

**UNIVERSITE DE NANTES**  
**FACULTE DE PHARMACIE**

---

**Optimisation des méthodes de sélection  
et de stimulation des lymphocytes T CD8  
spécifiques de mélanome**

Thèse de Doctorat

École Doctorale : Biologie-Santé

Discipline : Biologie, Médecine, Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Régis BOUQUIE**

Le 23 janvier 2009, devant le jury ci-dessous

Président : **Mme Francine JOTEREAU**, Professeur des Universités, Nantes  
Rapporteurs : **M. Eric ROBINET**, Chargé de Recherches, Strasbourg  
**M. Eric TARTOUR**, Professeur des Universités, Paris  
Directeur de Thèse **M. François LANG**, Professeur des Universités, Nantes

Inserm Unité 892

# Table des matières

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>6</b>
<b>I. La réponse des lymphocytes T <math>\alpha\beta</math> CD8 .....</b>	<b>8</b>
<b>A. Initiation : la reconnaissance antigénique .....</b>	<b>9</b>
1) Les molécules du CMH de classe I .....	10
2) Le récepteur des lymphocytes T $\alpha\beta$ : TCR .....	13
3) Le co-récepteur CD8 .....	16
4) Les molécules de co-stimulation .....	17
5) La synapse immunologique et la transmission du signal d'activation .....	35
<b>B. La phase d'expansion clonale .....</b>	<b>38</b>
<b>C. Phase de contraction clonale : homéostasie et apoptose .....</b>	<b>41</b>
1) Les acteurs de l'apoptose .....	42
2) Les mécanismes moléculaires de l'apoptose .....	45
3) Le contrôle de la réponse immunitaire .....	47
<b>D. Génération du répertoire mémoire .....</b>	<b>48</b>
1) Différenciation des lymphocytes T mémoires .....	49
2) Classification des sous-populations lymphocytaires .....	51
3) Cytokines et Homéostasie des cellules mémoires .....	57
<b>II. Le mélanome .....</b>	<b>61</b>
<b>A. Données épidémiologiques .....</b>	<b>61</b>
<b>B. Facteurs de risque .....</b>	<b>62</b>
1) Les facteurs de risque constitutionnels: .....	62
2) Les facteurs de risque extrinsèques : .....	63
<b>C. Classification .....</b>	<b>63</b>
1) Classification anatomo-clinique des mélanomes cutanés .....	63
2) Classification histologique des mélanomes cutanés .....	64
3) Les mélanomes non cutanés .....	66
<b>D. Facteurs pronostiques des mélanomes cutanés .....</b>	<b>67</b>
1) Histologiques .....	67
2) Non histologiques .....	68
<b>E. Altérations génétiques impliquées dans l'apparition des mélanomes .....</b>	<b>68</b>
1) Voies de signalisation perturbées .....	69
2) Susceptibilité génique et les différentes formes de mélanomes .....	74
<b>F. Prise en charge conventionnelle .....</b>	<b>77</b>
1) Traitement chirurgical .....	77
2) Traitements systémiques .....	77
3) Efficacité des traitements systémiques .....	79
<b>III. L'immunothérapie du mélanome .....</b>	<b>81</b>
<b>A. L'immunothérapie active ou vaccination thérapeutique .....</b>	<b>83</b>
1) Les vaccins peptidiques ou protéiques .....	84
2) La vaccination par cellules tumorales : .....	85
3) La vaccination par protéines de choc thermique : .....	85
4) Injection de cellules présentatrices chargées : .....	86

5) Vaccination par plasmides ou vecteurs viraux :.....	87
<b>B. L'immunothérapie adoptive .....</b>	<b>88</b>
1) Injection de TIL.....	89
2) Injection de populations enrichies en lymphocytes T CD8 spécifiques.....	91
3) Injection de clones .....	92
4) Transfert de lymphocytes modifiés génétiquement.....	94
<b>IV. Projet de recherche et objectif du travail .....</b>	<b>96</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>99</b>
<b>I. Développement d'une technique de tri utilisable en clinique .....</b>	<b>100</b>
<b>A. Choix de la source de cellule spécifique de Melan-A .....</b>	<b>100</b>
1) Efficacité du tri immuno-magnétique.....	101
2) Répertoire des populations triées .....	102
3) Etude fonctionnelle des cellules triées .....	103
4) Conclusion et perspectives .....	105
<b>B. Développement d'une technique de tri utilisable en clinique.....</b>	<b>108</b>
1) préparation des multimères HLA/peptide.....	108
2) Comparaison de l'efficacité des tris réalisés avec les billes M450-AvT ou M280 <sub>s</sub> .....	114
3) Etude de l'apoptose induite par les multimères M450-AvT vs M280.....	122
4) Activation de la production de cytokines par les différents multimères .....	125
5) Analyse de l'avidité de sous-familles V $\beta$ triées par les différents multimères.....	127
6) Analyse de l'apoptose induite par les multimères sur les sous-familles de V $\beta$ .....	130
<b>II. Stimulation de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A à l'aide de protéines recombinantes.....</b>	<b>132</b>
<b>A. Calibration des billes .....</b>	<b>133</b>
1) Billes HLA/CD28 .....	133
2) Billes HLA/4-1BBL.....	135
3) Billes HLA .....	136
<b>B. Les lymphocytes .....</b>	<b>137</b>
1) Obtention des cellules .....	137
2) Caractérisation des cellules à J0.....	137
<b>C. Principe de l'amplification .....</b>	<b>138</b>
1) Quand fournir le signal 4-1BBL .....	138
2) Co-stimulation par le 4-1BBL : 1 <sup>ère</sup> ou 2 <sup>ème</sup> stimulation .....	141
3) Durée de stimulation par les billes .....	142
4) Schémas final d'amplification .....	144
<b>D. Analyse des amplifications obtenues chez le donneur sain .....</b>	<b>145</b>
1) 1 <sup>ère</sup> stimulation : HLA/CD28 .....	145
2) 2 <sup>ème</sup> stimulation.....	148
3) Commentaires - conclusion .....	153
<b>E. Malades .....</b>	<b>154</b>
1) Description des cellules à J0.....	154
2) Comparaison des stimulations HLA, HLA/CD28, HLA/4-1BBL.....	156
<b>DISCUSSION ET PRESPECTIVES.....</b>	<b>163</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>183</b>
1) Culture cellulaire.....	184
2) Cytométrie de flux .....	186
3) Cytotoxicité .....	188
4) Mise en évidence de l'apoptose .....	188
5) Analyse Statistique.....	189
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>190</b>

## Figures

Figure 1 : Structure 3D des molécules de CMH de classe I.....	11
Figure 2 : Production de complexes CMH-peptide recombinants.....	13
Figure 3 : structure du complexe TCR/CD3.....	14
Figure 4 : la synapse immunologique mature (Huppa et coll. 2003).....	37
Figure 5 : événements intracellulaires de transduction du signal d'activation.....	38
Figure 6 : Les voies de l'apoptose.....	47
Figure 7 : modèle de différenciation des LT mémoire de Hamann.....	53
Figure 8 : modèle de différenciation des LT mémoire de Appay et al.....	54
Figure 9 : différentes populations de lymphocytes T CD8+.....	55
Figure 10 : exposition antigénique chronique.....	57
Figure 11 : Evolution de l'expression des récepteurs aux cytokines.....	60
Figure 12 : Progression tumorale et classification de Breslow et de Clark.....	65
Figure 13 : la progression du mélanome.....	75
Figure 14 : Pureté des tris de cellules spécifiques issues de trois sources différentes.....	102
Figure 15 : Analyse du répertoire des populations triées.....	103
Figure 16 : Avidité des populations triées.....	104
Figure 17 : Avidité des lymphocytes T V $\beta$ 8 et V $\beta$ 14 spécifiques de Melan-A.....	105
Figure 18 : Etapes de la construction du plasmide pHN1-HLA-A*0201-AvT.....	110
Figure 19 : Sensorgrammes.....	111
Figure 20 : Résultats de l'alanine-scan.....	112
Figure 21 : Calibration des billes M450 et M280.....	114
Figure 22 : Résultats des tris Melan-A.....	116
Figure 23 : Etude de répertoire des populations Melan-A triées.....	117
Figure 24 : Analyse fonctionnelle des tris Melan-A.....	118
Figure 25 : Tris NA17-A et gp100.....	121
Figure 26 : Calibration des billes M280.....	123
Figure 27 : Apoptose induite par les billes.....	124
Figure 28 : Mesure de l'activité des caspases.....	125
Figure 29 : Mesure de la sécrétion de cytokines.....	126
Figure 30 : caractéristiques des populations des patients 1#2 et 3.....	128
Figure 31 Résultats des tris V $\beta$ .....	129
Figure 32 : Index de stimulation des sous-familles V $\beta$ .....	131
Figure 33 : Calibration HLA/CD28.....	135
Figure 34: Calibration HLA/4-1BB ligand.....	136
Figure 35 : Donneurs sains :analyse phénotypique à J0.....	138
Figure 36 : stabilité du 4-1BBL recombinant à la surface des billes.....	141
Figure 37 :co-stimulation par le 4-1BB ligand : 1 <sup>ère</sup> ou 2 <sup>nde</sup> stimulation.....	142
Figure 38 : durée de stimulation par les billes.....	143
Figure 39 : Principe de l'amplification des lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A.....	144
Figure 40 : Nombre de cellules spécifiques, donneurs sains, 1 <sup>ère</sup> stimulation.....	146
Figure 41 : 1 <sup>ère</sup> stimulation des donneurs sains : % spécifiques.....	147
Figure 42 : 1 <sup>ère</sup> stimulation des donneurs sains : %CD28.....	148
Figure 43 : 2 <sup>nde</sup> stimulation des donneurs sains : marquage CD28/T.....	150
Figure 44 : donneurs sains : évolution du nombre de cellules spécifiques.....	151
Figure 45 : Evolution du CD28 entre J14 et J28 chez les donneurs sains.....	152
Figure 46 : taux d'amplification chez les donneurs sains.....	153
Figure 47 : Caractérisations des cellules de patients à J0.....	155
Figure 48 : Evolution du nombre de cellules spécifiques chez les malades.....	157
Figure 49 : Evolution du CD28 chez les patients.....	158
Figure 50 : Evolution du CD28 chez les malades.....	158
Figure 51 : taux d'amplification obtenus chez les patients.....	159
Figure 52 : Expression du CD27 chez les patients.....	160
Figure 53 : expression du CD27 et du CD28 chez les patients.....	161

Figure 54 : analyse phénotypiques des cellules spécifiques.....	161
Figure 55 : Fixation des monomères sur les billes M450-AvT et M280.....	168
Figure 56 : Corrélation apoptose / activation.....	170
Figure 57 : analyse de l'expression de Bcl-XL.....	180
Figure 58 : schéma de différenciation linéaire et intervention du 4-1BB ligand.....	181

## Tableaux

Tableau 1 : Classification des phototypes.....	63
Tableau 2 : Classification TNM des mélanomes.....	66
Tableau 3 : Marges d'exérèses recommandées en fonction de l'indice de Breslow .....	77
Tableau 4 : Résultats des tris .....	115
Tableau 5 : caractérisation des cellules de donneurs sains à J0.....	138
Tableau 6 : Il-15 et expression du 4-1BB.....	140
Tableau 7 : donneurs sains : première stimulation.....	146
Tableau 8 : 1 <sup>re</sup> stimulation des donneurs sains : %CD28.....	148
Tableau 9 : 2 <sup>de</sup> stimulation des donneurs sains : nombre de cellules spécifiques .....	149
Tableau 10 : Caractérisations des cellules de patients à J0.....	155
Tableau 11 : nombre de cellules spécifiques obtenues chez les malades .....	156
Tableau 12 : Expression du CD27 chez les patients.....	160
Tableau 13 : Liste des anticorps utilisés. ....	187

# **INTRODUCTION**

Le système immunitaire assume l'une des grandes fonctions physiologiques des Vertébrés : protéger l'organisme contre les agents qui pourraient nuire à son intégrité. Cette protection est basée autant sur sa capacité à reconnaître un nombre prodigieux de structures moléculaires différentes (antigènes) que sur son aptitude à distinguer le soi du « non-soi ». Le développement d'une réponse immunitaire à toute agression antigénique se traduit par l'activation de deux systèmes de défense qui coopèrent entre eux : une réponse spécifique ou adaptative et une réponse innée ou naturelle. La réponse immunitaire innée constitue une première ligne de défense, elle est rapidement mise en œuvre et n'implique pas de reconnaissance spécifique de l'antigène. Si elle ne parvient pas à éliminer totalement l'élément étranger, un système complexe de coopération permet au système spécifique de s'activer. Ce dernier dispose alors de deux moyens d'action impliquant les réponses à médiation humorale et à médiation cellulaire. L'immunité humorale est principalement représentée par les immunoglobulines secrétées par les plasmocytes issus de la différenciation des lymphocytes B. La fonction de ces anticorps est d'inactiver les microorganismes présents dans les compartiments liquidiens de l'organisme, mais ils peuvent également jouer un rôle dans la lyse des cellules cibles. Cependant de nombreux agents indésirables ont la capacité d'échapper à l'immunité humorale, c'est alors l'immunité cellulaire spécifique qui prend le relais. De nombreux acteurs cellulaires et moléculaires participent à l'immunité cellulaire, parmi eux on distingue les cellules présentatrices d'antigène (CPA), capables de capturer les antigènes afin de les présenter aux lymphocytes T spécifiques. Ces derniers, une fois activés, seront capables de lyser la cellule cible, pour la sous-population CD8+, ou de réguler la réponse immunitaire spécifique, pour la sous-population CD4+.

Les connaissances toujours accrues de l'organisation du système immunitaire ont fait imaginer à Burnet (Burnet 1970) le concept d'immunosurveillance des tumeurs basé sur l'idée que le système immunitaire, grâce à sa capacité à reconnaître les cellules tumorales, pourrait intervenir pour prévenir l'apparition des tumeurs et limiter leur croissance. Depuis, de nombreuses preuves expérimentales se sont accumulées pour valider ce concept, puisque des lymphocytes spécifiques d'antigènes tumoraux ont été retrouvés dans le sang circulant et les ganglions ou infiltrant directement les tumeurs (Mackensen et coll. 1994; Dahl et coll. 2008).

