the cytoplasmic tail of CD227 (MUC1)," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 53, no. 12, pp. 1068-1084, 2004.
- [35] G. J. Rowse, R. M. Tempero, M. L. VanLith, M. A. Hollingsworth, and S. J. Gendler, "Tolerance and immunity to MUC1 in a human MUC1 transgenic murine model," *Cancer Research*, vol. 58, no. 2, pp. 315-321, 1998.
- [36] R. M. Tempero, G. J. Rowse, S. J. Gendler, and M. A. Hollingsworth, "Passively transferred anti-MUC1 antibodies cause neither autoimmune disorders nor immunity against transplanted tumors in MUC1 transgenic mice," *International Journal of Cancer*, vol. 80, no. 4, pp. 595-599, 1999.
- [37] R. M. Tempero, M. L. VanLith, K. Morikane, G. J. Rowse, S. J. Gendler, and M. A. Hollingsworth, "CD4<sup>+</sup> lymphocytes provide MUC1-specific tumor immunity *in vivo* that is undetectable *in vitro* and is absent in MUC1 transgenic mice," *Journal of Immunology*, vol. 161, no. 10, pp. 5500-5506, 1998.
- [38] R. A. Budiu, I. Diaconu, R. Chrissluis, A. Dricu, R. P. Edwards, and A. M. Vlad, "A conditional mouse model for human MUC1-positive endometriosis shows the presence of anti-MUC1 antibodies and Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells," *Disease Models and Mechanisms*, vol. 2, no. 11-12, pp. 593-603, 2009.
- [39] S. O. Ryan, A. M. Vlad, K. Islam, J. Gariépy, and O. J. Finn, "Tumor-associated MUC1 glycopeptide epitopes are not subject to self-tolerance and improve responses to MUC1 peptide epitopes in MUC1 transgenic mice," *Biological Chemistry*, vol. 390, no. 7, pp. 611-618, 2009.
- [40] S. O. Ryan, M. S. Turner, J. Gariépy, and O. J. Finn, "Tumor antigen epitopes interpreted by the immune system as self or abnormal-self differentially affect cancer vaccine responses," *Cancer Research*, vol. 70, no. 14, pp. 5788-5796, 2010.
- [41] C. K. Tang, K. C. Sheng, D. Pouniotis et al., "Oxidized and reduced mannan mediated MUC1 DNA immunization induce effective anti-tumor responses," *Vaccine*, vol. 26, no. 31, pp. 3827-3834, 2008.
- [42] A. M. Farkas and O. J. Finn, "Vaccines based on abnormal self-antigens as tumor-associated antigens: immune regulation," *Seminars in Immunology*, vol. 22, no. 3, pp. 125-131, 2010.
- [43] T. Deguchi, M. Tanemura, E. Miyoshi et al., "Increased immunogenicity of tumor-associated antigen, mucin 1, engineered to express  $\alpha$ -Gal epitopes: a novel approach to immunotherapy in pancreatic cancer," *Cancer Research*, vol. 70, no. 13, pp. 5259-5269, 2010.
- [44] R. Kovjazin, I. Volovitz, Y. Kundel et al., "ImMucin: a novel therapeutic vaccine with promiscuous MHC binding for the treatment of MUC1-expressing tumors," *Vaccine*, vol. 29, no. 29-30, pp. 4676-4686, 2011.
- [45] D. H. Choi, J. K. Woo, Y. Choi, H. S. Seo, and C. W. Kim, "A novel chimeric DNA vaccine: enhancement of preventive and therapeutic efficacy of DNA vaccine by fusion of Mucin 1 to a heat shock protein 70 gene," *Molecular Medicine Reports*, vol. 4, no. 5, pp. 885-890, 2011.
- [46] J. Chen, H. Y. Li, D. Wang, J. J. Zhao, and X. Z. Guo, "Human dendritic cells transfected with amplified MUC1 mRNA stimulate cytotoxic T lymphocyte responses against pancreatic cancer *in vitro*," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 26, no. 10, pp. 1509-1518, 2011.
- [47] S. E. Wright, I. S. Quinlin, K. A. Rewers-Felkins, K. E. Dombrowski, and C. A. Phillips, "Retention of immunogenicity produced by mucin1 peptides with glycosylation site substitutions," *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, vol. 32, no. 4, pp. 647-655, 2010.
- [48] S. Kobukai, G. J. Kremers, J. G. Cobb et al., "Induction of antitumor immunity by dendritic cells loaded with membrane-translocating mucin 1 peptide antigen," *Translational Oncology*, vol. 4, no. 1, pp. 1-8, 2011.
- [49] V. Lakshminarayanan, P. Thompson, M. A. Wolfert et al., "Immune recognition of tumor-associated mucin MUC1 is achieved by a fully synthetic aberrantly glycosylated MUC1 tripartite vaccine," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 1, pp. 261-266, 2012.
- [50] D. Sugiura, S. Aida, K. Denda-nagai et al., "Differential effector mechanisms induced by vaccination with MUC1 DNA in the rejection of colon carcinoma growth at orthotopic sites and

- metastases," *Cancer Science*, vol. 99, no. 12, pp. 2477–2484, 2008.
- [51] Y. Choi, Y. H. Jeon, J. Y. Jang, J. K. Chung, and C. W. Kim, "Treatment with mANT2 shRNA enhances antitumor therapeutic effects induced by MUC1 DNA vaccination," *Molecular Therapy*, vol. 19, no. 5, pp. 979–989, 2011.
- [52] Y. H. Jeon, Y. Choi, H. J. Kim et al., "In vivo bioluminescence visualization of antitumor effects by human MUC1 vaccination," *Molecular Imaging*, vol. 6, no. 5, pp. 297–303, 2007.
- [53] C. Trumppheller, M. P. Longhi, M. Caskey et al., "Dendritic cell-targeted protein vaccines: a novel approach to induce T-cell immunity," *Journal of Internal Medicine*, vol. 271, no. 2, pp. 183–192, 2012.
- [54] Y. Rong, D. Jin, W. Wu et al., "Induction of protective and therapeutic anti-pancreatic cancer immunity using a reconstructed MUC1 DNA vaccine," *BMC Cancer*, vol. 9, article 191, 2009.
- [55] D. Massé, F. Ebstein, G. Bougras, J. Harb, K. Meflah, and M. Grégoire, "Increased expression of inducible HSP70 in apoptotic cells is correlated with their efficacy for antitumor vaccine therapy," *International Journal of Cancer*, vol. 111, no. 4, pp. 575–583, 2004.
- [56] J. Pinkhasov, M. L. Alvarez, M. M. Rigano et al., "Recombinant plant-expressed tumour-associated MUC1 peptide is immunogenic and capable of breaking tolerance in MUC1.Tg mice," *Plant Biotechnology Journal*, vol. 9, no. 9, pp. 991–1001, 2011.
- [57] V. Apostolopoulos, G. A. Pietersz, A. Tsibanis et al., "Pilot phase III immunotherapy study in early-stage breast cancer patients using oxidized mannan-MUC1 [ISRCTN71711835]," *Breast Cancer Research*, vol. 8, no. 3, article R27, 2006.
- [58] R. Ramlau, E. Quoix, J. Rolski et al., "A phase II study of Tg4010 (Mva-Muc1-IL2) in association with chemotherapy in patients with stage III/IV non-small cell lung cancer," *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 3, no. 7, pp. 735–744, 2008.
- [59] R. Dreicer, W. M. Stadler, F. R. Ahmann et al., "MVA-MUC1-IL2 vaccine immunotherapy (TG4010) improves PSA doubling time in patients with prostate cancer with biochemical failure," *Investigational New Drugs*, vol. 27, no. 4, pp. 379–386, 2009.
- [60] S. Oudard, O. Rixe, B. Beuselinck et al., "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*, vol. 60, no. 2, pp. 261–271, 2011.
- [61] E. Quoix, R. Ramlau, V. Westeel et al., "Therapeutic vaccination with TG4010 and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a controlled phase 2B trial," *The Lancet Oncology*, vol. 12, no. 12, pp. 1125–1133, 2011.
- [62] F. Ohyanagi, T. Horai, I. Sekine et al., "Safety of BLP25 liposome vaccine (L-BLP25) in Japanese patients with unresectable stage III nsccl after primary chemoradiotherapy: preliminary results from a phase I/II study," *Japanese Journal of Clinical Oncology*, vol. 41, no. 5, Article ID hyr021, pp. 718–722, 2011.
- [63] C. Butts, A. Maksymiuk, G. Goss et al., "Updated survival analysis in patients with stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer receiving BLP25 liposome vaccine (L-BLP25): phase IIB randomized, multicenter, open-label trial," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 137, no. 9, pp. 1337–1342, 2011.
- [64] Y. L. Wu, K. Park, R. A. Soo et al., "INSPIRE: a phase III study of the BLP25 liposome vaccine (L-BLP25) in Asian patients with unresectable stage III non-small cell lung cancer," *BMC Cancer*, vol. 11, article 430, 2011.
- [65] C. Butts, R. N. Murray, C. Smith et al., "A multicenter open-label study to assess the safety of a new formulation of BLP25 liposome vaccine in patients with unresectable stage III non-small-cell lung cancer," *Clinical Lung Cancer*, vol. 11, no. 6, pp. 391–395, 2010.
- [66] S. E. Wright, K. A. Rewers-Felkins, I. S. Quinlin et al., "Tumor burden influences cytotoxic T cell development in metastatic breast cancer patients—a phase III study tumor burden influences CTL development," *Immunological Investigations*, vol. 38, no. 8, pp. 820–838, 2009.
- [67] A. J. Lepisto, A. J. Moser, H. Zeh et al., "A phase I/II study of a MUC1 peptide pulsed autologous dendritic cell vaccine as adjuvant therapy in patients with resected pancreatic and biliary tumors," *Cancer Therapy*, vol. 6, no. B, pp. 955–964, 2008.
- [68] H. Kondo, S. Hazama, T. Kawaoka et al., "Adoptive immunotherapy for pancreatic cancer using MUC1 peptide-pulsed dendritic cells and activated T lymphocytes," *Anticancer Research*, vol. 28, no. 1B, pp. 379–387, 2008.
- [69] M. J. Dobrzanski, K. A. Rewers-Felkins, K. A. Samad et al., "Immunotherapy with IL-10- and IFN-gamma-producing CD4 effector cells modulate, "Natural" and, "Inducible" CD4 TReg cell subpopulation levels: observations in four cases of patients with ovarian cancer," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 61, no. 6, pp. 839–854, 2012.
- [70] M. Mohebtash, K. Y. Tsang, R. A. Madan et al., "A pilot study of MUC-1/CEA/TRICOM poxviral-based vaccine in patients with metastatic breast and ovarian cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 17, no. 22, pp. 7164–7173, 2011.
- [71] N. K. Ibrahim, K. O. Yariz, I. Bondarenko et al., "Randomized phase II trial of letrozole plus anti-MUC1 antibody AS1402 in hormone receptor-positive locally advanced or metastatic breast cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 17, no. 21, pp. 6822–6830, 2011.
- [72] M. D. Pegram, V. F. Borges, N. Ibrahim et al., "Phase I dose escalation pharmacokinetic assessment of intravenous humanized anti-MUC1 antibody AS1402 in patients with advanced breast cancer," *Breast Cancer Research*, vol. 11, no. 5, article R73, 2009.
- [73] S. M. Rittig, M. Haentschel, K. J. Welmer et al., "Intradermal vaccinations with RNA coding for TAA generate CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> immune responses and induce clinical benefit in vaccinated patients," *Molecular Therapy*, vol. 19, no. 5, pp. 990–999, 2011.
- [74] S. Sharma, M. K. Srivastava, M. Harris-White, J. M. Lee, and S. Dubinett, "MUC1 peptide vaccine mediated antitumor activity in non-small cell lung cancer," *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 11, no. 8, pp. 987–990, 2011.
- [75] R. Sangha and S. North, "L-BLP25: a MUC1-targeted peptide vaccine therapy in prostate cancer," *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 7, no. 11, pp. 1723–1730, 2007.
- [76] M. Palmer, J. Parker, S. Modi et al., "Phase I study of the BLP25 (MUC1 peptide) liposomal vaccine for active specific immunotherapy in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer," *Clinical Lung Cancer*, vol. 3, no. 1, pp. 49–57, 2001.
- [77] T. Kawaoka, M. Takashima, K. Yamamoto, T. Ueno, and M. Oka, "Adoptive immunotherapy using MUC1-specific CTLs for unresectable pancreatic cancer," *Nippon Rinsho*, vol. 64, supplement 1, pp. 279–282, 2006.
- [78] A. J. Lepisto, A. J. Moser, H. Zeh et al., "A phase I/II study of a MUC1 peptide pulsed autologous dendritic cell vaccine as adjuvant therapy in patients with resected pancreatic and biliary tumors," *Cancer Therapy*, vol. 6, no. B, pp. 955–964, 2008.