Néanmoins, il existe des circonstances dans lesquelles le système immunitaire n'est pas capable d'empêcher le développement d'un agent pathogène ou d'une cellule

cancéreuse dans l'organisme. Il peut s'agir d'une question de rapidité, dans ce cas, la réponse immunitaire est dépassée par les capacités de prolifération de l'agent pathogène (infections virales ou bactériennes). Mais cela peut également être dû à un dysfonctionnement du système immunitaire, qui peut être compromis par l'agent infectieux lui-même, comme c'est le cas pour le VIH. Dans le cas de certains cancers, la tumeur est capable de combattre, voire de paralyser le système immunitaire, il peut s'agir de mécanismes d'échappement passif (perte des molécules de CMH par les cellules tumorales), mais également de phénomène actif (comme la sécrétion de facteurs solubles immuno-régulateurs). Ainsi dans la plupart des cas, les lymphocytes T effecteurs sont absents ou en nombre insuffisant. Aussi, les scientifiques et le corps médical ont mis en œuvre des stratégies thérapeutiques afin de pallier les déficits du système immunitaire. Ces stratégies sont regroupées sous le terme d'immunothérapie. On distingue 2 types d'immunothérapies : l'immunothérapie active qui consiste à fournir à l'organisme une source d'antigène non pathogène, afin de sensibiliser le système immunitaire ; et l'immunothérapie passive ou adoptive qui repose sur l'injection directe d'effecteurs qui peuvent être soit des anticorps soit des cellules.

## **La réponse des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8**

Les lymphocytes T se différencient dans le thymus, à partir de cellules souches lymphoïdes dérivant de cellules souches hématopoïétiques. De ces cellules souches lymphoïdes dérivent les lymphocytes T et B. Alors que les progéniteurs B se développeront dans la moelle, les progéniteurs T vont être attirés vers le thymus par un facteur chimotactique sécrété par les cellules épithéliales thymiques. Cette migration vers le thymus a lieu vers la 8e ou 9e semaine de gestation chez l'Homme. Les précurseurs thymiques précoces qui colonisent le thymus peuvent se différencier en cellules NK et NKT, en cellules dendritiques et lignées T $\gamma\delta$  et T $\alpha\beta$  (Révillard et coll. 2001; Lefranc 2002).

À la différence des autres cellules de l'organisme, les lymphocytes T se différencient en deux phases. Une première phase de différenciation des précurseurs T a lieu dans le thymus, suite à l'interaction du TCR avec des molécules du soi associées au CMH. Elle est corrélée aux réarrangements des gènes des récepteurs d'antigènes, le TCR, et à l'expression des marqueurs membranaires. La seconde aura lieu en périphérie, dans

les organes lymphoïdes secondaires. Elle va dépendre d'un signal activateur induit par la reconnaissance d'un complexe CMH/peptide du non soi par le TCR.

Les lymphocytes T matures quittent le thymus et passent dans la circulation sanguine. Une partie d'entre eux circule de façon continue entre le sang et la lymphe, les autres vont se localiser dans les ganglions lymphatiques grâce à l'expression de molécules d'adressage leur permettant de migrer vers ces structures, les principales sont :

- Le **CD62L** : une glycoprotéine fortement exprimée par les cellules T naïves, elle reconnaît des motifs glycosylés portés par les endothéliums vasculaires (Springer et coll. 1991).
- Le **CCR7** est un récepteur de chimiokines exprimé par les lymphocytes T naïfs. Son ligand principal est une chimiokine soluble, produite et adsorbée par les cellules endothéliales des veinules des ganglions (Förster et coll. 1999).
- Le CD62L et le CCR7 sont impliqués dans l'adhésion des lymphocytes à l'endothélium vasculaire, mais ne permettent pas le passage des cellules à travers la barrière endothéliale (Kannagi 2002). Pour que cela soit possible, il faut l'intervention de :
- **LFA-1** (*Leukocyte Function Antigen-1*) qui est exprimée par tous les lymphocytes T. LFA-1 en se liant à ICAM-1, ICAM-2 et ICAM-3 (*IntraCellular Adhesion Molecule*) permet le passage des lymphocytes T entre deux cellules endothéliales (diapédèse) ou en transcellulaire (empéripolérés)(Millán et coll. 2006).

Lorsque les lymphocytes rencontreront une cellule présentatrice d'antigène exprimant le complexe CMH/peptide correspondant, les lymphocytes T vont s'activer, se différencier en effecteurs cytotoxiques, proliférer puis subir une contraction clonale. Une proportion de lymphocytes activés se différenciera en lymphocytes T mémoires.

### **Initiation : la reconnaissance antigénique**

Les lymphocytes T sont des acteurs essentiels de la réponse immune spécifique. Les travaux de Zinkernagel et Doherty ont montré que les lymphocytes T CD8  $\alpha\beta$  reconnaissent l'antigène en association avec une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Zinkernagel et coll. 1974). Une dizaine d'années plus tard, il a été établi que le ligand antigénique reconnu par les lymphocytes est formé d'un

fragment peptidique logé dans une molécule de CMH (Babbitt et coll.). Ainsi la reconnaissance de l'antigène résulte de l'interaction du récepteur du lymphocyte (TCR) avec le complexe CMH-peptide présent à la surface de la cellule présentatrice d'antigène.

### **Les molécules du CMH de classe I**

#### **Structure des molécules du CMH de classe I**

Les molécules de CMH de classe I sont des glycoprotéines membranaires hétérodimériques exprimées sur toutes les cellules nucléées et les plaquettes. Elles sont constituées d'une chaîne lourde  $\alpha$  polymorphe ancrée dans la membrane (44-45kDa) et associée à une chaîne invariante non glycosylée et libre : la  $\beta$ 2 microglobuline ( $\beta$ 2m, 12kDa). Chez l'homme, trois loci majeurs multialléliques appelés HLA A, B, C sont à l'origine de l'expression de la chaîne lourde. Les deux allèles de chaque locus sont exprimés de manière co-dominante, ce qui fait qu'un individu peut exprimer six molécules de classe I différentes. Cette chaîne lourde appartient à la famille des immunoglobulines, elle est constituée de trois domaines extra-cellulaires  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 et  $\alpha$ 3, d'une région transmembranaire et d'une portion intra-cytoplasmique. Le polymorphisme est essentiellement porté par les domaines  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2, qui sont impliqués dans la présentation antigénique. Ils forment un sillon constitué de deux hélices  $\alpha$  anti-parallèles reposant sur un plancher  $\beta$  (Bjorkman 1997). Dans le sillon vient se loger le peptide antigénique (cf. *Figure 1*).

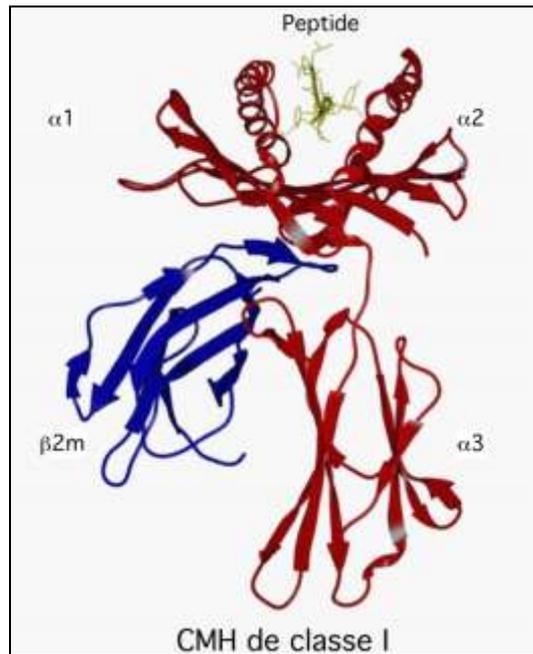


Figure 1 : Structure 3D des molécules de CMH de classe I

Peptides antigéniques liés aux CMH de classe I

Il existe deux voies de présentation des peptides par les molécules du CMH de classe I : la voie classique de présentation des peptides endogènes et la présentation croisée des peptides exogènes.

La voie classique est active dans tous les types cellulaires. Les protéines endogènes sont dégradées dans le protéasome en fragments de 2 à 30 acides aminés puis transférées, grâce au transporteur TAP vers le réticulum endoplasmique où les fragments vont pouvoir se lier aux molécules de CMH de classe I. Le sillon peptidique étant fermé, seuls des peptides 8 à 10 acides aminés possédant les bons acides aminés dits d'ancrage pourront se fixer (Rammensee et coll. 1999). La nature des acides aminés d'ancrage diffère selon le type de CMH, par exemple un peptide se fixera de manière optimale dans le HLA-A\*0201 s'il possède des résidus Leucine en position 2 et Valine en position 9. Les complexes CMH-peptide correctement chargés migrent à travers l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane cytoplasmique.

La voie indirecte ou présentation croisée permet aux cellules présentatrices d'antigènes professionnelles de présenter des antigènes issus de protéines exogènes sur les molécules de classe I (Bevan 1976). Les antigènes exogènes (cellules apoptotiques, nécrotiques, complexes immuns...) doivent être internalisés par la cellule dendritique avant d'être apprêtés sur les molécules de classe I.

### Les complexes CMH/peptides recombinants

La production sous forme recombinante de CMH qui peuvent être chargés à façon avec les peptides d'intérêt constitue un outil technologique qui a beaucoup contribué au développement de l'immunothérapie et à la caractérisation des lymphocytes T CD8.

Pour pallier la faible affinité de l'interaction du TCR avec le CMH-peptide, deux stratégies différentes ont été utilisées. L'approche de Dal Porto et al. chez la souris et de Greten et al. chez l'homme a consisté à réaliser des protéines chimériques CMH-Ig pour produire des complexes divalents (Greten et coll. 1998; Dal Porto et coll. 1993). Altman et al. ont choisi de produire des complexes CMH-peptide tétravalents en liant 4 monomères biotinylés avec une molécule de streptavidine (Altman et coll. 1996). C'est cette stratégie, légèrement modifiée qui a été retenue pour produire les HLA A\*0201 recombinants dont nous disposons au laboratoire (Bodinier et coll. 2000) (cf. Figure 2). Afin de diminuer la fixation non spécifique au CD8 et ne conserver que l'interaction avec le TCR, la chaîne lourde a été mutée sur un des acides aminés du domaine  $\alpha 3$  qui participe à l'interaction avec le co-récepteur (Salter et coll. 1990). Cette mutation permet d'améliorer l'efficacité du tri de population spécifique à l'aide de complexes CMH-peptide (Bodinier et coll. 2000).

Les applications des multimères de CMH-peptide sont nombreuses : détection des lymphocytes spécifiques d'antigène, études fonctionnelles, isolement de populations d'intérêt (pour revue (Lang et coll. 2001)).

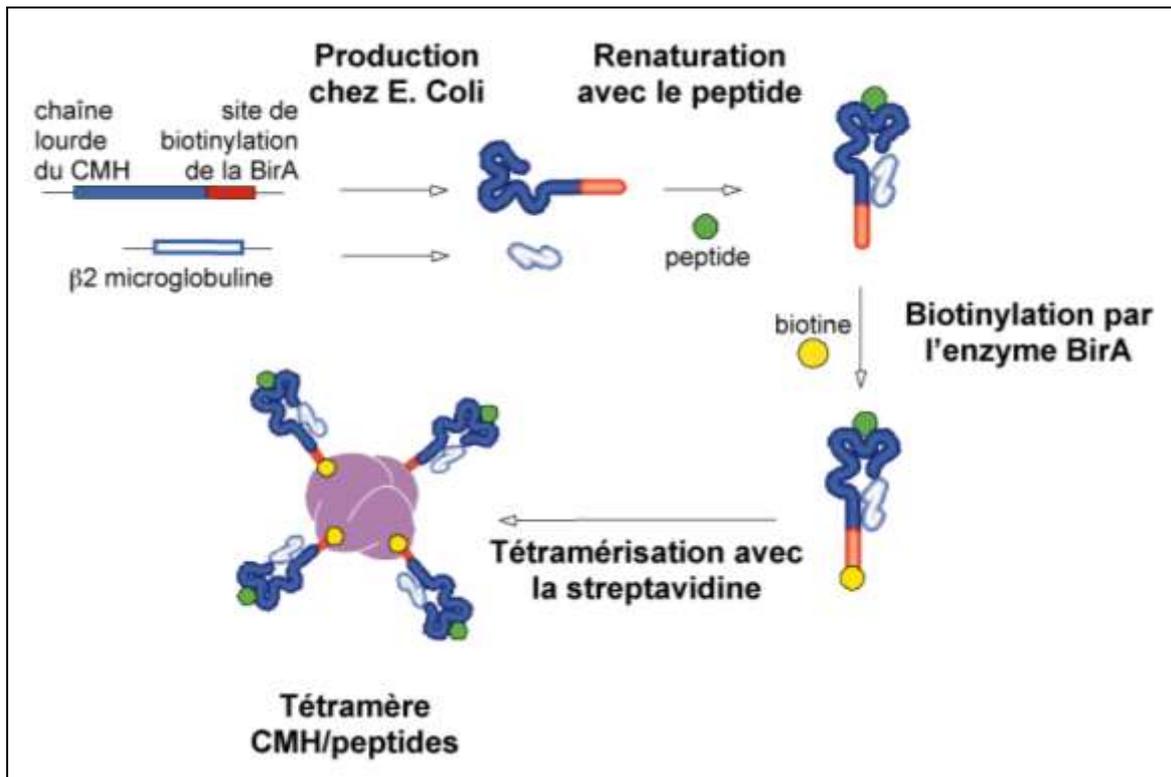


Figure 2 : Production de complexes CMH-peptide recombinants (Lang et coll. 2001).

## Le récepteur des lymphocytes T $\alpha\beta$ : TCR

### Structure du complexe TCR/CD3

Les récepteurs d'antigènes des lymphocytes T (TCR) conventionnels sont des hétérodimères formés par l'association de deux chaînes polypeptidiques  $\alpha$  (40-50kDa) et  $\beta$  (35-47kDa) liées entre elles par un pont disulfure. Chaque chaîne comprend deux domaines extra-cellulaires, l'un variable (V) et l'autre constant (C), ainsi qu'une région trans-membranaire et une très courte région intra-cytoplasmique (cf. Figure 3). Le domaine V est impliqué dans la reconnaissance du complexe CMH-peptide et le domaine C permet l'ancrage dans la membrane et s'associe de manière non covalente avec le complexe invariant CD3 responsable de la transduction du signal d'activation.

Le complexe CD3 est nécessaire pour l'expression en surface des TCR et il assure la transduction des signaux provoqués par l'interaction du TCR avec l'antigène. Il est constitué de cinq chaînes polypeptidiques :

- Les chaînes  $\gamma, \delta$  et  $\epsilon$  (x2) qui comprennent un domaine de type immunoglobuline extracellulaire, une région transmembranaire et une région cytoplasmique.
- Les polypeptides  $\zeta$  et  $\eta$  qui ont un très court segment extracellulaire de 9 acides

aminés, un segment transmembranaire et deux très longues régions cytoplasmiques. Ces deux chaînes peuvent s'associer sous forme d'un homodimères ( $\zeta\zeta$  ou  $\eta\eta$ ) ou bien d'un hétérodimères ( $\zeta\eta$ ).

Les régions cytoplasmiques de ces chaînes possèdent 1 (module  $\gamma, \delta, \epsilon$ ) ou 3 (modules  $\zeta\zeta$ ) motifs ITAMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) qui jouent un rôle essentiel dans la transduction du signal. Ces motifs interagissent avec des protéines kinases.

Le complexe TCR/CD3 est également associé, pour la majorité des lymphocytes  $T\alpha\beta$  à des molécules invariantes, dites co-récepteur CD4 et CD8, qui interagissent respectivement avec les molécules du CMH de classe II ou I et participent à la transduction du signal activateur par CD3. Les régions cytoplasmiques du CD4 et du CD8 sont associés à la protéines kinase p56lck (Révillard et coll. 2001).

Le TCR est distribué de façon clonale à la surface des lymphocytes T, et il est donc spécialisé dans la reconnaissance des peptides présentés par les molécules de CMH.

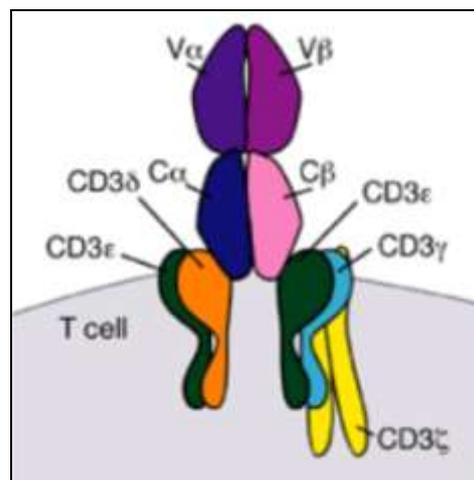


Figure 3 : structure du complexe TCR/CD3

### Génération de la diversité des TCR, maturation et sélection thymique des lymphocytes T

C'est au cours de la maturation thymique des lymphocytes T (débutant vers la huitième semaine de gestation suite à la migration vers le thymus des précurseurs T issus de la cellule souche hématopoïétique) qu'a lieu la formation et la sélection des TCR. Les thymocytes vont d'abord réarranger des gènes codant pour les chaînes  $\gamma$  et  $\delta$ . Si ces

réarrangements sont productifs, ces cellules  $\gamma\delta$  (0,5 à 1% des thymocytes) se développeront en cellules  $T\gamma\delta$  qui représenteront 3 à 5% des lymphocytes du sang. La majorité des thymocytes qui n'ont pas de réarrangements productifs les chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  poursuivent leur différenciation en réarrangeant les gènes de la chaîne  $\beta$  puis ceux de la chaîne  $\alpha$  du TCR.

Les différentes chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont codées par le réarrangement d'un nombre limité de fragments de gènes organisés en loci : les fragments V (Variable), J (Jonction) et C (Constante) pour les chaînes  $\alpha$  et les fragments V,D (Diversité), J et C pour les chaînes  $\beta$  (Davis et coll. 1988). La chaîne  $\beta$  est réarrangée en premier par recombinaison entre les segments V, D et J, puis C (Dudley et coll. 1994). Si la chaîne  $\beta$  est fonctionnelle, elle s'assemble avec la chaîne invariante pré- $T\alpha$  pour former un pré-TCR exprimé en association avec le CD3. L'expression de ce pré-TCR induit l'arrêt des réarrangements sur le second allèle  $\beta$  par un processus appelé « exclusion allélique » (Malissen et coll. 1992). Les cellules poursuivent alors leur différenciation et commencent à réarranger le  $TCR\alpha$ , qui n'est pas soumis au processus d'exclusion allélique (il est donc possible qu'un thymocyte exprime deux chaînes  $\alpha$ ). Ce sont ces mécanismes de réarrangement (donnant lieu à une diversité combinatoire et jonctionnelle) qui sont à l'origine de la diversité du répertoire lymphocytaire T naïf.

Le thymocyte doit ensuite franchir les étapes de sélection positive et négative avant d'arriver en périphérie. La sélection positive assure la survie et la maturation de cellules T ayant un TCR fonctionnel et qui interagit avec les complexes CMH-peptide du soi de façon suffisamment affine pour permettre une reconnaissance. Au cours de la sélection négative, les lymphocytes qui reconnaissent les éléments du soi avec une affinité trop forte sont éliminés par apoptose afin d'éviter le maintien de lymphocytes auto-réactifs (pour revue, (Sebzda et coll. 1999).

Environ 99% des thymocytes ne deviennent pas matures et meurent par apoptose à l'intérieur du thymus soit parce qu'ils ne réussissent pas à faire des réarrangements productifs, soit parce qu'ils ne survivent pas à la sélection thymique. Une fois ces étapes de sélection franchies, ils sont prêts à partir en périphérie.

### Interaction du TCR avec le complexe CMH peptide

Des études récentes par résonance plasmonique de surface (BIAcore) (cf. Matériel et Méthode) ont permis de mesurer avec précision la cinétique d'association et l'affinité du TCR pour le complexe CMH-peptide. Cette affinité est sensiblement plus faible que celle d'un anticorps pour son antigène, variant de  $1\mu\text{M}$  à  $50\mu\text{M}$ . Les constantes d'association sont très variables d'un complexe à l'autre et la gamme de constantes de dissociation plus étroite et rapide que pour une interaction antigène anticorps. La demi-vie du complexe est de l'ordre de 3 à 60 sec à  $25^\circ\text{C}$  (pour revues, (van der Merwe et coll. 2003; Carreño et coll. 2006).

Un CMH-peptide donné est reconnu par plusieurs TCR pouvant être très différents, et d'affinité variable pour le complexe. C'est ce qui permet une réponse polyclonale variée. Une analyse comparative des structures tri-dimensionnelles de deux TCR distincts contactant le même complexe CMH-peptide a montré que ces deux TCR n'avaient en commun qu'un seul acide aminé en contact avec le CMH (Ding et coll. 1998). Inversement, bien que la reconnaissance soit hautement spécifique, un TCR donné peut interagir avec différents complexes CMH-peptide (Mason 1998). Outre son rôle dans la sélection positive des thymocytes, cette dégénérescence de la reconnaissance T est une des hypothèses expliquant la survenue de maladies auto-immunes suite à des épisodes infectieux par mimétisme moléculaire (Christen et coll. 2004; Fujinami et coll. 2006).

### Le co-récepteur CD8

Le co-récepteur CD8 est exprimé dans la majorité des lymphocytes  $T\alpha\beta$  sous forme d'hétérodimères  $CD8\alpha / CD8\beta$  ou d'homodimères  $CD8\alpha / CD8\alpha$  (Moebius et coll. 1991). Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du CD8 sont constituées de 4 domaines fonctionnels : un domaine extra-cellulaire, une région charnière proche de la membrane, une région transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Par son domaine extra-cellulaire, la molécule de CD8 établit des contacts surtout avec le domaine  $\alpha 3$  du CMH, mais également avec le domaine  $\alpha 2$  et la  $\beta 2$ microglobuline. Bien que l'affinité globale du CD8 pour le CMH semble être faible à  $37^\circ\text{C}$  (Wyer et coll. 1999), cette interaction participe cependant à l'augmentation de l'avidité du lymphocyte pour sa cible. Ceci peut permettre à un clone T ayant un TCR peu affin pour un CMH-peptide de s'activer correctement et de se maintenir en périphérie au cours des re-stimulations successives

(al-Ramadi et coll. 1995; Couedel et coll. 1999). Le CD8 joue aussi un rôle important dans la transduction du signal en s'associant par sa chaîne  $\alpha$  avec la protéine kinase p56Lck (Turner et coll. 1990). La chaîne  $\beta$ , une fois palmitoylée, participe à la translocation de l'ensemble vers les radeaux lipidiques (Arcaro et coll. 2000).

Une étude chez la souris suggère qu'après activation, une petite proportion des CD8 $\alpha\beta$  exprime le CD8 $\alpha\alpha$  et que ces cellules sont sélectionnées pour survivre et se différencier en cellules mémoires (Madakamutil et coll. 2004). Cet effet serait dû à une augmentation de l'expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7 et de Bcl-2 (Zhong et coll. 2005). Chez l'homme une fraction des lymphocytes T CD8 co-expriment les complexes CD8 $\alpha\beta$  et CD8 $\alpha\alpha$  et bien que les lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$  aient des caractéristiques d'effecteur/mémoire leur rôle chez l'homme est encore mal connu (Konno et coll. 2002).

### **Les molécules de co-stimulation**

En plus de la reconnaissance spécifique d'un complexe CMH/peptide par le TCR (dit premier signal), l'activation du système immunitaire est régulée de façon stricte et fine par des signaux positifs et négatifs. Les molécules co-stimulatrices permettent l'activation et l'amplification de la réponse, régulent la survie cellulaire et déterminent les fonctions effectrices, tandis que les molécules co-inhibitrices préviennent, diminuent ou empêchent l'activation et la différenciation cellulaires. Si ces signaux de co-stimulation non spécifiques sont absents lors de l'activation d'un lymphocyte T naïf, la réponse générée sera abortive. Les lymphocytes T seront soit rendus anergiques, incapables de répondre et de sécréter des cytokines, soit supprimés. Ce processus permet de maintenir la tolérance périphérique (Bretscher 1999). Au cours des re-stimulations antigéniques éventuelles, la délivrance de signaux de co-stimulation n'est plus cruciale, mais elle contribue néanmoins à augmenter le niveau de la réponse. Ces molécules co-stimulatrices ou co-inhibitrices appartiennent à deux grandes familles : la famille CD28, qui appartient à la superfamille des immunoglobulines, et la superfamille du TNF.

#### **Famille du CD28**

Les membres de la famille du CD28 sont constitués d'un domaine extracellulaire de type « immunoglobuline », d'une région transmembranaire et d'une région intra-

cytoplasmique qui comporte des motifs de signalisation à l'origine d'une inhibition ou d'une activation des lymphocytes T.

i. CD28

ii. Structure et expression

Le CD28 est un récepteur homodimérique possédant un domaine immunoglobulinique extra-cellulaire. Il est exprimé constitutivement par 90% des lymphocytes T CD4+ et environ 50% des lymphocytes T CD8+.

Ses ligands sont B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86). Ils sont exprimés sur la plupart des cellules présentatrices d'antigène comme les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B activés. B7.2 (CD86) est exprimé constitutivement à bas bruit, alors que B7.1 est pratiquement absent sur les cellules dendritiques non activées. Leur expression est rapidement augmentée suite à l'activation des cellules dendritiques (jusqu'à  $5 \times 10^4$  à  $10^5$  par cellules), mais selon une cinétique différente puisque l'expression de B7.2 précède celle de B7.1 (Hathcock et coll. 1994). Les affinités du CD80 et du CD86 pour le CD28 sont respectivement de  $4 \mu\text{M}$  et  $20 \mu\text{M}$ . Malgré ces légères différences, ces 2 molécules ont des fonctions largement redondantes.

Rôle biologique

*In vivo*, des modèles de souris déficientes pour le CD28 sont incapables de répondre à une infection, ou de lutter contre une GVH mais développent des hypersensibilités (Speiser et coll. 1997; Shahinian et coll. 1993; Krinzman et coll. 1996). *In vitro* l'absence de co-stimulation CD28 est à l'origine d'une prolifération et différenciation diminuées (Gudmundsdottir et coll. 1999). La combinaison d'une stimulation CD3 et d'une co-stimulation CD28 entraîne une augmentation de la prolifération et de la différenciation des lymphocytes. Par rapport à une stimulation CD3 seule, cette co-stimulation se manifeste par une forte sécrétion de cytokines (IL-2, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) et une résistance à l'apoptose.

*Contrôle du cycle cellulaire et prolifération*

Le signal CD28 augmente la production d'IL-2 et l'expression des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  du récepteur à l'IL-2, à l'origine de l'accélération de la progression du cycle cellulaire (Reichert et coll. 2001). Néanmoins, l'augmentation de l'expression des cyclines D, des

CDK4/6 ainsi que la phosphorylation de Rb, 3-4 heures après une stimulation TCR/CD28 indiquent que l'entrée en phase G1 du cycle est observée plus précocement que les effets de l'IL-2 (Lea et coll. 2003).

### *Survie*

Boise *et al.* ont montré que l'activation du CD28 favorise la survie des lymphocytes T en augmentant l'expression de Bcl-x<sub>L</sub> et en réprimant la transcription du facteur pro-apoptotique p73 (Boise et coll. 1995; Wan et coll. 2003). Le rôle anti-apoptotique du CD28 a été confirmé dans d'autres études (Marinari et coll. 2004; Cianfrocca et coll. 2008). Cependant, cet effet semble dépendre de l'intensité de stimulation du TCR. En effet, l'apoptose induite par une forte/longue stimulation du TCR semble être augmenté par le CD28 (Yu et coll. 2003; Gao et coll. 2002). De même, Shu *et al* ont montré qu'une stimulation CD3/CD28 continue de 48h était à l'origine d'une expression croissante des gènes relatif à l'apoptose (comme une augmentation du cytochrome c, de Fas, une diminution de Bcl-x) par rapport à une stimulation de 18h (Shu et coll. 2006).

L'interaction entre CD28 et CD80 ou 86 entraîne une redistribution du CD28 dans la partie centrale de la synapse immunologique, cela a pour effet de potentialiser les voies de transduction induites par la stimulation du TCR (NFAT, NFkB, PI3K), mais également de recruter de la protéine kinase C  $\theta$  (Huang et coll. 2002). Cette voie est indispensable à la régulation de la transcription du gène de l'IL-2 (Sanchez-Lockhart et coll. 2006).