- [79] S. E. Wright, K. A. Rewers-Felkins, I. S. Quinlin et al., "Tumor burden influences cytotoxic T cell development in metastatic breast cancer patients—a phase I/II study," *Immunological Investigations*, vol. 38, no. 8, pp. 820–838, 2009.
- [80] D. Raina, R. Ahmad, H. Rajabi et al., "Targeting cysteine-mediated dimerization of the MUC1-C oncoprotein in human cancer cells," *International Journal of Oncology*, vol. 40, no. 5, pp. 1643–1649, 2012.
- [81] D. Raina, M. Kosugi, R. Ahmad et al., "Dependence on the MUC1-C oncoprotein in non-small cell lung cancer cells," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 10, no. 5, pp. 806–816, 2011.
- [82] M. J. Brayman, N. Dharmaraj, E. Lagow, and D. D. Carson, "MUC1 expression is repressed by protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription- $\gamma$ ," *Molecular Endocrinology*, vol. 21, no. 11, pp. 2725–2737, 2007.
- [83] D. Roulois, C. Blanquart, C. Panterne et al., "Downregulation of MUC1 expression and its recognition by CD8<sup>+</sup> T cells on the surface of malignant pleural mesothelioma cells treated with HDACi," *European Journal of Immunology*, vol. 42, no. 3, pp. 783–789, 2012.

### **Annexe 3: Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells**

**Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells** Jean-Baptiste Guillerme, Nicolas Boisgerault, David Roulois, Jérémie Ménager, Chantal Combredet, Frédéric Tangy, Jean-François Fonteneau, and Marc Gregoire. Clinical Cancer Research, 2013 Mar 1; 19(5):1147-58.

#### OBJECTIFS ET RESULTATS PRINCIPAUX :

L'une des approches thérapeutiques développées par l'équipe du Dr. Marc Grégoire est l'utilisation d'une souche vaccinale du virus de la rougeole comme agent anticancéreux. En effet, ce vaccin possède la capacité d'infecter spécifiquement les cellules tumorales, induisant la mort de ces dernières. L'équipe s'intéresse donc au potentiel immunogène de cette mort cellulaire. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont des cellules présentatrices d'antigènes spécialisées dans la réponse antivirale. Nous nous sommes donc intéressés à l'impact des cellules tumorales tuées par le vaccin de la rougeole sur les pDC. Pour cela, la maturation et la présentation d'antigènes de tumeur par les pDC ont été étudiées lorsque ces cellules sont mises au contact de cellules tumorales tuées par le vaccin de la rougeole ou des cellules irradiées (mort non immunogène). Nous avons observé que seules les cellules tuées par le vaccin de la rougeole ont la capacité d'induire la maturation des pDC. Les cellules tumorales sont également phagocytées par les pDC, rendant alors possible la présentation croisée d'antigène de tumeur tel que NY-ESO-1 à un clone de lymphocyte T CD8+ spécifique de NY-ESO-1. Une co-culture de ces pDC ayant phagocytées des cellules tumorales avec un clone T CD8+ spécifique de NY-ESO-1 a en effet permis l'activation de ce dernier, démontrant la présentation croisée d'antigènes de tumeurs.

Ces résultats suggèrent donc que les cellules tumorales tuées par le vaccin du virus de la rougeole peuvent activer le système immunitaire et ainsi permettre l'obtention d'une réponse immunitaire anticancéreuse efficace, notamment par l'induction de la maturation des pDC et la présentation croisée d'antigènes de tumeurs.

**Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells**

Jean-Baptiste Guillaume<sup>1,2,3</sup>, Nicolas Boisgerault<sup>1,2,3</sup>, David Roulois<sup>1,2,3</sup>, Jérémie Ménager<sup>1,2,3</sup>, Chantal Combredet<sup>4</sup>, Frédéric Tangy<sup>4</sup>, Jean-François Fonteneau<sup>1,2,3,\*</sup>, and Marc Gregoire<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR892, Nantes, F-44000, France.

<sup>2</sup>CNRS, UMR6299, Nantes, F-44000, France

<sup>3</sup>Université de Nantes, Nantes, F-44000, France.

<sup>4</sup>Unité de Génomique Virale et Vaccination, CNRS-URA 3015, Institut Pasteur, Paris, France.

\*authors participate equally in the last authorship position

**Running title:** cross-presentation of human tumor antigen by pDC

**Keywords:** antitumor virotherapy, measles virus vaccine, plasmacytoid dendritic cells, tumor antigen, cross-presentation.

**Financial support:** This study was financed by INSERM, La ligue régionale grand ouest contre le Cancer (CSIRGO), the Association pour la recherche contre le cancer (ARC), the Nantes Hospital and the ARSMESO44 association.

**Corresponding author:** Dr. Jean-François Fonteneau,

**E-mail:** [jean-francois.fonteneau@inserm.fr](mailto:jean-francois.fonteneau@inserm.fr)

INSERM, UMR892, Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, 8 quai Moncoussu, BP70721, 44007 Nantes Cedex 1, France

Phone: (+33)228 080 239 Fax: (+33)228 080 204

**Conflicts of Interest:** None

**Statement of translational relevance**

Measles virus vaccine (MV)-based antitumor virotherapy is a new therapeutic approach to treat cancers. It is based on the spontaneous capacity of MV to infect and kill preferentially tumor cells. Phase-I clinical trials against different malignancies are in progress with encouraging results.

This promising efficacy of MV antitumor virotherapy is mainly due to the lysis of tumor cells following MV infection. However, it is likely that a part of this efficacy is due to the effect of MV-infected tumor cells on the antitumor immune response.

In this study, we show that MV-infected tumor cells activate human plasmacytoid dendritic cells (pDC), a particular subset of DC specialized in the antiviral immune response. Human pDC are then able to cross-present a tumor antigen from MV-infected tumor cells to specific cytotoxic T cells. Our work, thus, suggests that MV-based antitumor virotherapy triggers an antitumor immune response, notably by the recruitment of pDC.

**Abstract**

**Purpose:** Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are antigen-presenting cells specialized in antiviral response. The measles virus vaccine (MV) is proposed as an antitumor agent to target and specifically kill tumor cells without infecting healthy cells.

**Experimental design:** Here, we investigated, *in vitro*, the effects of MV-infected tumor cells on the phenotype and functions of human pDC. We studied maturation and tumor antigen cross-presentation by pDC, exposed either to the virus alone, or to MV-infected or UV-irradiated tumor cells.

**Results:** We found that only MV-infected cells induced pDC maturation with a strong production of IFN- $\alpha$ , whereas UV-irradiated tumor cells were unable to activate pDC. This IFN- $\alpha$  production was triggered by the interaction of MV ssRNA with TLR7. We observed that MV-infected tumor cells were phagocytosed by pDC. Interestingly we showed cross-presentation of the tumor antigen NYESO-1 to a specific CD8+ T cell clone when pDC were cocultured with MV-infected tumor cells, whereas pDC were unable to cross-present NYESO-1 after coculture with UV-irradiated tumor cells.

**Conclusions:** Altogether, our results suggest that the use of MV in antitumor virotherapy induces immunogenic tumor cell death, allowing pDC to mature, produce high amounts of IFN- $\alpha$ , and cross-present tumor antigen, thus representing a mode of recruiting these antigen presenting cells in the immune response.

**Introduction**

Measles virus vaccine (MV)-based antitumor virotherapy is a new therapeutic approach to treat cancers (1, 2). It is based on the ability of a vaccine-attenuated live strain of measles virus, such as Edmonston or Schwarz strains, to infect and kill preferentially tumor cells. MV uses mainly CD46 molecules to infect cells, whereas wild-type measles virus uses preferentially SLAM (CD150) (3, 4). During cancer development, tumor cells are often selected to express high levels of CD46 molecules, which inhibits the complement system (5, 6). This CD46 overexpression makes the tumor cells less sensitive to lysis by the complement but renders them sensitive to MV infection. We and others have reported that several types of cancer are sensitive to this approach *in vitro*, such as mesothelioma (7), ovarian cancer (8), multiple myeloma (9), breast cancer (10), hepatocellular carcinoma (11) and melanoma (12). *In vivo* efficacy of this approach has also been reported in models of human tumor xenografts in immunodeficient mice (8-11). Phase-I clinical trials against different malignancies are now in progress. In a first phase-I clinical trial, intratumoral injection of low doses of MV to five cutaneous-T-cell-lymphoma patients allowed stabilization of the disease in two patients and the observation of a partial response in one other (13). Results from a further phase I trial were published recently, in which patients with chemotherapy-resistant ovarian cancer were treated with intraperitoneal MV (14). Twenty-one patients were treated and improvements in serum tumor markers were noted in five.

This promising efficacy of MV antitumor virotherapy is mainly a result of the lysis of tumor cells following MV infection, as shown by *in vivo* studies in immunodeficient mice (15, 16). In these immunodeficient mice, it has also been shown that MV infection triggers neutrophil infiltration of tumors, which probably participates in the efficiency of the antitumor virotherapy (17). Indeed, MV infection of tumor cells may also be able to trigger the immune system to induce an antitumor immune response. We previously showed, *in vitro*, that mesothelioma cells killed by MV were able to produce danger signals, trigger the maturation of myeloid dendritic cells (DC) and cross-present tumor antigens to CD8+ T lymphocytes, whereas the same tumor cells killed by ultraviolet (UV) irradiation did not (7). Similar results were recently reported following lysis of melanoma tumor cells by MV (12).

Plasmacytoid DC (pDC) are a subset of DC involved in the antiviral immune response due to their expression of Toll-like receptors (TLR) specialized in the recognition of viral nucleic acids (TLR7, TLR9) (18). They respond to a wide range of viruses (inter alia influenza A virus, herpes simplex virus, HIV) in terms of activation and maturation by producing large amounts of type-I interferon (IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\omega$ ). They are also able to present viral antigens to CD8+ and CD4+ T cells when they are infected by a virus (19) and to cross-present viral antigens from virus-infected cells to CD8+ T lymphocytes (20-23). It has also been shown that these pDC could play a beneficial role in the immune response against tumors (24, 25). As an example, in a mouse melanoma model, pDC activation and antitumor immune response were observed inside tumors by topical treatment with the TLR7 ligand, imiquimod (24). As MV is single-stranded RNA (ssRNA), pDC should be able to detect the MV infection of tumor cells, because of their intravacuolar TLR7 expression which recognizes single-stranded RNA. In addition, although it has been well described that human pDC are able to cross-present viral antigens, there is as yet no evidence that these antigen-presenting cells are able to cross-present tumor antigens.

In our study we addressed, *in vitro*, the effect of tumor cell infection by MV Schwarz on the activation status of human pDC and their ability to cross-present a tumor antigen to a specific CD8+ T cell clone. We showed that, despite CD46 expression, pDC are not sensitive to MV infection. However, they are able to respond *in vitro* to MV by producing IFN- $\alpha$  with a greater sensitivity when IL-3 is added to the culture. We also demonstrated that MV-infected tumor cells triggered pDC activation, notably IFN- $\alpha$  production, whereas UV-irradiated tumor cells did not. pDC activation was probably caused by the single-stranded RNA of MV, which triggers TLR7 in the pDC endocytic compartment following phagocytosis of MV-infected tumor cells. Interestingly, we showed for the first time that human pDC cocultured with MV-infected tumor cells were able to cross-present the NYESO-1 tumor antigen to a specific CD8+ T cell clone. Our results suggest that, in addition to a direct tumor lysis effect, MV-based antitumor virotherapy may trigger an antitumor immune response by activating pDC.