### Le cas des anticorps anti-CD28 superagonistes

La plupart des études ont été effectuées avec des anticorps agonistes, des anticorps bloquants, des protéines recombinantes... Parmi les anticorps anti-CD28, certains sont dits superagonistes, car ils sont capables de stimuler les lymphocytes sans que l'engagement du TCR soit nécessaire. Ces anticorps entraînent une lymphocytose qui touche principalement les lymphocytes T CD4 régulateurs (Lin et coll. 2003). Ces anticorps se sont révélés efficaces dans le traitement de maladie auto-immune comme des encéphalomyelites expérimentales, d'abord chez le rat, puis chez la souris (Schmidt et coll. 2003). Une autre application de ces anticorps résulte de leur potentiel mitogène. Ils ont été testés pour traiter des souris atteintes de lymphopénie T : les résultats obtenus chez le rat montrent un effet majeur sur les CD4 mais faible sur les CD8 (Elflein

et coll. 2003). Malheureusement, lors d'une étude de phase I, l'effet d'un anticorps anti-CD28 superagoniste humanisé (le TGN1412) s'est révélé désastreux. De façon inattendue les 6 patients inclus dans cette étude ont présenté, 24H après l'injection, une lymphodéplétion sévère associée à un syndrome inflammatoire systémique dû à la libération massive de multiples cytokines (Suntharalingam et coll. 2006). Depuis, des études chez le rat ont confirmé ces observations. L'injection d'un anticorps superagoniste entraînerait une redistribution des lymphocytes T vers les organes lymphoïdes secondaires, se traduisant par une lymphopénie périphérique. Dans un second temps, la forte activation de CD28 induit l'expression de cytokines et chémokines pro-inflammatoires (IL-2, IL-17, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ). Cependant les taux sériques observés chez le rat semblent bien inférieurs à ceux mesurés dans l'essai clinique humain (Müller et coll. 2008).

#### Variation de l'expression du CD28

Le niveau d'expression du CD28 sur les lymphocytes T humains est soumise à des variations. La perte du CD28 est une marque de la sénescence des lymphocytes T. En effet, ces cellules CD28- sont absentes chez le nouveau-né et augmentent au cours des infections chroniques. Une diminution de son expression est systématique après activation (Eck et coll. 1997). De plus, des stimulations répétées, suite à la persistance de l'antigène lors d'infections virales chroniques, entraînent une perte totale et irréversible de son expression (Linsley et coll. 1993; Isa et coll. 2005). De même, *in vitro*, les lignées polyclonales ou les clones T sont fréquemment CD28- (Pawelec et coll. 2004). Selon Kim *et al* la perte du CD28 ne serait pas toujours irréversible : la combinaison d'IL-2, d'IL-15 et d'anticorps anti-4-1BB permettrait sa ré-expression sur des cellules CD28- issus de sang de cordon, cependant ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres équipes (Kim et coll. 2002).

La perte irréversible du CD28 (lymphocytes T CD28<sup>null</sup>) corrèle avec la présence de télomères très raccourcis. Néanmoins, ces cellules sont très résistantes à l'apoptose et s'accumulent au cours de la vie pour persister pendant plusieurs années (Vallejo et coll. 2000; Plunkett et coll. 2007). On considère que ces cellules CD28<sup>null</sup> dérivent des CD28+ ayant subi de multiples stimulations antigéniques (Eck et coll. 1997). Ce sont par conséquent des effecteurs tardifs de la réponse immunitaire qui correspondent souvent à des populations oligoclonales (Colombatti et coll. 1998).

Suite à une stimulation du TCR ou par des mitogènes comme le PHA, les capacités prolifératives de ces cellules CD28<sup>-</sup> sont réduites par rapport au CD28<sup>+</sup> (Isa et coll. 2005). Il semble de plus, que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> soient incapables de produire leur propre IL-2, fonction restaurée suite à la transfection du CD28 (Topp et coll. 2003). Cependant, certaines études montrent que ces cellules se multiplient en présence de cytokines comme l'IL-15 (Fagnoni et coll. 1996; Chiu et coll. 2006).

### iii. CTLA-4

Il s'agit du pendant inhibiteur du CD28. Son expression est rapidement induite suite à l'activation du TCR et du CD28 (Brunet et coll.; Walunas et coll. 1994). Il présente une forte analogie de structure avec le CD28 ce qui explique qu'il se lie également au CD80 et au CD86. Cependant cette interaction présente une affinité dix fois supérieure à celle du CD28, avec qui il entre en compétition (Sansom 2000). Il régule négativement la transduction du signal induite par le TCR et le CD28 : diminution de la sécrétion d'IL-2, inhibition de la progression du cycle cellulaire en diminuant l'expression des cyclines (pour revue (Fife et coll. 2008)). Ainsi cette voie est essentielle pour limiter la réponse proliférative des lymphocytes T (maladie auto-immune, rejet d'organe)

### iv. PD-1 (Programmed Death-1)

PD-1 est un récepteur inhibiteur inductible exprimé par les lymphocytes T CD4 et CD8 activés, les lymphocytes B les cellules NK et les monocytes (Nishimura et coll. 1996). Malgré son nom (*Programmed Death- 1*), PD-1 a un effet indirect, et non direct, sur la mort cellulaire, essentiellement par diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-x<sub>L</sub>.

Deux ligands de PD-1 ont été décrits, PD-L1 (B7H1) et PD-L2 (B7-DC) PD-L1 est faiblement exprimé sur les cellules du système immunitaire, plus fortement après leur activation. Il est également exprimé sur des organes non lymphoïdes (cœur, poumon, pancréas, muscle et placenta). Cette expression sur les tissus périphériques suggère qu'il pourrait réguler les fonctions des cellules T, B et myéloïdes activées dans les tissus périphériques, ou inhiber les réponses inflammatoires dans ces organes. PDL1 est également exprimé par certaines tumeurs, son expression apparaissant associée à un plus mauvais pronostic. L'utilisation, in vitro, d'un anticorps bloquant a permis d'augmenter le nombre et la cytotoxicité des lymphocytes T anti-tumoraux (Blank et

coll. 2006). Ces résultats confirment ceux obtenus chez la souris où le blocage de PD-1 a permis d'induire l'élimination des cellules néoplasiques (Hirano et coll. 2005). L'expression de PD-L1 serait donc utilisée par la tumeur pour échapper à la réponse immunitaire (Dong et coll. 2002).

L'expression de PDL-2 est restreinte aux macrophages et aux cellules dendritiques, elle est induite par les cytokines. PD-L2 est un marqueur associé à un meilleur pronostic dans un sous-groupe de lymphomes B et dans la maladie de Hodgkin (Rosenwald et coll. 2003). Il pourrait participer à l'induction de la réponse immune ou augmenter la production de cytokines inflammatoires.

Les premières études ont montré un rôle inhibiteur de PD-L1/2 sur la prolifération et la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T (Carter et coll. 2002). Cependant, d'autres ont récemment montré une augmentation de la prolifération. Cet effet semble passer par l'inhibition de la sécrétion d'INF- $\gamma$  par les macrophages (Tseng et coll. 2001; Yamazaki et coll. 2005).

Devant ces effets contradictoires, l'existence d'un autre récepteur à PDL a été suggérée. Dans ce sens, une étude montrant la capacité de mutants de PDL à entraîner une prolifération alors qu'ils étaient incapables de reconnaître PD-1 conforte cette idée (Wang et coll. 2003). En 2007 Butte et al ont montré que PDL1 et B7:1 (CD80) interagissaient avec une affinité supérieure au CD28 et était responsable d'une inhibition de l'activation et de la sécrétion de cytokines (Butte et coll. 2007). Ainsi le CD86 peut interagir avec CD28, CTLA-4 et PD-L1.

#### v. ICOS (Inductible T Cell Costimulator)

C'est un autre membre de la famille du CD28. Il est exprimé par les lymphocytes T CD4 et CD8, bien que plus faiblement par les CD8 (Hutloff et coll. 1999). Il induit l'activation et la différenciation des lymphocytes T CD4 ainsi que le développement de la réponse immunitaire B (commutation isotypique des immunoglobulines (McAdam et coll. 2001). ICOS n'induit pas la synthèse d'IL-2, mais essentiellement d'IL-10 et des cytokines Th2 comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (Hutloff et coll. 1999).

ICOSL, le ligand d'ICOS, est présent sur les cellules B, les monocytes et les cellules dendritiques, mais également sur des cellules endothéliales ou épithéliales.

La transfection de ICOSL dans des tumeurs permet à des souris d'établir une réponse immunitaire protectrice, corrélant avec une réponse lymphocytaire T

cytotoxique augmentée (Liu et coll. 2001). Chez l'homme, il a été montré que des lymphocytes T CD8 stimulés par de l'anti-CD3 proliféraient plus fortement en présence d'anticorps anti-ICOS immobilisé (Watanabe et coll. 2005).

vi. Autres molécules : B7-H3, B7-H4, BT3.1

Les fonctions et les molécules s'associant à ces protéines sont encore mal connues ou non identifiées. Ces molécules sont homologues aux molécules B7.1 et B7.2. Les premières observations attribuent à B7-H3 une fonction co-stimulatrice sur les lymphocytes T, tandis qu'elle inhiberait les fonctions des cellules NK. Chez la souris, la transfection de cette protéine augmente la réponse immunitaire anti-tumorale (Yang et coll. 2008).

B7-H4 est, quant à elle, une protéine régulant de façon négative la réponse immune (Kryczek et coll. 2006). Elle est exprimée sur des tumeurs humaines, et pourrait donc participer aux mécanismes d'échappement tumoral. Enfin, BT3.1, BT3.2 et BT3.3, qui appartiennent à la famille des butyrophillines, homologue de la famille B7, sont exprimées sur les cellules immunes et certains tissus tumoraux, mais ont un rôle encore inconnu (Compte et coll. 2004).

*Membres de la famille du récepteur au TNF (TNFR)*

Les membres de la famille du TNF se répartissent en 2 groupes selon que leur récepteur contient un domaine de mort (DD pour *Death Domain*) ou un motif TRAF (*TNF Receptor Associated Factor*). Le motif DD permet d'activer la voie des caspases aboutissant à l'apoptose. Fas est le chef de file de ce groupe. La transduction du signal par TRAF est associée à l'activation, la différenciation et la survie cellulaire. Ainsi, les membres de ce groupe, auxquels nous nous intéresserons ici, sont des molécules de co-stimulation. Les membres de ce groupe impliqués dans l'apoptose seront traités dans un autre chapitre. Pour la plupart de ces molécules, l'interaction entre le ligand et le récepteur transmet un signal d'activation à la fois aux cellules qui expriment le récepteur et aux cellules qui expriment le ligand (signal bi-directionnel).

### i. Le couple 4-1BB/ 4-1BBL

#### Caractérisation

Le 4-1BB a été identifié par différentes techniques dont le but était de découvrir des gènes induits lors de l'activation des lymphocytes T chez la souris. Le couple 4-1BB/4-1BBL a été caractérisé d'abord chez la souris puis chez l'homme. Chez la souris, l'ADNc du 4-1BB a été isolé à partir d'une banque soustractive, le caractérisant comme une molécule inductible lors de l'activation des lymphocytes T (Kwon et coll. 1989). Le 4-1BB humain a été cloné par deux approches parallèles. Une à partir d'une banque de lymphocytes T transformés par le virus HLTV-1 (Schwarz et coll. 1993) et une à partir d'une banque d'ADNc préparée à partir de PBL (*Peripheral Blood Lymphocyte*) stimulés (Alderson et coll. 1994). Il peut exister sous forme de monomère et probablement de trimère à la surface des lymphocytes T (Pollok et coll. 1993; Rabu et coll. 2005; Lynch 2008).

Le 4-1BB ligand a été ensuite isolé à partir d'une banque en COS du thymome EL4 à l'aide de 4-1BB/Fc recombinant (Goodwin et coll. 1993). À la différence de la plupart des membres de la famille du TNF, le 4-1BBL humain et murin ne présente que 36% d'homologie (Alderson et coll. 1994). Les premières études de la structure du 4-1BBL suggèrent qu'il s'agit d'un homodimère lié par des ponts disulfures (Goodwin et coll. 1993). Le travail mené par C. Rabu dans le laboratoire a permis de montrer que la forme active du 4-1BBL était un trimère où 2 monomères sont liés de manière covalente par un pont disulfure, le troisième monomère s'associant aux deux autres par liaison non covalente (Rabu et coll. 2005).

#### Expression

Le 4-1BB est exprimé à la surface des lymphocytes T activés. *In vitro*, des études menées chez la souris montrent que l'expression du 4-1BB est maximale à 48h et décline à partir de 4-5 jours (Cannons et coll. 2001; Vinay et coll. 1998). *In vivo*, et toujours chez la souris, il semble que l'expression du 4-1BB soit plus précoce et plus transitoire ; elle coïnciderait avec l'expression de marqueurs précoce d'activation (Dawicki et coll. 2004). Les lymphocytes CD4 (Th1 et Th2) et CD8 activés expriment le 4-1BB, cependant il semble qu'il soit exprimé plus rapidement et plus intensément sur les lymphocytes T CD8 à la fois chez la souris et chez l'homme (Taraban et coll. 2002; Wen et coll. 2002).

Chez la souris, une fraction de lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ exprime constitutivement le 4-1BB (McHugh et coll. 2002). Néanmoins, cette expression est fortement augmentée suite à leur stimulation (Zheng et coll. 2004; Choi et coll. 2004; Elpek et coll. 2007). Le 4-1BB n'est pas exprimé que par les lymphocytes T : il est constitutif sur les monocytes et sur certaines DC (Kienzle et coll. 2000; Susanne Pauly et coll. 2002; Lindstedt et coll. 2003; Jiang et coll. 2008). L'engagement du 4-1BB par du 4-1BBL ou par un anticorps anti-4-1BB induit la production d'IL6 et d'IL12 par les cellules dendritiques (Futagawa et coll. 2002). Le 4-1BB est également inductible sur les NK murins en réponse à l'IL-2 ou l'IL-15 (Pulle et coll. 2006b; Wilcox et coll. 2002). Chez l'homme, son expression semble nécessiter l'activation du CD16 (Wilcox et coll. 2002; Lin et coll. 2008). Il aurait un rôle inhibiteur sur les progéniteurs myéloïdes, puisque les souris KO pour le 4-1BB présentent un nombre de précurseurs myéloïdes plus important (Kwon et coll. 2002). Des formes solubles du 4-1BB ont été retrouvées dans le sérum de patients atteints de maladies auto-immunes (Michel et coll. 1998; Hamaguchi et coll. 2008), ainsi que dans le liquide céphalorachidien (Sharief 2002). Le rôle physiologique n'est pas encore bien déterminé, mais il a été montré que cette forme soluble favorise l'AICD (Michel et coll. 2000). Cette forme pourrait être générée par épissage alternatif (Michel et coll. 1998).

Plusieurs équipes ont décrit une expression du 4-1BBL à la surface des macrophages activés, des cellules dendritiques stimulées par du LPS ou du CD40 ligand (Laderach et coll. 2003; Lee et coll. 2003) et des lymphocytes B activés (Pollok et coll. 1994). Le 4-1BBL est également exprimé, avec une cinétique d'apparition plus précoce que le 4-1BB à la surface des lymphocytes T activés (Alderson et coll. 1994; Schwarz et coll. 1993). L'expression du 4-1BB ligand a également été retrouvée sur les cellules CD34+, il permettrait leur différenciation en macrophage (Jiang et coll. 2008). Enfin, certains tissus tumoraux peuvent exprimer le 4-1BB et le 4-1BB ligand. Leur localisation est cependant différente puisque le CD137 est exprimé sur les vaisseaux, alors que le CD137L est exprimé par les cellules tumorales (Wang et coll. 2008).

#### Outils disponibles pour l'étude du couple 4-1BB/4-1BBL

Différents outils ont été développés pour étudier le rôle du couple 4-1BB/4-1BBL. Des anticorps agonistes anti-4-1BB sont disponibles chez l'homme (Garni-Wagner et coll. 1996) et la souris (Pollok et coll. 1994). Des équipes ont transfecté des lignées

cellulaires P815 ou des cellules humaines autologues avec le 4-1BBL humain seul ou associé à d'autres molécules comme le CD32, le CD3, CD80/CD86 (Wen et coll. 2002; Habib-Agahi et coll. 2008). D'autres stratégies utilisent des formes recombinantes chimériques de 4-1BB, comme du 4-1BB couplé au fragment Fc (4-1BB/Fc) (Alderson et coll. 1994; Goodwin et coll. 1993; Xu et coll. 2005), à la phosphatase alcaline (Pollok et coll. 1994). Ou encore des protéines de fusion 4-1BBL et complexes CMH/peptide (Zhang et coll. 2007) ou CD19 (Imai et coll. 2004). Ces protéines sont généralement utilisées en soluble pour bloquer l'interaction 4-1BB/4-1BBL. Jusqu'à présent, nous sommes la seule équipe à avoir produit la forme recombinante du 4-1BB ligand humain (Rabu et coll. 2005).

Il existe également des souris « knock-out » pour le 4-1BB (Kwon et coll. 2002) et pour le 4-1BBL (DeBenedette et coll. 1999).

La plupart des études utilisent des anticorps agonistes du 4-1BB. Cependant, récemment une équipe a substitué l'utilisation des anticorps agonistes par des aptamères (des ARN synthétiques capables de fixer des protéines), les résultats obtenus sont cohérents avec ceux obtenus avec les anticorps (McNamara et coll. 2008).

### Rôles biologiques du couple 4-1BB/4-1BB Ligand

#### *Co-stimulation*

De nombreuses études ont établi que la stimulation du 4-1BB augmente la prolifération des lymphocytes T et leur sécrétion de cytokines, aussi bien chez l'homme que chez la souris. Chez la souris, un anticorps agoniste anti-4-1BB co-stimule la prolifération de splénocytes activés par de l'anti-CD3 et augmente la sécrétion d'IL2 (J C Hurtado et coll. 1997) alors que dans le même modèle, l'addition de 4-1BB/Fc a un rôle inhibiteur (J C Hurtado et coll. 1995). De même, des lignées transfectées par le 4-1BB ligand augmentent la prolifération des lymphocytes T en réponse à des doses sub-optimales de stimulation TCR chez la souris (Goodwin et coll. 1993) et chez l'homme (Wen et coll. 2002). Les premières études chez la souris ont montré que le 4-1BB co-stimulait aussi bien les CD8 (Anticorps anti-4-1BB), que les lymphocytes T CD4 (cellules transfectées par le 4-1BBL) (Takahashi et coll. 1999; Gramaglia et coll. 2000).

Une fois cet aspect établi, plusieurs équipes ont cherché à évaluer l'impact de la co-stimulation par le 4-1BB par rapport à la co-stimulation CD28. Les résultats obtenus sont différents suivant les modèles. Tout d'abord, dans un modèle de souris CD28<sup>-/-</sup>, de

Benedette *et al.* ont montré que le couple 4-1BB/4-1BBL pouvait fonctionner indépendamment du signal CD28 (DeBenedette et coll. 1997). Cependant, *in vivo*, le blocage de la voie CD28 semble inhiber la capacité de l'anticorps anti-4-1BB à générer des effecteurs cytotoxiques en réponse à des stimulations antigéniques (Diehl et coll. 2002). De fait, au cours de l'activation primaire, la co-stimulation avec du 4-1BBL n'est pas aussi efficace que la co-stimulation CD28 pour induire une forte production d'IL2 par les cellules CD28+ (Saoulli et coll. 1998). Le 4-1BB ligand est néanmoins capable de co-stimuler la prolifération des lymphocytes T une fois qu'ils ont perdu le CD28 (Bukczynski et coll. 2003; Kim et coll. 2002). Ainsi, alors que le CD28 joue un rôle primordial au début de la primo-activation, le 4-1BB interviendrait plus tardivement au cours de la réponse primaire puis de façon importante au cours des réponses secondaires (Bertram et coll. 2002a, 2004a).

#### *Effet anti-apoptotique*

L'activité de co-stimulation stricte est renforcée par une action anti-apoptotique qui représente peut-être le véritable rôle du couple 4-1BB/4-1BBL. Les premières études chez la souris ont montré que l'engagement du 4-1BB inhibait l'AICD (*Apoptosis-Induced Cell death*) observée au cours des re-stimulations successives de splénocytes par de l'anti-CD3 (Hurtado et coll. 1997). Depuis, le rôle anti-apoptotique du 4-1BB a également été documenté chez l'homme. L'interaction 4-1BB/4-1BBL induit une augmentation des taux des protéines anti-apoptotiques c-FLIP<sub>short</sub>, Bcl-X<sub>L</sub> et Bfl-1 (Lee et coll. 2002b; Stärck et coll. 2005c), et diminue l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim (Wang et coll. 2007).

#### *Génération et maintien des lymphocytes mémoires*

Si l'effet de la co-stimulation par le 4-1BB ligand ne semble pas nécessaire à l'initiation de la réponse immune, il est en revanche indispensable à la génération des cellules T mémoires. En son absence, la réponse mémoire est profondément altérée (Tan et coll. 1999; Bertram et coll. 2002b; Hendriks et coll. 2005). Cette fonction est confirmée par une étude ayant évalué l'efficacité thérapeutique d'une vaccination peptidique associée à l'injection d'un anti-4-1BB. Dans ce modèle, l'anticorps anti-4-1BB permet de générer des cellules mémoires dont la survie est maintenue au-delà d'un an (Myers et coll. 2006). Par ailleurs, le 4-1BB ligand est indispensable à la stimulation des

cellules mémoires. Il semble permettre l'amplification des lymphocytes T CD8 mémoires en l'absence de signalisation TCR, cet effet n'est pas retrouvé sur les cellules naïves (Pulle et coll. 2006a; Zhu et coll. 2007).

Dans ce sens, des études utilisant des souris déficientes pour le 4-1BB ligand, montrent des réponses cellulaires anti-virales réduites (Vinay et coll. 2003; DeBenedette et coll. 1999), alors que les souris normales, en plus de présenter une réponse plus forte, disposent d'un répertoire plus vaste (Halstead et coll. 2002).

Il a également été montré que les anticorps anti-4-1BB ou les aptamères augmentent la réponse immune anti-tumorale, principalement via les lymphocytes T CD8 (Melero et coll. 1997; McNamara et coll. 2008).

### *Immuno-régulation*

A la différence des autres immunothérapies utilisant des molécules de co-stimulation (CTLA-4), les anticorps anti-4-1BB n'entraînent pas l'apparition d'auto-immunité, mais au contraire améliorent ou préviennent les événements auto-immuns en interfèrent avec les lymphocytes T CD4 autoréactifs (Lee et coll. 2005; Seo et coll. 2004). De plus, une étude récente montre que le 4-1BBL semble pouvoir reverser l'état d'anergie de cellules ne répondant ni au CD3 ni au CD28 (Habib-Agahi et coll. 2007). Ainsi, le couple 4-1BB/4-1BBL ne semble pas agir uniquement comme signal de co-simulation, mais également comme régulateur de la réponse immunitaire.

En effet, l'expression du 4-1BB à la surface des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ activés a été montré par plusieurs équipes (McHugh et coll. 2002b; Choi et coll. 2004; Elpek et coll. 2007). Les résultats concernant les effets de la stimulation du 4-1BB ligand divergent, vraisemblablement selon les agonistes du 4-1BB utilisés. Il semble en effet, que l'expansion des T régulateurs ne soit obtenue qu'avec des formes recombinantes de 4-1BB ligand (Zheng et coll. 2004; Elpek et coll. 2007), alors que l'utilisation d'anticorps agonistes ne semble pas permettre cette amplification (Choi et coll. 2004). Elpek *et al.* montre que l'ajout de 4-1BB ligand soluble inhibe l'effet suppresseur sur les lymphocytes T effecteurs (Elpek et coll. 2007), tout en conservant les capacités suppressives des CD4+CD25+ (Zheng et coll. 2004; Elpek et coll. 2007). En revanche l'activité suppressive semble être inhibée par l'ajout d'un anticorps agoniste (Choi et coll. 2004).

Par ailleurs, il a été montré que les anticorps anti-4-1BB ou les aptamères inhibent

la croissance tumorale dans des modèles murins (Melero et coll. 1997; McNamara et coll. 2008). Cette fonction semble passer par les NK, puisque sans NK la réponse anti-tumorale n'est plus obtenue (Melero et coll. 1998; Wilcox et coll. 2002). Dans ce contexte, le rôle du 4-1BBL sur les NK ne passe pas par une augmentation de la cytotoxicité puisque les NK dégranulent avant d'exprimer le 4-1BB. Ceci conforte le rôle de modulation du couple 4-1BB/4-1BBL (Wei Lin et coll. 2008).

L'efficacité des anticorps anti-4-1BB semble être différente selon qu'ils sont injectés précocement ou tardivement. Il semble en effet que l'injection d'anticorps agoniste avant le « moment » où physiologiquement le 4-1BBL devrait intervenir, soit au mieux inefficace (modèle tumoraux), au pire délétère (modèle viraux) (Miller et coll. 2002; Zhang et coll. 2007). Cet effet délétère avaient été suggéré par certaines études. En effet, certaines études ont suggéré que l'activation du 4-1BB régulait positivement et négativement la prolifération des lymphocytes T (Schwarz et coll. 1996). D'autres ont démontré que la co-stimulation 4-1BBL augmente l'expression de Fas, l'implication de Fas/FasL dans l'apoptose observée est encore débattue (Ebata et coll. 2001; Michel et coll. 1999). Ces observations viennent conforter le rôle régulateur de ce couple.

Il semble actuellement important de tester des molécules plus proches du 4-1BBL naturel. Une équipe a montré que l'expression du 4-1BB était induite suite à la fixation d'un anticorps (y compris un anti-4-1BB) sur les récepteurs Fc des NK (CD16 et CD32). L'anti-4-1BB en se fixant sur les récepteurs Fc, induit l'expression du 4-1BB. Ainsi le 4-1BB peut interagir à la fois avec les anticorps libres mais également avec ceux fixés sur le NK (Wei Lin et coll. 2008). Dans ce contexte, il est opportun de poser la question de la valeur physiologique des modèles utilisant de tel anticorps. Il est probable que tous les résultats obtenus avec de tel anticorps ne reflètent pas la réalité physiologique. Et il serait opportun de re-valider ces effets avec des molécules recombinantes ou à défaut des aptamères qui a priori ne devraient pas poser ces mêmes problèmes.

Par ailleurs, le développement de thérapies visant à injecter des anticorps agonistes anti-4-1BB pose à la fois des problèmes conceptuels de par les nombreuses cibles cellulaires potentielles, mais également des problèmes de sécurité sanitaire laissant prévoir des effets indésirables notables, similaires à ceux observés lors de l'utilisation des anticorps super agoniste du CD28 (Suntharalingam et coll. 2006). Ainsi, les stratégies exploitant le potentiel de co-stimulation du couple 4-1BB/4-1BBL pour

générer des effecteurs T utilisables dans des protocoles de transfert adoptif semblent plus séduisantes (Maus *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003b)

#### ii. CD27

Le ligand du CD27 (TNFR) est le CD70 (Goodwin *et al.*, 1993a; Bowman *et al.*, 1994).

Le CD27 est exprimé par les NK, les lymphocytes B, et par la majorité des lymphocytes T CD4 et CD8 naïfs (Lens et coll. 1998). Chez l'homme, l'expression du CD27 augmente transitoirement pendant l'activation TCR ou CD3, avec un maximum à 24h (Gravestein et coll. 1993) et est ensuite diminuée, voire même perdue en totalité (Romero et coll. 2007) sur les lymphocytes T effecteurs. Après plusieurs cycles de division la perte du CD27 est irréversible et est associée à un phénotype d'effecteur en phase tardive de différenciation, ce qui suggère qu'il est impliqué relativement tôt dans la réponse (Hintzen et coll. 1994; Hamann et coll. 1997). Le CD70 est exprimé par les lymphocytes T activés, les cellules B et les cellules dendritiques. Le profil d'expression de ces 2 molécules suggère donc que le CD27 des lymphocytes T reçoit un signal provenant des lymphocytes B activés, des DC ou par des interactions T-T (So et coll. 2006).

L'activation du CD27 augmente la prolifération globale des lymphocytes T CD4 et CD8, mais vraisemblablement plutôt par un rôle de facteur de survie que par une augmentation du nombre de division cellulaire (Hendriks et coll. 2003). Les souris transgéniques chez lesquelles l'expression du CD70 est forcée (placé sous le contrôle du promoteur au CD19) ont une augmentation du nombre de CD4 et de CD8 et répondent de manière plus intense aux infections par le virus Influenza (Arens et coll. 2001). Cependant elles deviennent rapidement sensibles aux infections opportunistes à cause d'un état d'immunodépression qui s'installe, attribué à un appauvrissement progressif du réservoir de lymphocytes T naïfs (Tesselaar et coll. 2003). Une étude menée chez des souris KO pour le CD28 et le CD27 a évalué la contribution relative de ces 2 molécules au cours de l'expansion T : le rôle du CD28 sur l'augmentation des divisions cellulaires est confirmé, alors que le CD27 est principalement impliqué dans la survie des lymphocytes (Hendriks *et al.*, 2003).

#### iii. OX40/OX40 ligand

OX40 est exprimé principalement par les lymphocytes T CD4 activés, et plus

particulièrement par les Th2 (Weinberg et coll. 1998). OX40L est exprimé par les cellules présentatrices de l'antigène comme les DC et les lymphocytes B plusieurs heures à plusieurs jours après leur activation (Ohshima et coll. 1997). Le couple OX40/OX40L est impliqué dans l'augmentation de prolifération et de sécrétion de cytokines par les lymphocytes T CD4 durant les réponses primaire et secondaire (Linton et coll. 2003; Watts 2005). Ainsi, l'utilisation anticorps bloquant anti-OX40 ou de souris déficientes en OX40 montre une réponse et un nombre de lymphocytes T CD4 diminué (Seshasayee et coll. 2007; Kopf et coll. 1999). Comme de nombreux couples de la famille du TNF/TNFR, le couple OX40/OX40L fonctionne de manière bi-directionnelle, et un défaut de signalisation par l'OX40L aboutit à des fonctions de présentation d'antigène altérées (Murata et coll. 2000).