## Materials and Methods

### *Cell culture*

The mesothelioma Meso13 cell line was established and characterized in our laboratory (26), the melanoma M18 was a kind gift from Dr. Labarriere (INSERM U892, France), and the pulmonary adenocarcinoma A549 cell line was purchased from ATCC (Manassas, VA). All cell lines were cultured at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin and 2mM L-glutamine (all reagents were purchased from Gibco-Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Cells were routinely checked for mycoplasma contamination, by PCR. A549 is HLA-A\*2501+; -A\*3001+ (27). M18 is HLA-A\*2902 homozygous as determined by PCR (data not shown).

### *MV infection and UV irradiation*

Live-attenuated Schwarz-strain measles virus (MV) and recombinant MV-enhanced green fluorescent protein (MV-eGFP) were produced as previously described (7). MV infection of tumor cells was performed for 2 hours at 37°C with a multiplicity of infection (MOI) of 1 unless otherwise indicated. Viral inoculum was then replaced by fresh cell medium for 72 hours. For pDC infection and maturation experiments, MV was not washed and stayed in the medium throughout the culture. Measurement of infection rate was performed by flow cytometry using MV-eGFP at 24, 48, and 72 hours post-infection. All other experiments were carried out using MV. Tumor cells were irradiated with UV-B (312nm – 100kj/m<sup>2</sup>, Stratalinker, Stratagene). Medium was renewed every 72 hours.

### *DC isolation and culture*

pDC were obtained from healthy donor PBMCs (Etablissement Français du Sang, Nantes, France) as previously described (28). Briefly, pDC were first enriched by counterflow centrifugation and then purified by magnetic bead negative selection as recommended in the manufacturer's protocol (Stemcell Technologies, Grenoble, France). The purity of untouched pDC was always greater than 96%. pDC (3x10<sup>5</sup> per ml) were maintained in culture with 20ng/ml rhIL-3 (Sigma, Saint Quentin



Fallavier, France) or activated *in vitro* with a TLR-7 agonist, R848 (InvivoGen, San Diego, USA) (5µg/ml). pDC were also cocultured with MV alone, MV and IL-3 (MOI=1), or MV-infected or UV-irradiated tumor cells (pDC:tumor cell/1:1) without rhIL-3 or maturation agent. After 18 hours, culture supernatants and pDC were harvested for use. For the TLR-7 inhibition assay we used immunoregulatory DNA sequences, which specifically inhibit signaling via TLR-7 [IRS 661], at concentrations ranging from 0.1µM to 1µM (Eurofins, Munich, Germany). As a control we used CpG-A at 5µg/ml to induce a TLR-9-dependent IFN- $\alpha$  secretion by pDC (InvivoGen, San Diego, USA).

#### *Immunofluorescence and flow cytometry*

The phenotypes of pDC were determined by immunofluorescence followed by flow cytometry. pDC were stained with monoclonal antibodies specific for CD40, CD86, HLA-DR (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD83 (BioLegend, San Diego, CA-USA) and BDCA-4 (Miltenyi Biotec). pDC were gated as BDCA-4+/HLA-DR+ cells, to differentiate them from tumor cells. Tumor cell death was measured by TO-PRO®3 (Invitrogen, Saint Aubin, France) staining as recommended by the manufacturer. TO-PRO®3 is a carbocyanine monomer nucleic acid with far-red fluorescence that enters only in dead cells and stains the DNA. Fluorescence was analyzed on FACSCantoII (Becton Dickinson, New Jersey, USA) using FlowJo software.

#### *Phagocytosis assay*

MV-infected and UV-irradiated tumor cells were stained with PKH-67 according to the manufacturer's protocol (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) and cocultured with pDC, for 18 hours at 4°C or 37°C (1 DC:1 tumor cell). Cocultures were washed with PBS-EDTA to dissociate the cell-conjugate. pDC were stained by an HorizonV450-conjugated, anti-HLA-DR-antibody (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed by flow cytometry (FACSCantoII, BD). pDC phagocytosis was observed by confocal microscopy (Nikon). MV-infected and UV-irradiated tumor cells were stained with PKH-67 and then cocultured with pDC in 24-well plates containing poly-lysine glass slides, for 18 hours (pDC:tumor cell, ratio 1:1). pDC were stained with uncoupled anti-HLA-DR

(BD Bioscience). HLA-DR staining was revealed with a secondary anti-mouse IgG antibody coupled to AlexaFluor 568.

#### *Cytokine detection*

IFN- $\alpha$  (MabTech, Cincinnati, OH-USA) production was measured by ELISA on pDC culture supernatants according to the manufacturer's instructions.

#### *Cross-presentation assay*

NYESO-1<sup>pos</sup>/HLA-A\*0201<sup>neg</sup> melanoma (M18) and NYESO-1<sup>neg</sup>/HLA-A\*0201<sup>neg</sup> pulmonary adenocarcinoma (A549) cell lines were MV-infected or UV-B irradiated and cultured for 72 hours. They were then cocultured with HLA-A\*0201<sup>pos</sup> pDC (pDC:tumor cell ratio 1:1). After 18 hours, pDC were cocultured with the HLA-A\*0201/NYESO-1(156-165)-specific CD8<sup>+</sup> T cell clone, M117.167, for 6 hours in the presence of Brefeldin-A (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). The M117.167 clone was obtained by cloning in a limiting dilution of tumor-infiltrating lymphocytes from a melanoma patient. The clone was cultured as described (29). As control, we used pDC pulsed for 1 hour with 0.1 or 1 $\mu$ M NYESO-1(156-165) peptide and washed. Cells were then fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde, for 10min at room temperature, and permeabilized and stained with IFN- $\gamma$  and CD8-specific antibodies (BD Biosciences, SanJose, CA, USA), as previously described (31). IFN- $\gamma$  production was analyzed by flow cytometry with a gate on CD8<sup>+</sup> T cells.

#### *Real-time RT-PCR*

One microgram of total RNA was reverse-transcribed using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (InVitroGen, Saint Aubin, France). PCR reactions were performed using QuantiTect primers (Qiagen, Foster City-USA) and RT<sup>2</sup> Real-Time SYBR-Green/ROX PCR mastermix (Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France), according to the manufacturers' instructions.

### *Statistics*

GraphPad Prism (Inc., San Diego, CA-USA) software using a nonparametric Mann Whitney comparison test was used. P values < 0.05 were considered to be statistically significant.

## **Results**

### *Sensitivity of tumor cells and pDC to MV infection.*

During infection, MV enters cells mainly via the CD46 and, to a lesser extent, CD150/SLAM (3, 4). In a first experiment, we studied the expression of these two major MV receptors, CD46 and CD150/SLAM, on pDC, melanoma (M18), mesothelioma (Meso13) and pulmonary adenocarcinoma (A549) cell lines (Figure 1A). We observed CD46 expression on all cell types, with higher expression on Meso13 and A549. Regarding CD150/SLAM expression, we found a positive expression on the melanoma cell line, M18. These results suggest that all these cell types may be sensitive to MV infection, as they all express CD46.

We then studied the sensitivity to MV infection of these four cell types using a recombinant MV encoding the green fluorescent protein (MV-GFP). Seventy-two hours after exposure to MV with a MOI=1, the three tumor cell lines were productively infected with MV, ranging from 50% of A549 cells positive for GFP to 90% of Meso13 cells (Figure 1B). Furthermore, we observed syncytia formation for the three tumor cell lines (Supplemental Figure video 1). pDC were not permissive at MOI=1 (Supplemental Figure video 2). Without a survival signal such as IL-3, the pDC died during the 72 hours of culture. Thus, we also performed experiments where we added IL-3 to the pDC exposed to MV (Figure 1C). In the presence of IL-3, they survived during the 72 hours, but were not productively infected by MV. To confirm this result, we increased the MOI up to 50 in the presence of IL-3, but we still failed to detect infected pDC (Figure 1D). However, we observed a small shift of fluorescence at MOI=50, which was probably due to uptake of soluble GFP during the 72-hour culture, which contaminates the MV-GFP preparation, as when we used UV-irradiated MV-GFP which is not able to replicate, we still observed this slight fluorescence shift (Supplemental Figure 3).

Finally, when the MV-GFP was incubated for 2 hours at MOI=50 with pDC and washed, we failed to detect the small shift of fluorescence 70 hours later (Supplemental Figure 3).

We then measured tumor cell death 72 hours after infection. We found that nearly half of MV-infected tumor cells were TO-PRO+ after 72 hours (Figure 1E). A similar level of cell death was observed by irradiating the tumor cells with UV-B. Thus, MV infection induces tumor cell death for approximately half of the tumor cells 72 hours after infection.

#### *MV-infected tumor cells induce maturation of pDC.*

We next investigated the effects of MV alone and MV-infected cells on pDC maturation (Figure 2). In these experiments, we evaluated how MV infection of tumor cells in comparison with UV irradiation, another inducer of tumor cell death, affects pDC maturation. As a control for maturation, we exposed pDC to the TLR7/8 agonist, R848 (Figures 2A and 2B).

We previously demonstrated that the MV-infected MPM tumor cell line, Meso13, induced maturation of monocyte-derived DC, without additional adjuvants, whereas the virus alone or UV-irradiated Meso13 did not (7). We presently performed a set of experiments on pDC to determine the effects of MV alone, MV-infected or UV-irradiated tumor cells on pDC maturation status. We compared the effect of MV-infected and UV-irradiated tumor cells on the maturation status of pDC (Figure 2). We observed maturation of pDC cocultured with MV-infected tumor cells, whereas UV-irradiated tumor cells failed to activate pDC. Indeed, CD83 maturation marker expression was induced by MV-infected cells to a similar level as that observed when the pDC were exposed to R848. We also noted an induction of the expression of the costimulation molecules, CD40 and CD86, on pDC exposed to MV-infected tumor cells, although this induction was low compared with the levels triggered by R848 alone.

Two studies have been reported which describe conflicting results on the ability of MV alone to trigger pDC maturation (30, 31). However the study from Duhon et Coll, reporting that MV activates pDC, was performed in the presence of IL-3, a pDC survival factor (30), whereas the other study, from Schlender and Coll, who observed that pDC cultured with MV does not induce pDC

maturation, was carried out without IL-3. Thus, we performed and compared the two conditions and found similar results to those described by these authors. Indeed, MV at MOI=1 induced pDC maturation only in the presence of IL-3 (Figure 2). As observed for R848 alone, MV in the presence of IL-3 induced pDC maturation, mainly characterized by a significant increase of CD83 and, to a lesser extent, CD40 and CD86 expression. We also observed survival and maturation of pDC in the absence of IL-3 only when we exposed them to a high quantity of MV (MOI=50) (data not shown). At a lower viral concentration in the absence of IL-3, the pDC died.

In the last set of experiments, we tested whether MV infection and replication in pDC were needed to induce their activation. We exposed pDC to UV-irradiated MV (MV\*), which is unable to replicate, and we observed a similar level of maturation (CD83, CD80 and CD86 expressions) and IFN- $\alpha$  production as with non-irradiated MV (Supplemental Figure 4A and 4C). The presence of a blocking anti-CD46-specific antibody in the culture of pDC exposed to IL-3 and MV did not affect maturation of pDC (Supplemental Figure 4A). The same experiment was performed with pDC exposed to MV-infected tumor cells. We still observed maturation and IFN- $\alpha$  production when MV-infected tumor cells were UV-irradiated before exposure to pDC (Supplemental Figure 4B and 4C). Finally, we tested whether a CD46-specific monoclonal antibody was able to inhibit pDC maturation in response to MV-infected tumor cells (Supplemental Figure 4B and 4C). We did not observe inhibition, whereas the anti-CD46 antibody completely inhibited infection of Meso13 as a control (Supplemental Figure 4D). Altogether, these results suggest that MV infection and replication in pDC are not necessary for pDC activation in response to MV.

*pDC capture cellular components from MV-infected tumor cells.*

Due to endo/lysosomal expression of TLR-7 and TLR-9, pDC are specialized in viral nucleic acid detection (18). These two receptors are the major innate receptors that activate pDC (32). Since MV, in the presence of IL-3 or MV-infected tumor cells, are able to induce pDC maturation, it is likely that the maturation stimulus is MV ssRNA which activates TLR7 in the endo/lysosomal compartment. This hypothesis is strengthened by the fact that MV alone does not induce DC

maturation, as these cells do not express TLR7 in humans. This implies that some MV are endocytosed by pDC when they are cultured with MV and IL-3 or with MV-infected cancer cells. We then investigated whether pDC efficiently take up cellular material from MV-infected and UV-irradiated tumor cells (Figure 3). MV-infected and UV-irradiated M18 and A549 tumor cells were labeled with PKH67 and cocultured with pDC. We observed that pDCs efficiently take up MV-infected tumor cells at 37°C, whereas UV-irradiated tumor cells were less efficiently taken up (Figures 3A and 3B). In two additional experiments, we observed that the presence of the CD46 monoclonal antibody in the culture did not inhibit phagocytosis of MV-infected tumor cells (data not shown).