#### iv. HVEM/ LIGHT

L'expression de la protéine LIGHT est finement contrôlée et inductible, sur les lymphocytes T activés, les monocytes, les granulocytes, les cellules dendritiques immatures, et les cellules NK (Morel et coll. 2000). LIGHT reconnaît trois membres de la superfamille des TNFR : HVEM, le récepteur de la lymphotoxine  $\beta$  (LT $\beta$ R) et DcR3 (*Decoy receptor 3*). Le récepteur de LIGHT le plus étudié est HVEM (*Herpes Virus Entry Mediator*), il a été identifié en 1996 et a été classé parmi la superfamille des récepteurs au TNF. Plusieurs ligands ont été identifiés pour HVEM : la glycoprotéine D du virus HSV1 (gD), la lymphotoxine  $\alpha$  (LT $\alpha$ ) et LIGHT. Plus récemment, il a été montré que HVEM interagit avec des membres de la superfamille des immunoglobulines BTLA (*B and T Lymphocyte Attenuator*) et CD160 (Sedy et coll. 2005; Cai et coll. 2008).

La protéine HVEM est exprimée sur les monocytes, les lymphocytes T et B, les cellules NK. Elle est également exprimée par certaines lignées de cellules hématopoïétiques, notamment de la lignée myéloïde, et est absente de la plupart des lignées cellulaires de tumeurs solides (Morel et coll. 2001).

L'expression de LT $\beta$ R dont l'expression est restreinte aux cellules stromales et aux monocytes.

Cette différence d'expression entre les deux récepteurs semblait refléter également la différence au niveau des fonctions et de la signalisation selon le récepteur engagé : globalement jusqu'à présent l'interaction LIGHT-HVEM est décrite comme favorisant la

survie et la costimulation cellulaires (Xu et coll. 2007) alors que l'interaction LIGHT-LT $\beta$ R induit l'apoptose, la production de cytokines et participe au développement des organes lymphoïdes secondaires (Rooney et coll. 2000; Winter et coll. 2007).

#### v. GITR/GITR ligand

Le GITR (*Glucocorticoid-Induced TNFR family Related gene*) n'est exprimé que très faiblement par les lymphocytes T au repos et apparaît à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 activés (Kwon et coll. 1999). IL est également exprimé constitutivement par les lymphocytes régulateurs CD4+CD25+. Son récepteur, GITRL, est faiblement exprimé par les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques dérivant de la moelle osseuse. Son expression par les cellules présentatrices d'antigène est augmentée par la stimulation des TLR (*Toll Like Receptor*) mais diminue rapidement ensuite. L'activation de GITR augmente la résistance aux infections virales et au développement de tumeurs, il est également impliqué dans les processus inflammatoire et autoimmun et régule l'extravasation des lymphocytes.

L'interaction GITR/GITRL est impliquée dans l'effet supprimeur des T reg puisque l'addition d'anti-GITR ou de GITRL soluble à des co-cultures de Treg avec des lymphocytes CD25- inhibe leur capacité suppressive (H. Ji et coll. 2004; G. L. Stephens et coll. 2004). L'hypothèse actuelle est que l'interaction entre le GITRL des APC et le GITR des lymphocytes nouvellement activés leur permet de résister à l'effet supprimeur des T reg. Plus tard au cours de la réponse, une fois que le GITRL devient limitant, les Treg auraient un avantage à s'y fixer de par leur meilleure expression du GITR et exerceraient alors leurs fonctions suppressives (G. L. Stephens et coll. 2004) (Pour revue (Nocentini et coll. 2005)).

Bien que le rôle du GITR ait tout d'abord été controversé, de par son implication dans les fonctions suppressives des Treg, il est maintenant bien établi que le couple GITR/GITRL est un couple de co-stimulation. L'activation du GITR aboutit à une augmentation de prolifération, de sécrétion de cytokines (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 et IL-10) et à une meilleure survie des lymphocytes T, vraisemblablement à l'origine d'une meilleure réponse T CD8 antitumorale (Tone et coll. 2003; Kanamaru et coll. 2004; Cohen et coll. 2006) (Pour revue (Shevach et coll. 2006)).

#### vi. CD30/CD30 Ligand

Le couple CD30/CD30L est proche du couple OX40/OX40L, puisque comme OX40, CD30 est exprimé préférentiellement par les lymphocytes Th2 (Romagnani et coll. 1995a). Le CD30 est inductible à la surface des lymphocytes suite à une stimulation du TCR. Le CD30L est exprimé par les lymphocytes T activés et par les lymphocytes B au repos. Comme pour les autres membres de la famille, l'engagement du CD30 augmente la prolifération et la sécrétion de cytokines (Romagnani et coll. 1995b; Tarkowski 2003). De fait, il jouerait un rôle important dans l'immunité anti-tumorale (Granados et coll. 2004).

#### vii. CD40/ CD40 ligand

Le CD40 est exprimé constitutivement par les lymphocytes B et les cellules dendritiques. La source majeure de CD40L (CD154) est fournie par les lymphocytes T activés. L'interaction CD40/CD40L fournit des signaux de survie et de prolifération aux lymphocytes B (Gordon 1995). Elle favorise leur différenciation en plasmocytes et participe à la commutation isotypique des immunoglobulines (Kawabe et coll. 1994). Chez l'homme, l'expression de formes mutées de CD154 est associée à un syndrome hyper-immunoglobulinémie M (DiSanto et coll. 1993). La stimulation du CD40 des cellules dendritiques leur fournit un second signal de maturation (Cella et coll. 1996) induisant une augmentation d'expression de molécules de co-stimulation (CD80 et CD86 et 4-1BBL) favorisant ainsi indirectement l'activation T (Futagawa et coll. 2002).

### Modèles d'études des molécules de costimulation : les cellules présentatrice d'antigènes artificielles

Différents outils ont été développés pour l'étude des signaux de co-stimulation, la plupart du temps, ces techniques ont été développées pour l'amplification *ex vivo* de lymphocyte T spécifiques ou non d'antigènes.

#### i. Méthodes non spécifiques d'antigènes

##### Outils cellulaires

Il peut s'agir de lignées transfectées comme la lignée K562 transfectée par le CD32 (appelée lignée K32) et du 4-1BBL humain. Ces cellules expriment naturellement ICAM-

1 et LFA-1, mais pas de molécules HLA. Le CD32 est le récepteur Fc $\gamma$  de faible affinité, ce qui permet de charger ces cellules de manière exogène avec des anticorps tels que l'anti-CD3 et l'anti-CD28. Ce modèle (K32/anti-CD28/anti-CD3/CD137L) a été développé par Maus et al afin d'étudier le rôle du 4-1BB ligand pour l'amplification de lymphocytes T humain (Maus et coll. 2002). Récemment, un modèle très proche (K32/CD86/anti-CD3/CD137L) a également été utilisé ex vivo (Gong et coll. 2008). Un autre équipe a utilisé ce modèle (K32/anti-CD28/anti-CD3/CD137L) comme vaccin cellulaire (Yan et coll. 2008)

D'autres stratégies sont basées sur l'utilisation de lignées non humaines comme source de lignées présentatrices d'antigènes spécifiques. Ainsi, l'équipe de Sadelain utilise une lignée de fibroblastes murins transfectée par des vecteurs rétroviraux codant pour un complexe HLA-peptide donné, ainsi que pour des molécules de co-stimulation comme B7.1, ICAM-1 et LFA-3 (Latouche et coll. 2000; Papanicolaou et coll. 2003; Dupont et coll. 2005).

#### Outils acellulaires

D'autres équipes cherchent à développer des méthodes acellulaires, ces méthodes présentent un intérêt fondamental pour deux raisons. Elles permettent de contrôler de façon précise la quantité et la stœchiométrie des signaux requis pour amplifier des lymphocytes T. Elles permettent également d'étudier le rôle particulier de chaque ligand sur le devenir de la population à étudier. Puis, pour un aspect pratique, il est séduisant de pouvoir se passer de cellules nourricières et de lignées présentatrice d'antigène, dont l'utilisation impose de lourdes contraintes de sécurisation sanitaire. De plus, l'utilisation de ligands recombinants immobilisés sur des supports inertes permet de développer des méthodes plus reproductibles. Comme pour les méthodes cellulaires, on distingue des méthodes non spécifiques d'antigènes et des méthodes spécifiques.

Une méthode d'amplification non spécifique des lymphocytes T est représentée par l'utilisation de billes sur lesquelles sont immobilisés de l'anti-CD3 associé à de l'anti-CD28. Cette technologie a été développée par la société Dynal. Plus récemment, la société Miltenyi a développé une technique très similaire, utilisant des billes plus petites et d'une autre nature physico-chimique sur lesquelles sont immobilisés de l'anti-CD3, de l'anti-CD2 et de l'anti-CD28.

#### ii. Méthodes spécifiques d'antigènes

Récemment, une méthode d'amplification des lymphocytes T spécifiques en système acellulaire a été développée. Elle utilise des molécules de CMH-peptide recombinant (chimérique et dimérisé par un fragment Fc) associées à de l'anti-CD28 immobilisés sur des billes magnétiques. Cette technique a été utilisée comparativement à des cellules dendritiques chargées en peptide pour amplifier des lymphocytes anti-pp65 et anti-Melan-A/MART-1. Le protocole consiste à re-stimuler les populations 3 fois, à une semaine d'intervalle en présence d'IL2. Les auteurs montrent que cette méthode permet d'obtenir des pourcentages de cellules spécifiques importants, identiques à ceux qu'ils obtiennent avec des DC pour les lymphocytes T anti-pp65 (de 58 à 92% de cellules spécifiques), et globalement supérieurs pour les lymphocytes T anti-Melan-A/MART-1 (Oelke et coll. 2003).

D'autres types de supports peuvent être utilisés, comme des billes en latex (Tham et coll. 2001) ou des liposomes (B Prakken et coll. 2000). Récemment des billes de latex ont été utilisées. Elles ont servi de support à des monomères HLA-A\*0201/ELA recombinant et à différents ratio d'anticorps anti-CD28 ou anti-4-1BB ligand (Rudolf et coll. 2008). La méthode utilisant des liposomes a été mise à profit pour amplifier des lymphocytes T CD4 ou pour étudier l'interaction CMH classe II/TCR (Caserta et coll. 2008).

### **La synapse immunologique et la transmission du signal d'activation**

L'induction de la réponse immunitaire des lymphocytes T commence par un contact correct et suffisamment long du TCR avec le complexe CMH/peptide dont il est spécifique. La qualité de cette première rencontre est soumise à de nombreuses contraintes comme la faible affinité du TCR pour le CMH-peptide ou la faible quantité des molécules du CMH à la surface de la cellule présentatrice d'antigène. Les lymphocytes correctement activés vont initier un processus d'expansion clonale et de différenciation. Longtemps, le modèle de mosaïque fluide proposé par Nicolson en 1972 (Singer et coll. 1972) a été considéré comme la structure de référence de la membrane plasmique. Le concept de radeau lipidique ou « lipid raft », n'a été introduit qu'en 1992, par Brown et Rose (D. A. Brown et coll. 1992), ces structures ont été visualisées pour la première fois par Simon et Ikonen en 1997 (Simons et coll. 1997). Par la suite, différentes études ont montré la nécessité du recrutement des complexes TCR/CD3 au sein de ces micro-domaines riches en phospholipides dans lesquels sont concentrées les

protéines participant à la transduction du signal (Moran et coll. 1998). Actuellement de part certaines analogies avec la synapse neuronale, la zone de contact temporaire formée par la cellule présentatrice d'antigène et le lymphocyte T est appelée synapse immunologique.

### La synapse immunologique

L'existence d'une telle structure était suspectée depuis le milieu des années 80 (Norcross 1984) et c'est Grakoui *et coll.* qui ont été parmi les premiers à montrer que le contact entre un lymphocyte T CD4 et la CPA passe par la formation d'une synapse immunologique (Grakoui et coll. 1999). Actuellement, différents types d'organisation de synapse immunologique sont décrits, ils varient notamment en fonction des types cellulaires interagissant. Nous ne décrivons, ici, que l'interaction entre un lymphocyte T et une cellule dendritique. Entre ces deux types cellulaires, la synapse immunologique se définit comme une zone de contact membranaire dont l'arrangement moléculaire est organisé en structure concentrique (cf. Figure 4):

- La partie centrale est appelée **cSMAC** (*central Supramolecular Activation Cluster*) elle est riche en complexes TCR/CD3, en molécules de co-stimulation ainsi qu'en molécules effectrices de la signalisation, comme la protéine kinase C-theta
- Les molécules d'adhésion sont situées autour de cSMAC : **pSMAC** (*peripheral Supramolecular Activation Cluster*), on y retrouve de fortes densités de LFA-1 ainsi que certaines protéines capables d'interagir avec le cytosquelette d'actine.
- Encore plus en périphérie de **pSMAC**, on retrouve de grosses molécules encombrantes comme le CD43, CD44 ou le CD45. Cette région la plus éloignée de cSMAC est appelée dSMAC (*distal Supramolecular Activation Cluster*).

Cette description de la synapse immunologique correspond à une « photographie » de ce que l'on appelle « synapse mature » entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice d'antigène. En effet, la synapse immunologique est une organisation dynamique qui passe par plusieurs stades : une synapse « immature » initiale, avec des TCR périphériques, et la synapse « mature », avec une agrégation centrale des TCR. La transduction du signal étant engagée dès le stade « immature » (Lee et coll. 2002).