These results were confirmed by confocal microscopy (Figure 3C). pDC were cocultured for 18 hours with PKH-67-labeled, MV-infected tumor cells. The optical sections showed fluorescent fragments of MV-infected tumor cells inside the pDC, confirming the internalization of MV-infected tumor cell pieces by pDC. Interestingly, we never observed syncytia formation between pDC and tumor cells. Altogether, these results suggest that some MV contained in infected tumor cells could access compartments where TLR7 is located.

*MV-infected tumor cells induce strong type-I IFN secretion by triggering TLR7.*

pDCs are known to be the strongest producers of type-I IFN, notably against virus, upon TLR-7 or TLR-9 activation (18). Thus, we measured IFN- $\alpha$  production by pDC following exposure to MV, MV-infected or UV-irradiated tumor cells, by ELISA (Figure 4A). Direct exposure to MV induced IFN- $\alpha$  secretion by pDC only in the presence of IL-3, matching the cell maturation observed earlier in Figure 2. The amount of IFN- $\alpha$  produced in response to MV in the presence of IL-3 was comparable with the amount induced by R848 alone, a potent TLR7/8 agonist. Strikingly, we found high amounts of IFN- $\alpha$  in coculture supernatants after exposure of pDC to MV-infected tumor cells (20-40 times more than observed in response to MV in the presence of IL-3 or R848 alone). These high quantities of IFN- $\alpha$  were produced by the pDC, since tumor cells did not produce IFN- $\alpha$  or a very low amount (pg/ml range) after MV infection (data not shown). UV-irradiated A549 or M18 tumor cells did not induce IFN- $\alpha$  production by pDC. These results show that MV-infected tumor cells are able to trigger

the production of high levels of IFN- $\alpha$  by pDC, considerably higher than the levels produced by pDC exposed to MV in the presence of IL-3 or to R848 alone.

We have previously shown that, three days after infection of the Meso13 tumor cell line, a large amount of virus is produced, reaching  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml corresponding to an MOI greater than 100 from a starting dose of virus of  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml, corresponding to an MOI=1 (7). It is thus likely that the huge quantity of IFN- $\alpha$  produced by pDC in response to MV-infected tumor cells is the result of the intense MV replication in these tumor cells. To test this hypothesis, we cultured pDC in the presence of increasing MOI ranging from 1 to 50, with or without IL-3 (Figure 4B). In the presence of IL-3, we observed that IFN- $\alpha$  production by pDC increased with the MOI. On the contrary, pDC did not produce IFN- $\alpha$  in the absence of IL-3, except for the highest MOI (MOI=50). These results suggest that the level of IFN- $\alpha$  production by pDC is dependent on the quantity of MV and the presence of either IL-3 or other survival signals, explaining the huge quantity of IFN- $\alpha$  produced in response to the high titer of virus after infection of tumor cells.

Since MV and MV-infected tumor cells contain viral ssRNA, it is likely that IFN- $\alpha$  production by pDC is mainly due to the triggering of TLR-7. Thus, we carried out an inhibition of TLR7. We used specific immunoregulatory DNA sequences (IRS) that inhibit IFN- $\alpha$  expression mediated by TLR-7 (IRS661) (33). We showed that IFN- $\alpha$  production by pDC cultured in the presence of MV and IL-3 was inhibited when we added the IRS661 (Figure 4C). We also observed a similar IFN- $\alpha$  inhibition when IRS661 was added to pDC exposed to MV-infected tumor cells. As a control, we showed that IRS661 did not inhibit the CpG-A-induced IFN- $\alpha$  production by pDC, which is TLR9 dependent. Altogether, these results demonstrate that IFN- $\alpha$  production induced by MV or MV-infected cells is TLR7 dependent.

*pDC are able to cross-present a tumor-associated antigen from MV-infected tumor cells.*

The capacity of human pDC to cross-present viral antigens has been reported (20-22), but cross-presentation of tumor-associated antigens (TAA) has not yet been described. We wondered whether human pDC exposed to MV-infected tumor cells would be able to cross-present a human

TAA spontaneously expressed by tumor cells. We showed by RT-PCR that the HLA-A\*0201<sup>pos</sup> M18 melanoma cell line expresses the cancer testis antigen, NYESO-1, whereas the A549 lung adenocarcinoma cell line does not (Figure 5A).

To determine whether HLA-A\*0201<sup>pos</sup> pDC are able to cross-present this TAA after exposure to an MV-infected or UV-irradiated HLA-A\*0201<sup>neg</sup>/NYESO-1<sup>pos</sup> M18 tumor cell line, we used the CD8<sup>+</sup> T cell clone, M117.167, which is specific for HLA-A\*0201/NYESO-1(157-165) complexes (Figures 5B-D). A schematic of this experiment is shown in Supplemental Figure 5. The M117.167 T cell clone did not produce IFN- $\gamma$ , alone or in the presence of IL-3 pDC, but was activated in the presence of pDC pulsed with NYESO-1 [157-161] peptides (Figure 5B). The clone was activated as soon as 0.1 $\mu$ M peptide was loaded onto pDC (16.3% IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells) and was more intensely activated by pDC pulsed with 1 $\mu$ M peptide (77.5%). In the presence of pDC cultured with MV-infected M18 tumor cells, 11.5% of the clone population was activated, whereas the clone did not produce IFN- $\gamma$  in response to pDC cultured with UV-irradiated M18 tumor cells (Figure 5B). In response to pDC cocultured with MV-infected M18, the clone had an IFN- $\gamma$  production profile comparable with that observed in response to pDC pulsed with 0.1 $\mu$ M NYESO-1(157-165) peptide.

As a control, we failed to detect activation of the M117.167 T cell clone in response to MV-infected or UV-irradiated M18 tumor cells alone (Figure 5C). This result was expected, as the M18 tumor cell line is HLA-A\*0201<sup>neg</sup>, thus unable to directly present NYESO-1(157-165) peptide to the clone. This demonstrates that IFN- $\gamma$  production by the clone in response to HLA-A\*0201<sup>pos</sup> pDC cocultured with MV-infected M18 tumor cells is due to cross-presentation. We also did not observe IFN- $\gamma$  production in response to pDC cocultured with MV-infected NYESO-1<sup>neg</sup> A549 tumor cells. In this representative experiment, the clone produced IFN- $\gamma$  in response to pDC cocultured with MV-infected M18 (6.5% IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells), a production rate close to the one observed in response to pDC pulsed with 0.1 $\mu$ M NYESO-1(157-165) peptide (10.8% IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells). In a final set of experiments, we compared NYESO-1 cross-presentation by pDC with cross-presentation by Mo-DC (Supplemental Figure 6). We found a similar level of cross-presentation between the two types of DC when they were



cocultured with MV-infected M18 tumor cells, whereas no cross-presentation was observed in response to pDC or Mo-DC cocultured with UV-irradiated M18.

Altogether, our results show that pDC are able to cross-present tumor antigen such as NYESO-1 from MV-infected tumor cells, but not from UV-irradiated ones. Thus, MV-based antitumor virotherapy should be able to hire pDC in the antitumor immune response by activating their ability to produce high quantities of IFN- $\alpha$  and to cross-present TAA from MV-infected tumor cells to tumor-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.

### Discussion

In this study, we characterized, *in vitro*, the consequences of MV-based antitumor virotherapy on human pDC functions. Firstly, we showed that pDC are not sensitive to MV infection despite expression of CD46. However, they are able to detect the virus by producing IFN- $\alpha$  in response to high virus quantity in the absence of a survival signal, and to low virus quantity when a survival signal, such as IL-3, is added to the culture. Secondly, when the pDC were cocultured with MV-infected tumor cells, they underwent a maturation characterized by the induction of CD83 expression and strong production of IFN- $\alpha$ , with a slightly increased expression of costimulatory molecules. Conversely, the pDC cocultured with UV-irradiated tumor cells retained an immature phenotype similar to that observed when they were cocultured with IL-3 alone. We then identified TLR7 as the pDC receptor responsible for their activation, probably due to the presence of single-stranded viral RNA in the endocytic compartment of pDC following internalization of MV-infected tumor cell fragments. Finally, using an HLA-A\*0201/NYESO-1(157-165)-specific CD8<sup>+</sup> T cell clone, we showed that HLA-A\*0201<sup>+</sup> pDC were able to cross-present this tumor-associated antigen (TAA) from NYESO-1<sup>+</sup> HLA-A\*0201<sup>HLA</sup> MV-infected tumor cells, but not from UV-irradiated ones. This is the first time, to our knowledge, that the capacity of human pDC to cross-present a TAA from dead tumor cells to CD8<sup>+</sup> T cells has been demonstrated. Altogether, these results suggest that MV-based antitumor virotherapy, in addition to its direct lysis of infected tumor cells, is able to recruit pDC in

the antitumor immune response, to activate their ability to produce high levels of type-I IFN and to cross-present TAA.

In the first part of our work, we showed that human pDC exposed *in vitro* to MV at an MOI=1 did not undergo maturation without IL-3. In this condition, with no survival signal, pDC undergo apoptosis and fail to acquire MV in the endosomal compartment to engage in a maturation process by the ligation of viral ssRNA to TLR7. When pDC were exposed to MV in the presence of IL-3, they survived and maturation was observed (low IFN- $\alpha$  production and induction of CD83 expression). We observed the activation of pDC by MV in the absence of IL-3, only when we used a high quantity of MV (MOI=50). At this high MV concentration, we think that enough MV reached the endocytic compartment of pDC to provide a survival/maturation signal, before their apoptosis program was engaged. Thus, when pDC are exposed to MV in the presence of IL-3, the pDC survive and MV is internalized and allows triggering of TLR7 by the viral ssRNA. When pDC are exposed to MV in the absence of IL-3, they undergo apoptosis unless enough MV reaches the endocytic compartment to activate and mature them. Our results explain the contradictory reports in the literature, due to differences in experimental settings. Indeed, we obtained similar results to Schlender and collaborators who reported that a low quantity of MV Schwarz failed to induce IFN- $\alpha$  by pDC cultured in the absence of IL-3 (31), and to Duhon and colleagues who claimed that MV Schwarz induces high quantities of IFN- $\alpha$  production by pDC in the presence of IL-3 (30). However, our study does not support the claim that MV Schwarz inhibits IFN- $\alpha$  production by pDC (31), as pDC produce IFN- $\alpha$  in the presence of IL-3. Finally, both groups described staining of pDC by a monoclonal antibody to MV hemagglutinin (H), but interpreted the result differently. One group claimed that pDC were infected and amplified the virus (31), while the other group concluded that, despite the H protein staining on pDC, MV replication was low. Our results support this latter conclusion, as we did not observe productive infection using MV-eGFP, even at high MOI, in the absence nor presence of IL-3.

We also showed that, in the presence of MV or MV-infected tumor cells, pDC undergo maturation characterized by the upregulation of CD83 molecule expression at the cell surface. In the presence of MV or MV-infected tumor cells, the pDC produce higher quantities of IFN- $\alpha$  in response

to high viral load than pDC stimulated with R848 alone. However, these cells do not express as much of the CD40 and CD86 costimulatory molecules. Thus, this maturation phenotype resembles the maturation phenotype induced by HIV infection (34, 35), which activates pDC by the TLR7, as does MV (36). Indeed, it is now clear that, depending on the nature of the TLR agonist used, two main pathways of activation can be triggered in human pDC. This dichotomy was first reported by Kerkmann and colleagues, who showed that two TLR9 agonists, CpG-A and CpG-B, activate pDC maturation using two different pathways (37). More recently, the same dichotomy has been observed for TLR7 agonists (35). Indeed, HIV behaves like CpG-A by triggering TLR7 and the IRF7 signaling pathway in the early endosome of pDC, and by inducing strong production of IFN- $\alpha$ . Our results show that the maturation induced by MV+IL-3 or MV-infected cells is similar to the activation induced by HIV, suggesting an early endosomal triggering of TLR7 by MV ssRNA. This early endosome activation pathway is compatible with antigen cross-presentation expressed by virus-infected cells, as cross-presentation of viral antigens from infected cells has been demonstrated (21) and cross-presentation of the TAA from MV-infected cells, in our present study. Conversely, Schnurr and colleagues reported that, *in vitro*, pDC, contrary to myeloid DC, were not able to cross-present a TAA from a full-length protein alone or as an immune complex form (38). However, these authors used a soluble protein and did not use NYESO-1-expressing tumor cells as the antigen source. *In vivo*, antigen cross-presentation by pDC is also controversial. Salio and colleagues reported that murine pDC stimulated by CpG are not able to cross-present antigens, whereas they can mount a T cell response against endogenous antigens (39). Mouries and colleagues showed, *in vivo* and *in vitro*, also in a murine model, that soluble OVA protein and TLR agonists (CpG or R848) activate pDC to cross-prime OVA to specific CD8<sup>+</sup> T cells (23). Similarly, presentation and cross-presentation of soluble OVA peptide or whole protein, following TLR9 stimulation by CpG or by infection with influenza virus containing OVA epitopes, was confirmed recently, *in vitro*, by Kool and colleagues (40). Finally, Liu and colleagues reported that intratumoral injection of CpG-A-stimulated pDC to mice bearing B16 melanoma induced a tumor antigen cross-priming, but this cross-priming was performed by CD11c<sup>+</sup> DC, not by pDC (25). We have shown here that, *in vitro*, human pDC exposed to MV-infected tumor

cells are able to cross-present NYESO-1 to a CD8<sup>+</sup> T cell clone specific for this TAA. We demonstrated that MV-infected tumor cells undergo cell death and are then phagocytosed by pDC. These MV-infected cells are capable of activating pDC without the addition of adjuvants or TLR agonists. It remains to be determined whether this cross-presentation would result in cross-priming *in vivo* since MV activates pDC by the early endosomal pathway, which is thought to be more implicated in IFN- $\alpha$  production than in T cell stimulatory capacity (41).

The efficiency of MV-based antitumor virotherapy has been demonstrated *in vivo* in different models of human tumor xenografts in immunodeficient mice (8-11). The first clinical trials of MV-based virotherapy have shown encouraging results (13, 14). The efficiency of MV-based virotherapy is likely due to the lysis of tumor cells by the virus. However, a part of its efficiency may also be due to the capacity of MV-infected tumor cells to activate cells of the immune system, notably pDC. Indeed, activation of pDC by TLR agonist in tumor-bearing mice has been shown to induce an antitumor immune response and tumor regression (24, 25, 42). Liu and colleagues showed that murine pDC stimulated by a TLR9 agonist induced NK cell activation and recruitment to the tumor, triggering tumor antigen cross-presentation by CD11c<sup>+</sup> DC (25). Drobits and colleagues showed that topical treatment of melanoma tumors in mice with the TLR7 agonist, imiquimod, induced activation and recruitment of pDC into the tumor and caused tumor regression (24). They demonstrated that pDC acquire a cytotoxic activity against tumor cells by secreting TRAIL and granzyme B, in an IFNAR1-dependent mechanism. IFN- $\alpha$  secretion by pDC not only induces an antitumor cytotoxic activity on pDC by an autocrine loop, but can also act directly on tumor cells to induce apoptosis (43). Type-I IFN also plays a role in the NK activation and is required in a mouse model of NK-cell-dependent tumor rejection (44). Finally, these NK cells probably also participate in the initiation of the antitumor response by stimulating myeloid DC, since in IFNAR1- and STAT1-deficient mice the antitumor T cell response failed to develop (45, 46). Thus, our study shows that MV-infected tumor cells induce a high quantity of IFN- $\alpha$  by pDC, which may be favorable for the development of multicell subsets involved in an antitumor immune response. Furthermore, other oncolytic viruses known to activate pDC are being used in clinical trials of antitumor virotherapy, such as vaccinia (47), Herpes Simplex

Virus (48) and adenovirus (49). Tumor cells infected by these viruses may also be able to induce IFN- $\alpha$  production and tumor antigen cross-presentation by pDC.

MV-based antitumor virotherapy is a promising approach for treating cancer through the oncolytic activity of the virus. Furthermore, we show here that MV-infected tumor cells activate the maturation and tumor antigen cross-presentation capacities of human pDC. Thus, MV-based antitumor virotherapy may represent an interesting approach to the recruitment of pDC in the antitumor immune response.

### Acknowledgements

We thank Delphine Coulais and Clarisse Panterne for their technical assistance and the Platform of Clinical Transfer and Development for the PBMC and pDC facilities. We thank Philippe Hulin and the cellular and tissular core facility of Nantes University (MicroPiCell) for their expertise in confocal microscopy. We also thank Juliette Desfrancois and the core facilities of flow cytometry. We thank Dr Yves Delneste and Pascale Jeannin for their critical discussion of the manuscript.

### References

1. Blehacz B, Russell SJ. Measles virus as an oncolytic vector platform. *Curr Gene Ther.* 2008;8:162-75.
2. Boisgerault N, Tangy F, Gregoire M. New perspectives in cancer virotherapy: bringing the immune system into play. *Immunotherapy.* 2010;2:185-99.
3. Anderson BD, Nakamura T, Russell SJ, Peng KW. High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res.* 2004;64:4919-26.
4. Schneider U, von Messling V, Devaux P, Cattaneo R. Efficiency of measles virus entry and dissemination through different receptors. *J Virol.* 2002;76:7460-7.
5. Adams EM, Brown MC, Nunge M, Krych M, Atkinson JP. Contribution of the repeating domains of membrane cofactor protein (CD46) of the complement system to ligand binding and cofactor activity. *J Immunol.* 1991;147:3005-11.
6. Fishelson Z, Donin N, Zell S, Schultz S, Kirschfink M. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol.* 2003;40:109-23.
7. Gauvrit A, Brandler S, Sapede-Peroz C, Boisgerault N, Tangy F, Gregoire M. Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res.* 2008;68:4882-92.
8. Peng KW, TenEyck CJ, Galanis E, Kalli KR, Hartmann LC, Russell SJ. Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus. *Cancer Res.* 2002;62:4656-62.
9. Peng KW, Ahmann GJ, Pham L, Greipp PR, Cattaneo R, Russell SJ. Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus. *Blood.* 2001;98:2002-7.
10. McDonald CJ, Erlichman C, Ingle JN, Rosales GA, Allen C, Greiner SM, et al. A measles virus vaccine strain derivative as a novel oncolytic agent against breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;99:177-84.
11. Blehacz B, Splinter PL, Greiner S, Myers R, Peng KW, Federspiel MJ, et al. Engineered measles virus as a novel oncolytic viral therapy system for hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2006;44:1465-77.
12. Donnelly OG, Errington-Mais F, Steele L, Hadac E, Jennings V, Scott K, et al. Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther.* 2011. doi: 10.1038/gt.2011.205. [Epub ahead of print].

13. Heinzerling L, Kunzi V, Oberholzer PA, Kundig T, Naim H, Dummer R. Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses in vivo and targets interferon-resistant tumor cells. *Blood*. 2005;106:2287-94.
14. Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, Long HJ, Peethambaram PP, Barrette BA, et al. Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res*. 2010;70:875-82.
15. Msaouel P, Iankov ID, Dispenzieri A, Galanis E. Attenuated oncolytic measles virus strains as cancer therapeutics. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13:1732-41.
16. Kunzi V, Oberholzer PA, Heinzerling L, Dummer R, Naim HY. Recombinant measles virus induces cytolysis of cutaneous T-cell lymphoma in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol*. 2006;126:2525-32.
17. Grote D, Cattaneo R, Fielding AK. Neutrophils contribute to the measles virus-induced antitumor effect: enhancement by granulocyte macrophage colony-stimulating factor expression. *Cancer Res*. 2003;63:6463-8.
18. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:594-606.
19. Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Munz C, Liu YJ, et al. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood*. 2003;101:3520-6.
20. Di Pucchio T, Chatterjee B, Smed-Sorensen A, Clayton S, Palazzo A, Montes M, et al. Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat Immunol*. 2008;9:551-7.
21. Hoeffel G, Ripoche AC, Matheoud D, Nascimbene M, Escriou N, Lebon P, et al. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. 2007;27:481-92.
22. Lui G, Manches O, Angel J, Molens JP, Chaperot L, Plumas J. Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. *PLoS One*. 2009;4:e7111.
23. Mouries J, Moron G, Schlecht G, Escriou N, Dadaglio G, Leclerc C. Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood*. 2008;112:3713-22.
24. Drobits B, Holcman M, Amberg N, Swiecki M, Grundtner R, Hammer M, et al. Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J Clin Invest*. 2012;122:575-85.
25. Liu C, Lou Y, Lizee G, Qin H, Liu S, Rabinovich B, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J Clin Invest*. 2008;118:1165-75.
26. Gueugnon F, Leclercq S, Blanquart C, Sagan C, Cellerin L, Padiou M, et al. Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Pathol*. 2011;178:1033-42.
27. Adams S, Robbins FM, Chen D, Wagage D, Holbeck SL, Morse HC, 3rd, et al. HLA class I and II genotype of the NCI-60 cell lines. *J Transl Med*. 2005;3:11.
28. Coulais D, Panterne C, Fonteneau JF, Gregoire M. Purification of circulating plasmacytoid dendritic cells using counterflow centrifugal elutriation and immunomagnetic beads. *Cytotherapy*. 2012;14:887-96.
29. Fonteneau JF, Larsson M, Somersan S, Sanders C, Munz C, Kwok WW, et al. Generation of high quantities of viral and tumor-specific human CD4+ and CD8+ T-cell clones using peptide pulsed mature dendritic cells. *J Immunol Methods*. 2001;258:111-26.
30. Duhon T, Herschke F, Azocar O, Druelle J, Plumet S, Delprat C, et al. Cellular receptors, differentiation and endocytosis requirements are key factors for type I IFN response by human epithelial, conventional and plasmacytoid dendritic infected cells by measles virus. *Virus Res*. 2010;152:115-25.
31. Schlender J, Hornung V, Finke S, Gunthner-Biller M, Marozin S, Brzozka K, et al. Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus. *J Virol*. 2005;79:5507-15.
32. Reizis B, Colonna M, Trinchieri G, Barrat F, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: one-trick ponies or workhorses of the immune system? *Nat Rev Immunol*. 2011;11:558-65.
33. Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*. 2005;202:1131-9.
34. Fonteneau JF, Larsson M, Beignon AS, McKenna K, Dasilva I, Amara A, et al. Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol*. 2004;78:5223-32.

35. O'Brien M, Manches O, Sabado RL, Baranda SJ, Wang Y, Marie I, et al. Spatiotemporal trafficking of HIV in human plasmacytoid dendritic cells defines a persistently IFN- $\alpha$ -producing and partially matured phenotype. *J Clin Invest.* 2011;121:1088-101.
36. Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest.* 2005;115:3265-75.
37. Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, et al. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 2003;170:4465-74.
38. Schnurr M, Chen Q, Shin A, Chen W, Toy T, Jenderek C, et al. Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood.* 2005;105:2465-72.
39. Salio M, Palmowski MJ, Atzberger A, Hermans IF, Cerundolo V. CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens. *J Exp Med.* 2004;199:567-79.
40. Kool M, Geurtsvankessel C, Muskens F, Madeira FB, van Nimwegen M, Kuipers H, et al. Facilitated antigen uptake and timed exposure to TLR ligands dictate the antigen-presenting potential of plasmacytoid DCs. *J Leukoc Biol.* 2011;90:1177-90.
41. Jaehn PS, Zaenker KS, Schmitz J, Dzionek A. Functional dichotomy of plasmacytoid dendritic cells: antigen-specific activation of T cells versus production of type I interferon. *Eur J Immunol.* 2008;38:1822-32.
42. Palamara F, Meindl S, Holcmann M, Luhrs P, Stingl G, Sibilio M. Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J Immunol.* 2004;173:3051-61.
43. Thyrell L, Erickson S, Zhivotovsky B, Pokrovskaja K, Sangfelt O, Castro J, et al. Mechanisms of Interferon- $\alpha$  induced apoptosis in malignant cells. *Oncogene.* 2002;21:1251-62.
44. Swann JB, Hayakawa Y, Zerafa N, Sheehan KC, Scott B, Schreiber RD, et al. Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function. *J Immunol.* 2007;178:7540-9.
45. Diamond MS, Kinder M, Matsushita H, Mashayekhi M, Dunn GP, Archambault JM, et al. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med.* 2011;208:1989-2003.
46. Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM, et al. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8 $^{+}$  T cell responses through CD8 $\alpha^{+}$  dendritic cells. *J Exp Med.* 2011;208:2005-16.
47. Kim JH, Oh JY, Park BH, Lee DE, Kim JS, Park HE, et al. Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF. *Mol Ther.* 2006;14:361-70.
48. Kaufman HL, Bines SD. OPTIM trial: a Phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma. *Future Oncol.* 2010;6:941-9.
49. Ramesh N, Ge Y, Ennist DL, Zhu M, Mina M, Ganesh S, et al. CG0070, a conditionally replicating granulocyte macrophage colony-stimulating factor-armed oncolytic adenovirus for the treatment of bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12:305-13.