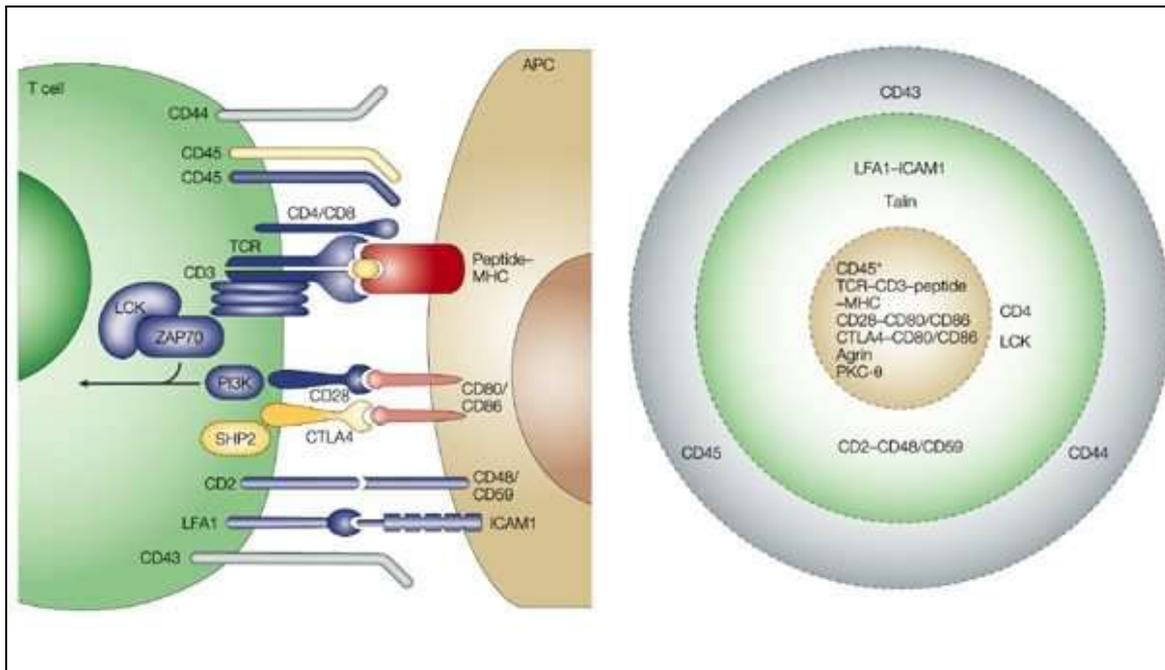


Figure 4 : la synapse immunologique mature (Huppa et coll. 2003).

#### Transmission du signal d'activation

Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR disposent d'un domaine intracytoplasmique trop court pour pouvoir jouer un rôle dans la transduction d'un signal d'activation. Ce rôle est tenu par le complexe CD3 constitué de sous-unités ( $\gamma\delta\epsilon_2\zeta_2$ ) qui possèdent dans leurs parties intracytoplasmiques des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). L'interaction du TCR avec l'antigène entraîne la redistribution de différentes molécules et le déclenchement d'une série de réaction enzymatique impliquant la phosphorylation de ces motifs ITAM par deux protéines à activité tyrosine kinase : p56lck et p59Fyn (pour revue, (Cambier 1995). C'est le CD8 qui est en grande partie responsable du recrutement de p56lck au niveau du complexe TCR/CD3 (Veillette et coll. 1988; Turner et coll. 1990). La p56lck phosphoryle et active la ZAP-70 associée aux chaînes  $\zeta$  du CD3, qui par son activité kinase propre phosphoryle, entre autres, LAT (Linker for Activation of T-cell). LAT est une protéine d'échafaudage dont le rôle est de recruter les effecteurs plus en aval. Le recrutement et l'activation successive de plusieurs protéines conduit à la formation du signalosome, à l'origine des quatre grandes voies la signalisation (cf. Figure 5):

- La voie dépendante du calcium qui aboutit à l'activation du facteur de transcription NF-AT (*Nuclear Fator of Activated T cells*) et à sa translocation dans le noyau,
- La voie dépendante de la Protéine Kinase C (PKC) qui aboutit à l'activation du

facteur de transcription NF- $\kappa$ B et à sa translocation dans le noyau,

Ces 2 premières voies sont initiées par l'activation de la phospholipase C $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) ;

- La voie ERK qui aboutit, via des protéines Ras, à l'activation du facteur de transcription c-Fos,
- La voie JNK qui aboutit, via des protéines Rac, à l'activation du facteur de transcription c-Jun.

L'activation de ces différentes voies induit l'expression de plusieurs gènes dont celui de l'IL-2.

Cependant ces voies activatrices, initiées par des protéines kinases, sont modulées par des molécules possédant une activité tyrosine phosphatase. Ces protéines, via leur domaine SH2 vont pouvoir s'associer aux motifs ITIM phosphorylés (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*) et réguler négativement le signal d'activation (pour revue, (Vivier et coll. 1997)).

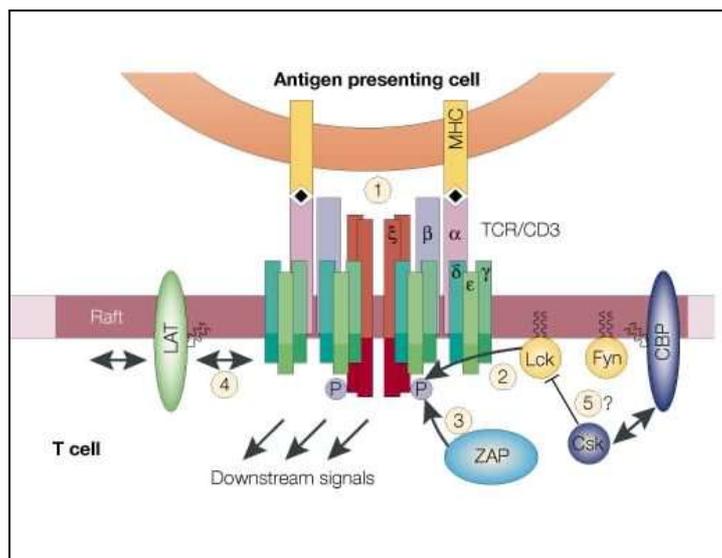


Figure 5 : événements intracellulaires de transduction du signal d'activation par le complexe TCR/CD3. ① l'interaction ligand récepteur induit ② la phosphorylation des motifs ITAM par des protéines tyrosine kinase (lck, fyn...) ③ qui deviennent des ligands de hautes affinité pour la protéine ZAP-70 ④ qui peut à son tour activer d'autres protéines comme LAT. l'activation de différentes cascades moléculaires aboutissant à la transcription de différents gènes (Simons et coll. 2000).

## La phase d'expansion clonale

Une fois activés, les lymphocytes T entrent dans une phase d'intense prolifération. Certaines études ont montré que les lymphocytes T naïfs pouvaient se diviser 7 à 15 fois durant la première semaine d'infection (Butz et coll. 1998). Ces divisions successives ne

nécessitent plus la présence de l'antigène (Stipdonk et coll. 2001). Les cellules activées expriment de nouvelles molécules de surface caractéristiques, comme le CD69, le CD38, les molécules de classe II, 4-1BB, CD25. L'expression de certaines molécules est perdue suite à l'activation, comme l'expression de CD27, CD62L et CCR7. La perte du CCR7 est associée à l'acquisition par les cellules effectrices de la capacité à migrer vers les organes périphériques, où ils exerceront leurs fonctions effectrices ( von Andrian et coll. 2000).

La prolifération est associée à une différenciation en cellules effectrices, caractérisées par leur capacité à sécréter des cytokines et à lyser les cellules cibles.

### **Sécrétion de cytokines**

La transduction du signal d'activation par le TCR aboutit *in fine* à l'expression de nombreux gènes nouveaux qui ne sont pas exprimés par les lymphocytes T naïfs. La principale cytokine produite par les lymphocytes T CD8 est l'IFN- $\gamma$ . L'IFN- $\gamma$  inhibe la réplication virale et augmente l'expression des CMH de classe I et II. Cette cytokine active les macrophages et les recrute au site d'activation. Une deuxième cytokine produite par les lymphocytes T CD8 est le **TNF- $\alpha$** , qui agit en synergie avec l'INF- $\gamma$  pour activer les macrophages.

Les lymphocytes T CD8 activés acquièrent également, dans une certaine mesure, la capacité à sécréter de l'IL-2 (pour revue, (Sprent et coll. 2002), qui favorise la différenciation des lymphocytes T activés en effecteurs. L'IL-2 a d'abord été caractérisée comme étant un facteur prolifératif des lymphocytes T (TCGF : *T Cell Growth Factor*). C'est la cytokine la plus largement utilisée dans les cultures *in vitro* de lymphocytes T et elle joue un rôle double dans le contrôle de l'activation T. Elle n'est produite que par les lymphocytes T activés (cf. Figure 11). L'activation induit parallèlement l'expression membranaire de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (CD25) permettant la formation du récepteur de haute affinité (IL-2R $\alpha\beta\gamma$ ). Ainsi, l'IL-2 est capable d'exercer une action autocrine positive sur les lymphocytes T CD8 (Smith 1988). Néanmoins, l'IL-2 qui agit sur les lymphocytes T CD8 est principalement produite par les lymphocytes T CD4. Les lymphocytes T CD8 peuvent également sécréter de l'IL-4 et du GM-CSF.

Durant la phase de prolifération, l'IL-2 est un facteur de survie et de prolifération primordial (Van Parijs et coll. 1999).

## **Cytotoxicité**

Un lymphocyte T CD8 effecteur est doué d'une activité cytotoxique à l'égard des cellules contre lesquelles il est dirigé. Les mécanismes de lyse qui induisent l'apoptose des cellules cibles sont principalement de deux types : le système perforine/granzyme et le système Fas/FasL.

- Perforine/granzyme :

Le principal mécanisme d'action des cellules T cytotoxiques est la libération dépendante du calcium de granules lytiques suite à la reconnaissance d'une cellule présentant l'antigène. Ces granules contiennent au moins deux classes différentes de protéines : les perforines et les granzymes.

Les perforines se polymérisent et forment des pores dans la bicouche lipidique induisant une instabilité osmotique et la mort de la cellule cible.

Les granzymes sont des protéases qui, en pénétrant dans la cellule cible, sont responsables de la fragmentation de l'ADN, et de l'apoptose (pour revue (Lieberman 2003)).

- Fas/FasL :

La lyse d'une cellule cible par un lymphocyte T suite à l'engagement de Fas (CD95) a été mise en évidence plus tardivement. L'engagement du Fas sur une cellule cible par le FasL du lymphocyte T activé aboutit *in fine* à l'apoptose par activation de la voie des caspases (pour revue, (Krammer et coll. 2007)).

La voie perforine/granzyme et la voie Fas ne sont pas utilisées uniformément. La voie perforine/granzyme semble prépondérante pour éliminer les cellules cibles alors que la voie Fas/FasL est plutôt impliquée dans la phase de contraction clonale (pour revue, (Brunner et coll. 2003)). Le TNF produit lors de l'activation a également, mais dans une moindre mesure, une action cytotoxique.

## **Migration vers les tissus périphériques**

Les molécules d'adhérence sont également impliquées dans la migration des lymphocytes T activés vers les tissus périphériques, où ils vont exercer leurs fonctions. Ainsi, l'augmentation d'expression de VLA-4 (*Very Late Antigen*) par les lymphocytes T

activés leur permet d'interagir avec VCAM-1 dont l'expression est induite à la surface des cellules endothéliales activées (Elices et coll. 1990). Les interactions LFA-1/ICAM-1 et CD2/LFA-3 participent également à ce processus (Savage et coll. 1993). De plus, l'expression différentielle des molécules d'adhérence par les sous-populations T peut les orienter vers des sites spécifiques, par exemple, les lymphocytes T qui se localisent dans la peau expriment CLA (*Cutaneous Leucocyte Antigen*) (Le Gal et coll. 2001).

### **Phase de contraction clonale : homéostasie et apoptose**

Une fois que l'infection est jugulée par le système immunitaire et qu'une grande partie des antigènes a été éliminée, la présence d'un grand nombre de lymphocytes activés devient superflue et éventuellement dangereuse.

La phase de contraction clonale est caractérisée par la mort de 90 à 95% des lymphocytes T effecteurs et par le retour au repos de ceux qui restent. Ce processus dépend de nombreux paramètres, dont la vitesse d'élimination de l'agent pathogène, la présence de molécules de co-stimulation et les cytokines de l'environnement.

Les lymphocytes T perdus lors de cette phase meurent par apoptose, selon un mécanisme appelé AICD (*Activation-Induced Cell Death*). Cette apoptose passe principalement par la voie Fas/FasL (Brunner et coll. 2003). Suite à l'activation, les lymphocytes expriment FasL et acquièrent la capacité soit de s'autodétruire par « suicide » soit de se détruire mutuellement (Alderson et coll. 1995). De plus, l'IL-2, durant cette phase de contraction joue un rôle actif pro-apoptotique.

Enfin, le manque de facteurs de survie comme les cytokines (ACAD), qui ont été largement consommées durant la phase de prolifération active également les voies apoptotiques (pour revue, (Krammer et coll. 2007)).

Les mécanismes connus induisant l'apoptose des lymphocytes T sont actuellement au nombre de trois :

- Une voie dite extrinsèque, impliquant des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF,
- Une voie dite intrinsèque mettant particulièrement en jeu la mitochondrie; cette voie est gouvernée par des protéines appartenant à la superfamille de Bcl-2.

Ces deux voies aboutissent à l'activation de protéases à cystéine appelées caspases, responsables des phénomènes morphologiques et biochimiques observés : exposition des phosphatidylsérines à la surface de la membrane cellulaire, arrêt de la réplication,

fragmentation du noyau et du cytosquelette entraînant la formation de corps apoptotiques phagocytés par les cellules environnantes.

- Une troisième voie, indépendante des caspases, a été décrite plus récemment. Elle peut être induite par plusieurs structures membranaires tel que le récepteur Fas et les récepteurs apparentés dits à domaine de mort. La mitochondrie et L'AIF (Apoptosis Inducing Factor) seraient les acteurs centraux de cette voie.

### **Les acteurs de l'apoptose**

#### Les récepteurs de mort cellulaire

Il existe une famille de récepteurs spécialisés dans l'induction de la mort cellulaire programmée : les récepteurs de mort. Une fois stimulés, ces récepteurs induisent l'activation des caspases (Longthorne et coll. 1997). Ces récepteurs sont classés dans une sous-famille de la superfamille des récepteurs au TNF. Ils se distinguent par la présence d'une séquence cytoplasmique d'environ 80 acides aminés appelée Death Domain (DD). 8 membres sont actuellement identifiés : TNFR1 (*Tumor Necrosis Factor Receptor 1*), CD95 (ou Fas), TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor*), TRAILR2, DR3 (*Death Receptor 3*), DR6, EDAR (*Ectodysplasin A Receptor*) et l'EGFR (*Nerve Growth Factor Receptor*). Deux mécanismes de signalisation existent :

- Le premier fait intervenir le DISC (*Death Inducing Signaling Complex*) qui se forme sur les récepteurs Fas, TRAILR1 ou TRAILR2. La formation de ce DISC induit l'activation de la pro-caspase-8.
- Le second groupe comprend le TNFR1, DR3, DR6 et EDAR qui peuvent transduire à la fois des signaux apoptotiques et des signaux de survie.