### Figure Legends

*Figure 1: MV receptor expression, MV infection sensitivity and survival of tumor cells and pDC.* (A) Expression of CD46 and CD150/SLAM on the surface of tumor cell lines (M18, Meso13 and A549) and pDC (mAb staining: grey histogram; Isotype control: white histogram; the values on histograms are the R-MFI, relative mean fluorescence intensity, defined as the mAb staining MFI divided by Isotype control MFI). (B) Infection of tumor cell lines (M18, Meso13 and A549) and pDC by MV-eGFP (MOI=1). (C) Infection of pDC by MV-eGFP (MOI=1), in the presence or absence of IL-3. (D) Infection of pDC by MV-eGFP with increasing MOI, in the presence or absence of IL-3. (E) Survival of tumor cell lines following MV infection or UV irradiation. Three days after infection or UV irradiation, cells were incubated with TO-PRO®3 which stains dead cells. Fluorescence was analyzed by flow cytometry. Results in Figures 1A, 1C and 1E are representative of three independent experiments. Results in Figures 1B and 1E reflect the mean of three independent experiments. Error bars represent the standard deviation.

*Figure 2: MV-infected tumor cells induce pDC maturation.* pDC were cultured for 18 hours with either IL-3, MV (MOI=1), MV and IL-3, R848, UV-irradiated- or MV-infected tumor cells. (A) Expression of CD83, CD86 and CD40 by pDC was measured by flow cytometry with a gate on CD123<sup>+</sup>/BDCA-4<sup>+</sup> cells. (B) Histograms were obtained from three independent experiments. A nonparametric Mann Whitney comparison test was used to determine the P value, which was obtained by comparison of the sample result with the IL-3 pDC result (\* p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\* p < 0.001).

*Figure 3: Phagocytosis of MV-infected or UV-irradiated tumor cells by pDC.* (A) MV-infected and UV-irradiated tumor cells were stained with PKH-67 and cocultured with pDC for 18 hours at 4°C or 37°C (1 DC:1 tumor cell). Cells were stained with HLA-DR-specific mAb. Fluorescence was analyzed by flow cytometry. This experiment is representative of four experiments. (B) Scatter plot representation of the four phagocytosis experiments. Error bars represent the standard deviation. (C) MV-infected tumor cells were stained with PKH-67 (green) and cocultured with pDC for 18 hours.



Cells were stained with HLA-DR-specific mAb (red). Fluorescence was analyzed by confocal microscopy.

*Figure 4: Production of IFN- $\alpha$  by pDC in response to MV is TLR7 dependent.* (A) pDC were cultured for 18 hours with IL-3, MV (MOI=1), MV and IL-3, R848, UV-irradiated- or MV-infected M18 or A549 tumor cells. IFN- $\alpha$  production was measured by ELISA in the culture supernatants. (B) pDC were cultured for 18 hours with or without IL-3 and increasing quantities of MV. IFN- $\alpha$  production was measured by ELISA in the culture supernatants. (C) pDC were cultured for 18 hours with IL-3 and MV (MOI=10), CpG-A or MV-infected M18, in the absence or presence of different concentrations of IRS661 (TLR7 inhibitor). IFN- $\alpha$  production was measured by ELISA in the culture supernatants. Results were obtained from three independent experiments.

*Figure 5: Cross-presentation of NYESO-1 by HLA-A\*0201+ pDC after coculture with NYESO-1+/HLA-A\*0201- M18 tumor cells infected with MV.* (A) Expression of NYESO-1 by M18 and A549 tumor cell lines determined by real-time PCR (n=3). (B) pDC were cultured for 18 hours with IL-3, R848, or UV-irradiated- or MV-infected M18 tumor cells. Some pDC cultured with R848 were pulsed with NYESO-1(157-165) peptide for 1 hour and washed. pDC were then cocultured for 6 hours with the M117.167 CD8+ T cell clone specific for HLA-A\*0201/NYESO-1(157-165) (defined as LT) in the presence of brefeldin A. Production of IFN- $\gamma$  by the M117.167 T cell clone was analyzed by flow cytometry after staining with CD8 and IFN- $\gamma$ -specific mAb. (C) pDC were cultured for 18 hours with R848, or UV-irradiated- or MV-infected M18 (NYESO-1<sup>+</sup>/HLA-A\*0201<sup>-</sup>) or A549 (NYESO-1<sup>+</sup>/HLA-A\*0201<sup>-</sup>) tumor cells. Some pDC cultured with R848 were pulsed with NYESO-1(157-165) peptide for 1 hour and washed. pDC were then cocultured for 6 hours with the M117.167 CD8+ T cell clone specific for HLA-A\*0201/NYESO-1(157-165) in the presence of brefeldin A. The production of IFN- $\gamma$  by the M117.167 T cell clone was analyzed by flow cytometry after staining with CD8- and IFN- $\gamma$ -specific mAb. (D) Scatter plot representation of cross-presentation experiments. "n" represent the

number of experiments performed. "n" is different from one condition to another, since we were not able to perform all controls in each experiment due to the limited quantity of available pDC.

#### **Supplemental Figure Legends**

*Supplemental Figure 1: infection of the mesothelioma cell line Meso13 by MV-eGFP.* Meso13 mesothelioma cell line was cocultured 2 hours with MV-eGFP and then washed (MOI=1). Sixteen hours later, fluorescence microscopy video was performed with a picture taken every 15 minutes with a time-lapse confocal microscope (Nikon).

*Supplemental Figure 2: absence of infection of pDC by MV-eGFP.* pDC were cocultured with MV-eGFP (MOI=1) in the presence of IL-3. Fluorescence microscopy video-recording was performed with a picture taken every 15 minutes with a time lapse confocal microscope (Nikon). One cell becomes infected after 12 hours.

**FIGURE 1**

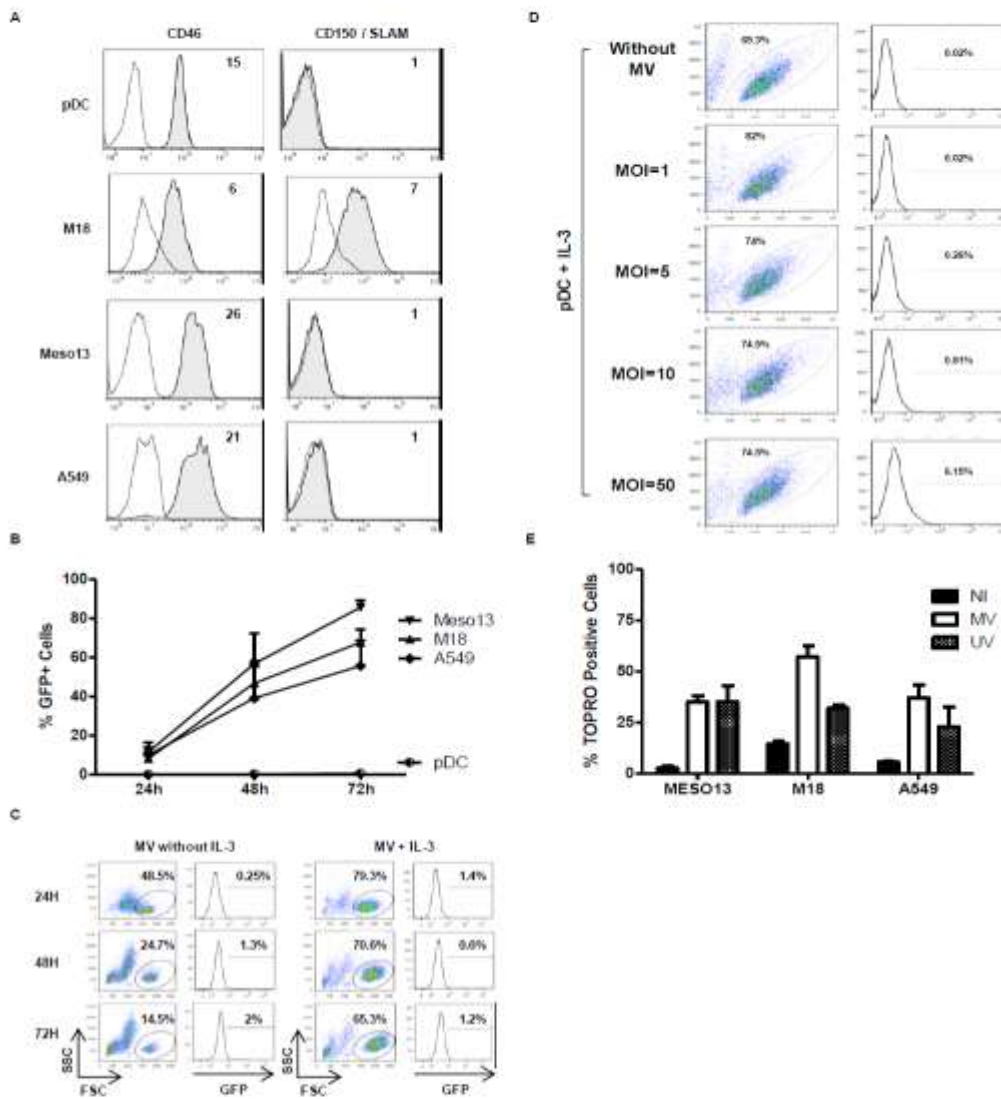


Figure 2

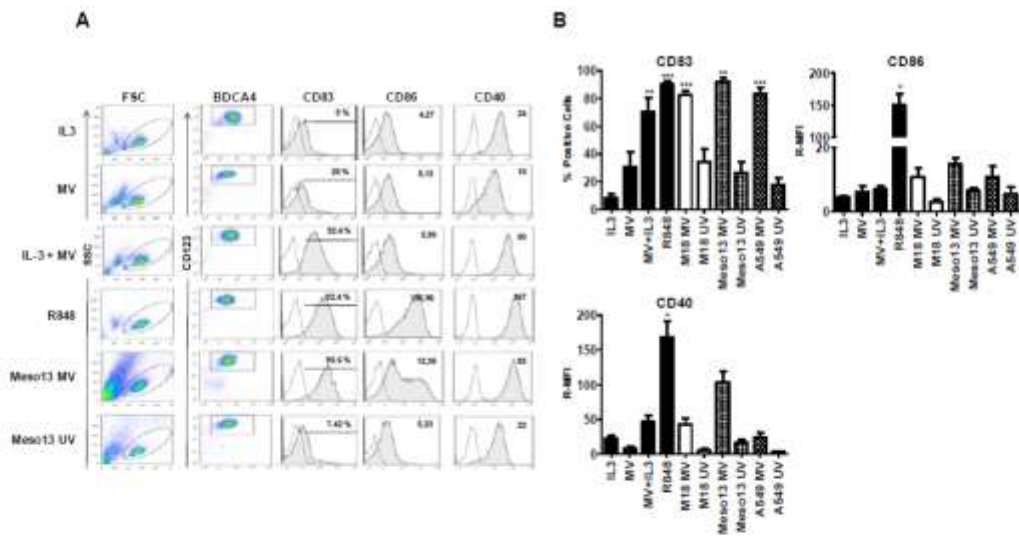


Figure 3

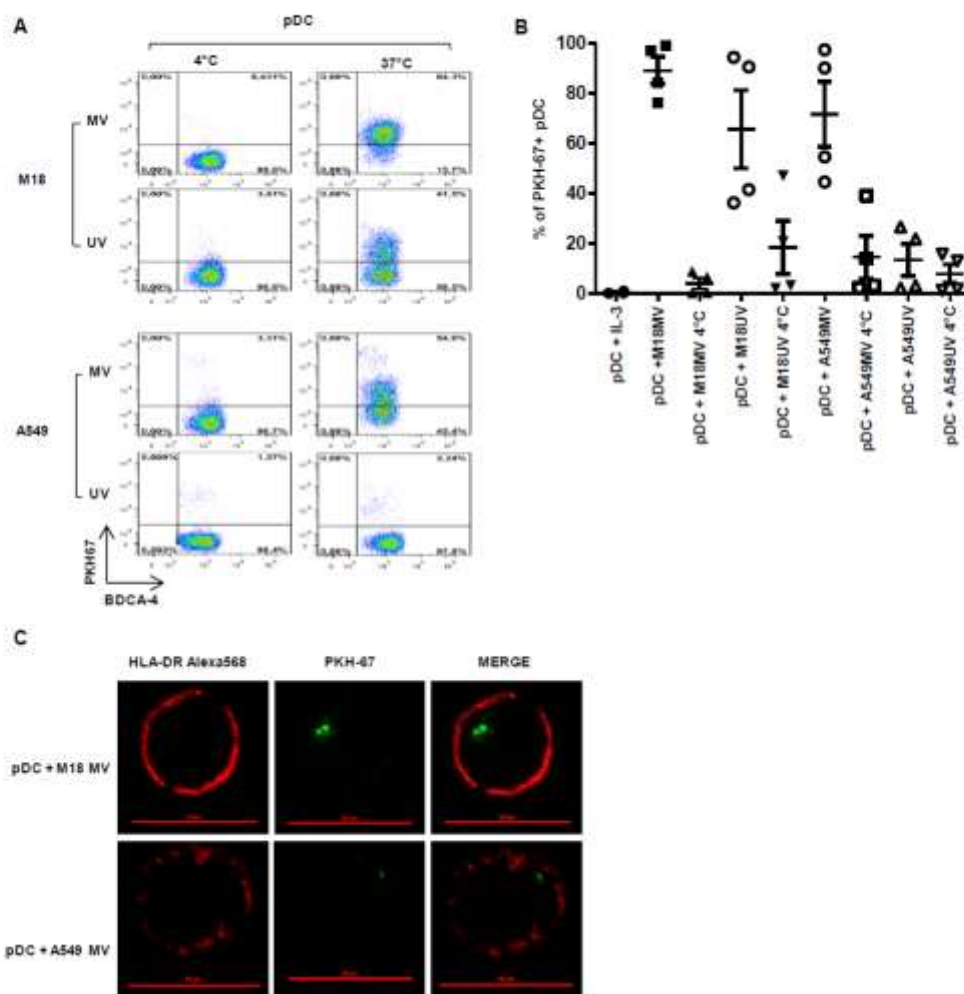


Figure 4

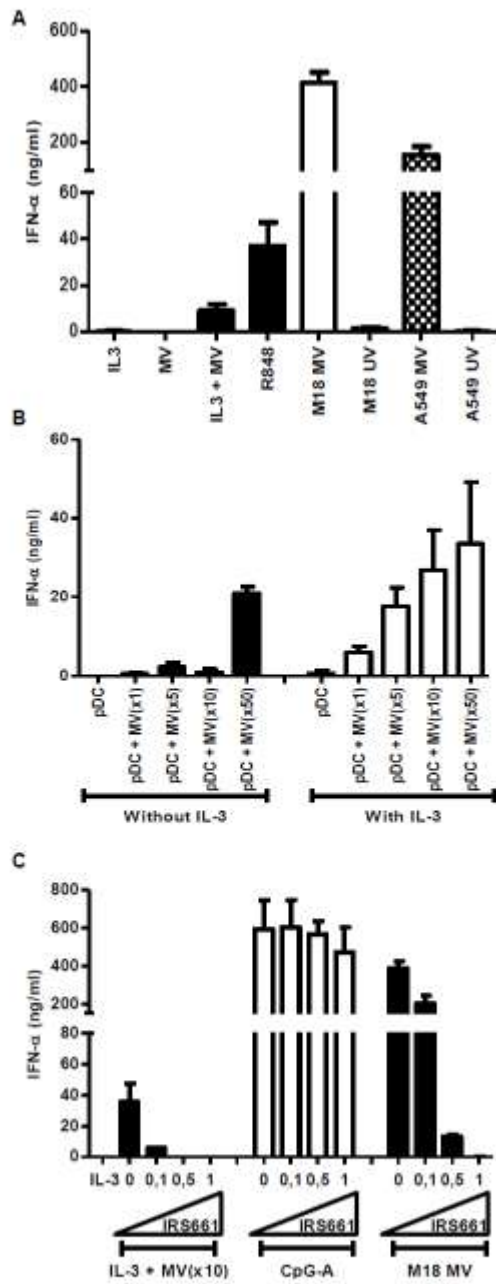
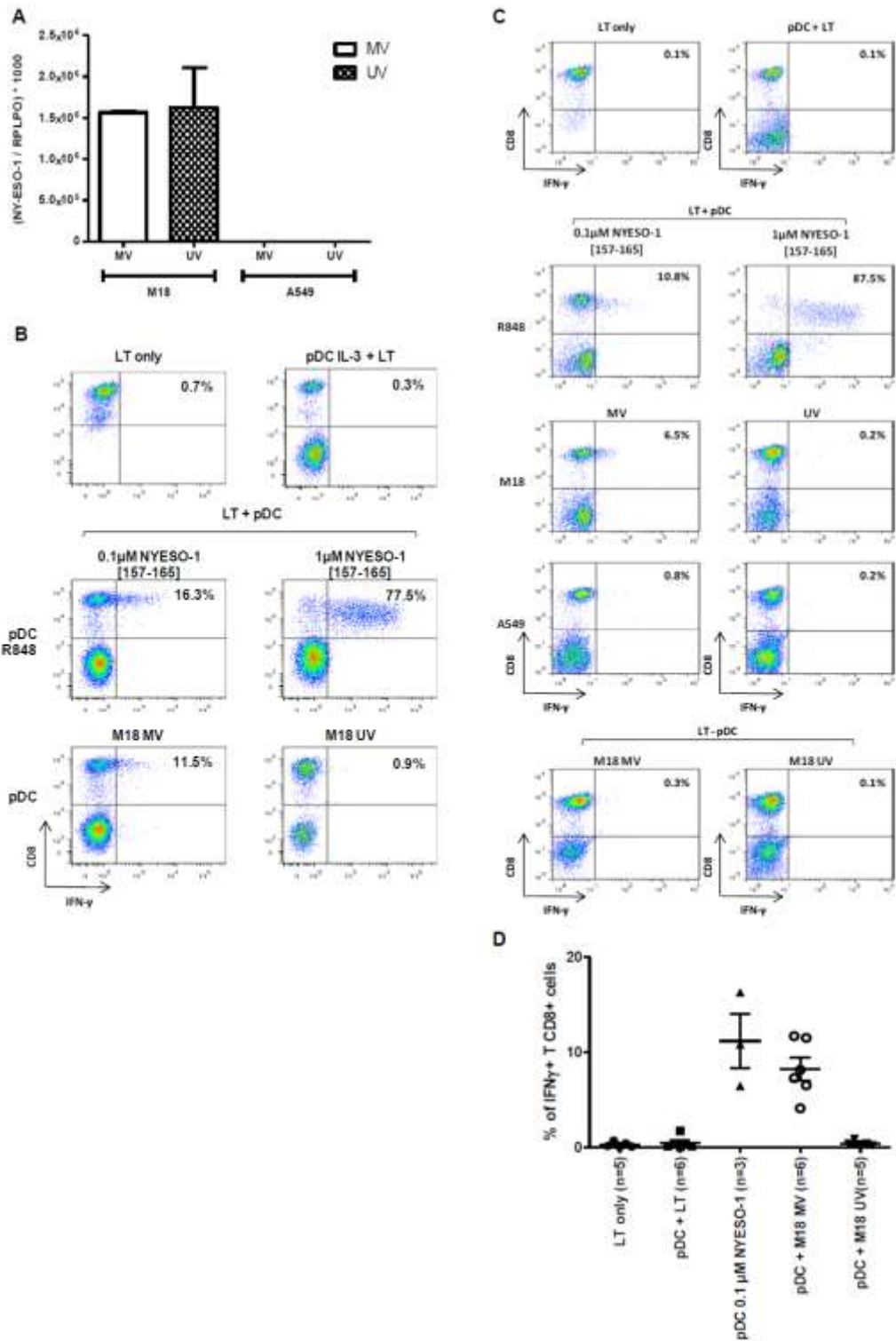


Figure 5



*Supplemental Figure 1: infection of the mesothelioma cell line Meso13 by MV-eGFP.* Meso13 mesothelioma cell line was co-cultured with MV-eGFP (MOI=1). 16 hours later, fluorescence microscopy video was performed with a picture taken every 15 minutes with a time lapse confocal microscope (Nikon).

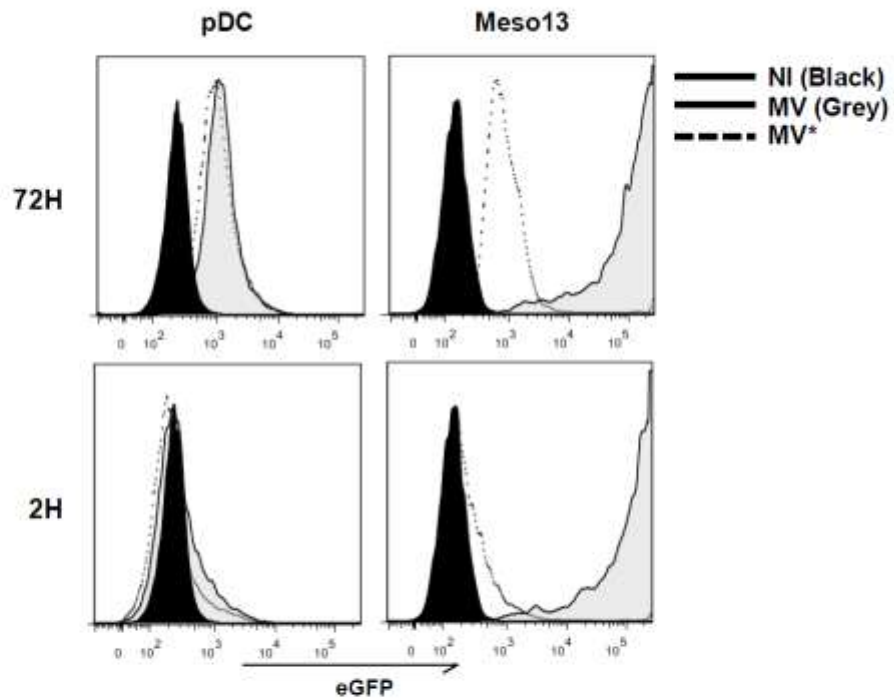
**VIDEO**

*Supplemental Figure 2: absence of infection of pDC by MV-eGFP.* pDC were co-cultured with MV-eGFP (MOI=1) in presence of IL-3. Fluorescence microscopy video was performed with a picture taken every 15 minutes with a time lapse confocal microscope (Nikon)

**VIDEO.**

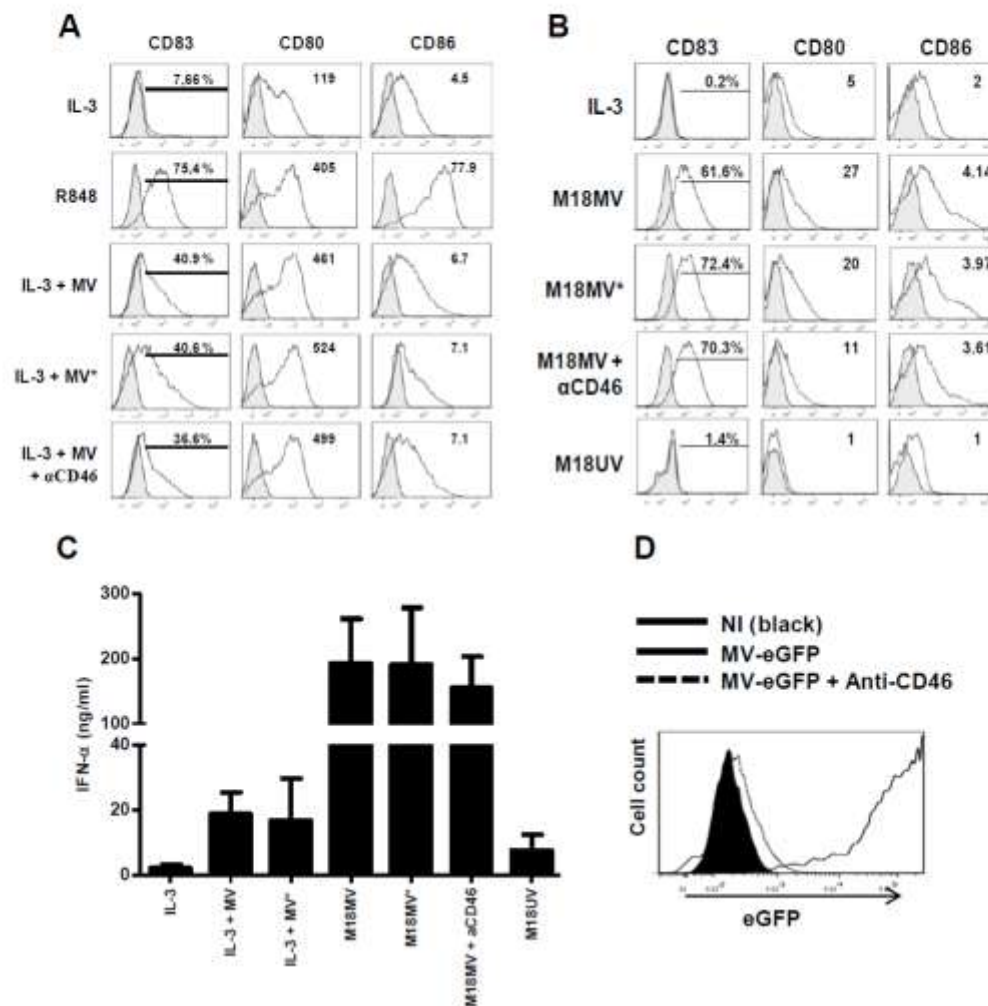


## Supplemental Figure 3

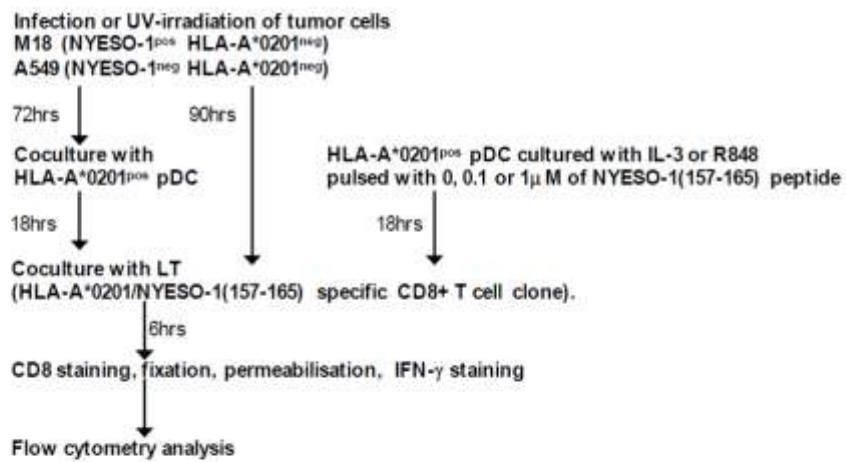


Supplemental figure 3: Infection of pDC by MV-eGFP or UV-irradiated MV-eGFP: pDC in presence of IL-3 or Meso13 cells were cultured alone (NI) or with MV-eGFP (MV) or UV-irradiated (312nm – 100kj/m<sup>2</sup>) MV-eGFP (MV\*) at MOI=50 during 72hrs (upper panel) or during 2hrs and then cultured during 70hrs (lower panel). Fluorescence was analyzed by flow cytometry.

## Supplemental Figure 4

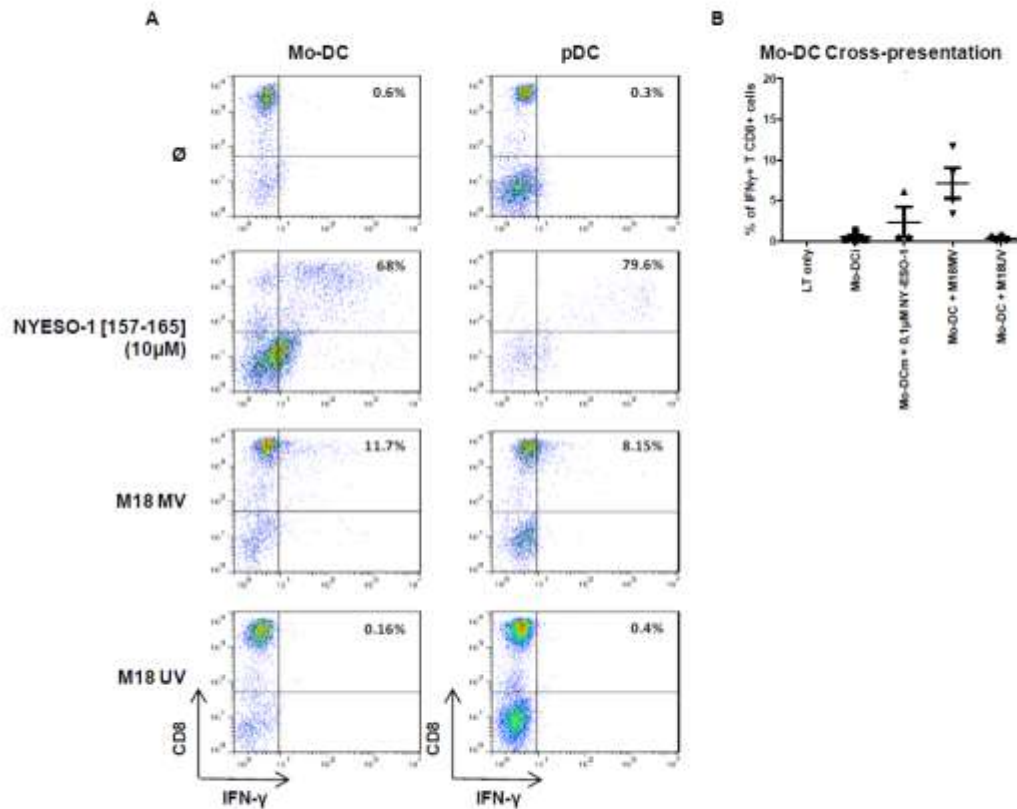


Supplemental Figure 4: Activation of pDC in response to MV-infected tumor cells is independent of MV replication in pDC and infection by CD46. (A) pDC were cultured with IL-3 alone, R848, IL-3/MV-eGFP (MV), IL-3/MV-eGFP with 10 $\mu$ g/ml of anti-CD46 or IL-3/UV-irradiated MV-eGFP (MV\*) at MOI=1 during 18hrs. Expression of CD83, CD80 and CD86 by pDC was determined by flow cytometry. (B) pDC were cultured with IL-3, UV-irradiated M18, MV-infected M18 (M18MV) in presence or absence of 10 $\mu$ g/ml of anti-CD46 (Hycult biotech), or MV-infected M18 irradiated by UV before exposition to pDC (M18MV\*). Expression of CD83, CD80 and CD86 by pDC (gate on BDCA-4+/HLA-DR+ cells) was determined by flow cytometry. (C) IFN- $\alpha$  production by pDC measured by ELISA. (D) MV-eGFP infection inhibition of M18 by 10 $\mu$ g/ml of anti-CD46 monoclonal antibody after 72hrs of culture.

**Supplemental Figure 5**

*Supplemental Figure 5: schematic of the culture conditions used in the cross-presentation experiments.*

## Supplemental Figure 6



*Supplemental Figure 6: Monocyte-derived DC exhibit a similar level of NYESO-1 cross-presentation compared to pDC. (A) on day0, pDC and monocytes from a single donor were purified. pDC were frozen and monocytes cultured with IL-4 and GM-CSF. On day 5, pDC were thawed. pDC and monocyte-derived DC were cultured alone or with UV-irradiated M18 (M18UV) or MV-infected M18 (M18MV) for 18hrs. On day6, DC were cultured with the NYESO-1 specific CD8+ T cell clone during 6hrs in presence of brefeldinA. Cells were then stained with anti-CD8+ antibody, fixed, permeabilized and stained with IFN- $\gamma$  specific antibody. IFN- $\gamma$  secretion by the the T cell clone was analyzed by flow cytometry. We conclude that level of cross-presentation was somewhat similar between the two cell types. It was a little bit weaker for pDC, but these cells have been frozen, whereas Monocyte-derived DC were not. (B) scatter plot representation of three cross-presentation experiments performed with monocyte-derived DC. Error bars represent standard deviation*

## **Etude et modulation des réponses T dirigées contre le Mésothéliome Pleural Malin**

Le mésothéliome pleural malin (MPM) est un cancer très agressif. Les traitements usuels restent inefficaces. Il y a donc un besoin de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi elles, l'immunothérapie est une nouvelle piste de recherche. Afin de développer cette approche de manière spécifique, il est nécessaire d'identifier des cibles antigéniques. La protéine MUC1 surexprimée dans le MPM est un antigène candidat d'intérêt. J'ai montré que toutes les lignées HLA-A\*0201+ de MPM expriment cet antigène et peuvent être reconnues et tuées par un clone T CD8+ spécifique de MUC1. J'ai également démontré que le niveau de glycosylation de MUC1, n'est pas impliqué dans la reconnaissance de cet epitope. En parallèle, l'équipe du Dr. Marc Grégoire travaille sur des drogues épigénétiques permettant de tuer spécifiquement les cellules tumorales, mais également de moduler l'expression des antigènes de tumeur. L'impact de ces drogues sur l'expression de MUC1 a alors été étudié. J'ai démontré que ces drogues épigénétiques, en particulier les iHDAC, provoquaient l'inhibition de l'expression de MUC1, au contraire de NY-ESO-1 qui lui était induit. Cette modulation de l'expression des antigènes de tumeurs, conduit alors à une modulation de la reconnaissance des cellules de MPM traitées par les clones T spécifiques de MUC1 ou NY-ESO-1. Ces résultats démontrent 1) que la protéine MUC1 est un antigène du MPM pouvant être ciblé en immunothérapie, 2) que les agents épigénétiques peuvent moduler positivement ou négativement l'expression d'antigènes de tumeurs d'où l'importance du choix de l'antigène cible si ces traitements épigénétiques sont combinés à de l'immunothérapie spécifique.

Mots-clés : Cancer ; immunothérapie ; MUC1 ; drogues épigénétiques, NY-ESO-1, iHDAC, mésothéliome

## **Study and modulation of T cell response against Pleural Mesothelioma**

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a highly aggressive cancer. The usual treatments are ineffective. Therefore there is a need to find new therapeutic strategies. Among them, immunotherapy is an interesting approach. To develop this strategy, it is necessary to identify antigenic targets. The MUC1 protein is overexpressed in MPM and an interesting candidate antigen. I showed that all MPM cell lines express this antigen and can be recognized and killed by a specific CD8 + T clone. I also found that glycosylation level of MUC1 is not involved in the recognition of this epitope. Dr. Marc Grégoire team works on epigenetic drugs, to specifically kill tumor cells, but also to modulate tumor antigens expression. I studied the impact of these drugs on the expression of MUC1. I showed that these epigenetic drugs, especially iHDAC inhibit the expression of MUC1, in contrast to NY-ESO-1 that was induced. This modulation of tumor antigens expression then leads to a modulation of the treated MPM cell lines recognition by MUC1 or NY-ESO-1 specific T cell clones. These results demonstrate 1) that MUC1 is an antigen of MPM that can be targeted in immunotherapy 2) epigenetic agents can modulate positively or negatively the expression of tumor antigens highlighting the importance of the choice of targeted antigen if these epigenetic drugs are combined with specific immunotherapy treatment.

Key words: Cancer; immunotherapy; MUC1; epigenetic drugs, NY-ESO-1, iHDAC, mesothelioma