Le prototype des récepteurs de mort est Fas, dont le ligand est Fas Ligand (FasL).

#### La famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 ont des fonctions soit pro-apoptotiques soit anti-apoptotiques. En fonction de la présence dans leur structure de domaines BH 1 à 4 (*Bcl-2 Homology Domain*), on peut les classer en 3 sous-familles (Strasser 2005):

- Les membres anti-apoptotiques comme Bcl-2 et BCL-XL (BH1,2,3,4)
- Les membres pro-apoptotiques comme Bax, Bak et Bad (BH1,2,3)
- Les membres pro-apoptotiques n'ayant qu'un seul domaine BH3 comme Bid,

Bim... cette dernière famille joue plus un rôle régulateur qu'exécutif de l'apoptose.

La plupart du temps, ces protéines sont conservées sous forme inactive. En effet, une stratégie mise en jeu par les cellules saines pour maintenir inactives les protéines à un seul domaine BH3 est de les détourner de leur capacité à former des hétérodimères inhibiteurs avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. En provoquant leur interaction avec d'autres composants cellulaires, la cellule assure donc leur séquestration jusqu'à la perception d'un signal apoptotique. Bad et Bim obéissent à une telle stratégie. Dans une cellule non apoptotique, la protéine Bad est phosphorylée, *via* la voie impliquant la protéine kinase Akt/PKB et reste ainsi séquestrée par les protéines 14-3-3 cytosoliques. Lors d'une induction apoptotique, Bad n'est plus phosphorylée, son interaction avec 14-3-3 diminue et elle peut alors interagir avec Bcl-2 ou Bcl-xL et ainsi inhiber leur action anti-apoptotique (Zha et coll. 1996). La protéine Bim est quant à elle séquestrée au niveau du cytosquelette dans les cellules saines. Bim est maintenue inactive par sa liaison avec la chaîne légère LC8 de la dynéine (Puthalakath et coll. 1999). La perception d'un signal apoptotique abroge ces interactions et libère Bim qui est alors à même de neutraliser les protéines anti-apoptotiques.

La mieux connue des protéines de cette sous-famille reste Bid. Le clivage de Bid *in vivo* semble être contrôlé par un phénomène de phosphorylation /déphosphorylation. Elle doit être déphosphorylée pour être clivée et activée par la caspase 8. La caspase 8 produit un fragment C-terminal appelé tBid (pour *truncated c-terminal Bid*). tBid est alors capable d'interagir avec Bax, ce qui facilite l'adressage de Bax aux membranes mitochondriales externes. Bax provoque alors, une modification de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe qui se manifeste par la libération de cytochrome c, AIF, endonucléase G (pour revue (Youle et coll. 2008)).

### Les caspases

Les caspases (*cytinyl-aspartate-requiring proteinase*) jouent un rôle central dans la plupart des mécanismes d'apoptoses. Ce sont des protéases à cystéines qui possèdent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats. Elles sont toutes produites sous forme de zymogène, c'est-à-dire qu'elles doivent subir une action protéolytique pour être activées. Les caspases effectrices doivent être activées par des caspases initiatrices, elles même devant être, dans un premier temps, activées. Les caspases

initiatrices sont caractérisées par la présence d'un domaine de mort (*Death-Effector Domain* : DED) capable d'interagir avec des domaines présents sur les récepteurs de mort, comme le FADD (Chinnaiyan et coll. 1995). Dans le cas des caspases, deux clivages successifs doivent avoir lieu. Elles vont pouvoir s'auto-activer et/ou être activées par d'autres caspases (dites initiatrices), conduisant à des cascades d'activation. Ainsi les caspases activées cliveront à leur tour d'autres caspases à l'état de zymogènes, en particulier les caspases effectrices. Ce type d'organisation permet à la fois de réguler et d'amplifier le signal de mort (pour revue (Brenner et coll. 2008)).

Le rôle des caspases est principalement exécutif: elles vont bloquer les voies protectrices et dans un même temps activer les voies de signalisation participant à la mort cellulaire. Ce sont des enzymes extrêmement sélectives, les protéines cibles sont diverses : protéines cytoplasmiques, nucléaires, des protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN, des protéines kinases, des protéines impliquées dans la transduction du signal et l'expression des gènes, dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération ou la régulation de l'apoptose, *etc.*

### La mitochondrie

La mitochondrie est l'acteur principal impliqué dans la voie intrinsèque de l'apoptose. Divers stimuli (stress génotoxique, ultra-violet, *etc.*) vont provoquer la fuite du cytochrome c par un pore nouvellement créé dans la membrane mitochondriale externe. Le cytochrome c ainsi libéré dans le cytoplasme participe à l'assemblage d'un complexe protéique appelé apoptosome.

La mitochondrie joue un rôle clé dans la régulation de l'apoptose puisque la modification de sa perméabilité conduit au relargage de molécules pro-apoptotiques telles que le cytochrome c, les caspases 2, 3 et 9, l'Apaf-1, l'endonucléase G, ainsi que l'AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) (Zamzami et coll. 1996). La voie de l'AIF interviendrait dans la voie apoptotique indépendante des caspases (Modjtahedi et coll. 2006).

Cette phase de libération est sous le contrôle de membre de la famille Bcl-2, ainsi Bcl-2 est capable de bloquer la sortie du cytochrome c alors que Bax peut l'induire (Kluck et coll. 1997; Jürgensmeier et coll. 1998). L'activation des caspases induite par le cytochrome c cytosolique associé à l'Apaf-1 ou l'apoptose induite par les récepteurs de mort et la libération du cytochrome c ne sont pas des mécanismes totalement indépendants. Bid est le lien entre les récepteurs de mort et la libération de cytochrome

c. Bid est directement clivé par la caspase 8 et permet la libération du cytochrome c. Il semble que la mitochondrie joue un rôle d'intégrateur des différents signaux : lorsqu'un certain seuil de dépolarisation de la membrane mitochondriale est atteint, la totalité du cytochrome c est libérée en une seule étape. Cette libération va permettre la formation de l'apoptosome, un complexe multiprotéique formé par l'interaction du cytochrome c avec l'Apaf-1 et la procaspase 9. L'apoptosome permet le clivage de la pro-caspase 9 qui devient alors active, et qui activera à son tour d'autres caspases effectrices (pour revues (Brenner et coll. 2008)).

### **Les mécanismes moléculaires de l'apoptose**

#### **Voie extrinsèque**

Dans la voie extrinsèque (cf. Figure 6), la cascade d'activation des caspases est induite suite à la stimulation des récepteurs de mort cellulaire et à la formation d'un complexe protéique membranaire le DISC. Nous décrivons dans ce paragraphe le mécanisme d'activation du récepteur Fas, considéré comme le prototype de ces récepteurs.

Une fois stimulé par son ligand spécifique, le récepteur Fas se trimérise et devient apte à recruter une protéine adaptatrice FADD qui présente la particularité de posséder, en plus de son domaine de mort (DD), un domaine effecteur de mort (DED). Le DD de Fas interagit avec le DD de FADD, alors que le DED de FADD interagit avec le DED de la procaspase-8 ou de la procaspase-10. La proximité de deux procaspases-8 au sein du DISC, semble être responsable de leurs activations protéolytique (Boatright et coll. 2003) (pour revue (Lavrik et coll. 2005)). Ces 2 caspases sont les caspases initiatrices de la voie extrinsèque.

En se basant sur l'implication de la mitochondrie dans la voie apoptotique induite par les récepteurs de mort, l'équipe de Krammer a proposé l'existence de deux types de voies extrinsèques (Scaffidi et coll. 1998):

- Le type I est caractérisé par la formation de grandes quantités de caspase-8 par le DISC. La caspase 8 libérée du DISC active les caspases 3, 6 et 7.
- Dans le type II, la faible quantité de DISC formée ne conduit qu'à une faible quantité de caspase 8 active. Cependant cette petite quantité est suffisante pour entraîner le clivage du membre de la famille Bcl-2 Bid en tBid. t-Bid induit alors

l'agrégation de Bax responsable de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe à l'origine de la libération de cytochrome c, d'ATP, de l'Apaf-1 et de la procaspase-9 qui vont former l'apoptosome. La caspase 9 va pouvoir cliver et donc activer les caspases 3, 6 et 7

(Pour revue : (Krueger et coll. 2003)).

### Voie intrinsèque

Dans cette voie, la cascade d'activation des caspases peut être dûe à différents stimuli, comme la stimulation du TCR, les radiations UV, une carence en cytokine, les dommages de l'ADN, etc. Cette voie dépend principalement de la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. La mitochondrie semble jouer le rôle d'intégrateur de nombreux signaux apoptotiques intra- et extra-cellulaire. Les membres de la superfamille Bcl-2 jouent également un rôle crucial. Lors d'un signal apoptotique, la membrane mitochondriale se perméabilise ce qui entraîne de la libération de cytochrome c, d'Apaf-1 d'ATP et de procaspase-9 aboutissant à la formation de l'apoptosome. Une fois activée, la caspase-9 initiatrice va activer les caspases effectrices 3,6 et 7. Pour revue (Krammer et coll. 2007).

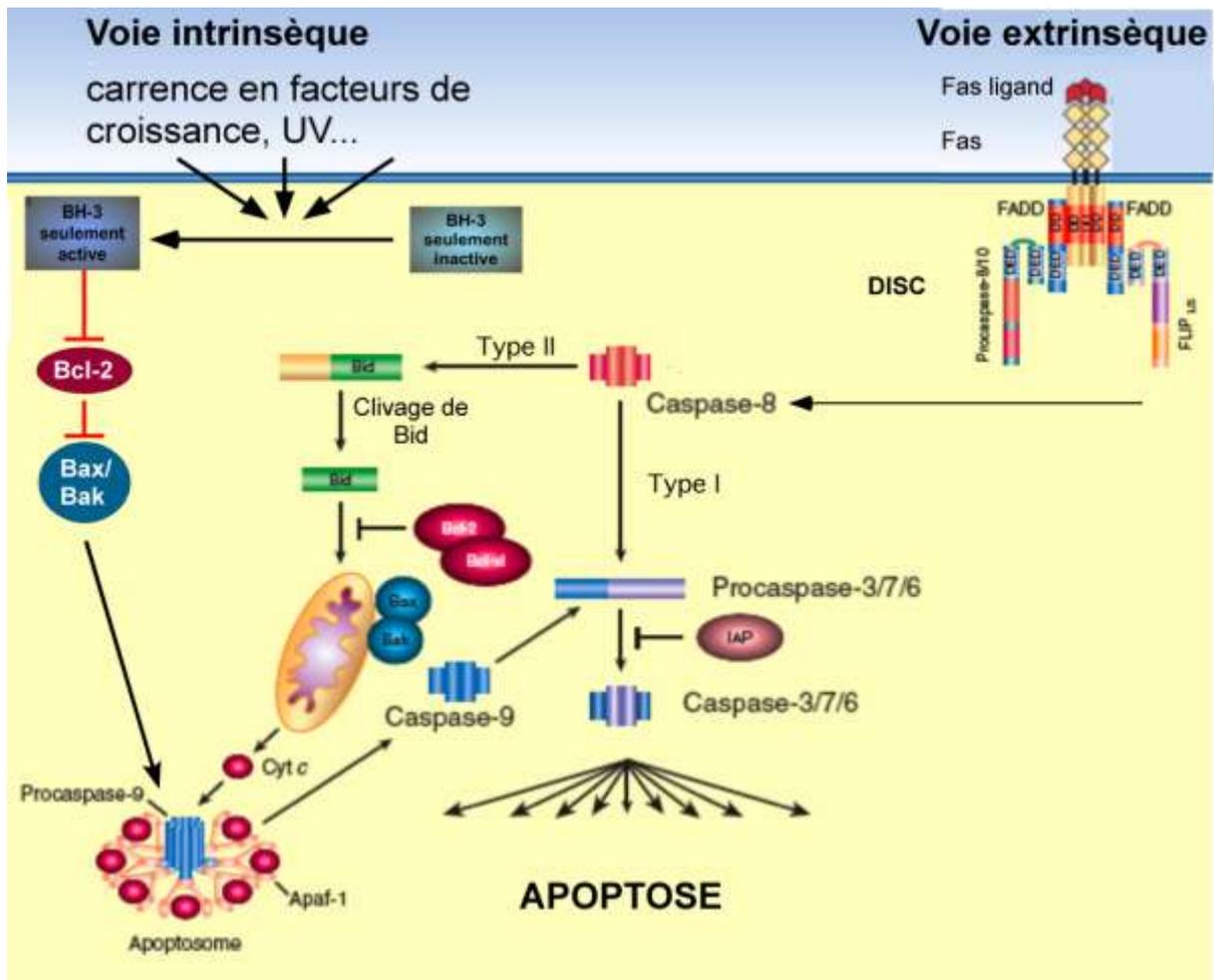


Figure 6 : Les voies de l'apoptose.  
D'après (Lavrik et coll. 2005; Youle et coll. 2008)

### Le contrôle de la réponse immunitaire

L'activation et la prolifération des lymphocytes T sont des caractéristiques de la réponse immune adaptative. Si une expansion clonale est indispensable à l'élimination d'un antigène, la plupart des lymphocytes T doivent être éliminées. Ainsi durant la phase de prolifération, les lymphocytes T deviennent plus sensibles à l'induction de l'apoptose.

#### L'AI CD ou Activated-Induced Cell Death

Cette voie est induite à la suite de re-stimulation de lymphocytes T déjà activés en l'absence de signaux de co-stimulation appropriés. Ces stimulations successives induisent l'expression de FasL (et d'autres récepteurs de mort cellulaire, comme TNF-R1, TRAIL-R) par les lymphocytes T. L'expression du Fas étant constitutive sur les lymphocytes T, l'apoptose induite par l'interaction Fas/FasL peut atteindre soit une cellule voisine (mort fratricide) soit la cellule elle-même. (mort par suicide).

### L'ACAD ou Activated-Cell Autonomous Death

Suite à l'activation du lymphocyte T, l'absence de signaux de survie appropriés, comme des carences en cytokine, entraîne une augmentation de l'expression du membre de la famille Bcl-2, Bim. Bim interagit alors avec Bcl-x<sub>L</sub>, ce qui abroge l'inhibition des membres pro-apoptotiques Bax ou Bak et conduit à la libération de cytochrome c et l'induction de la voie intrinsèque de l'apoptose.

### La voie indépendante des caspases

Si les caspases sont les médiatrices essentielles de l'AICD ou de l'ACAD, l'apoptose ne dépend pas d'une seule famille de protéase. De fait, d'autres enzymes, n'appartenant pas au groupe des caspases, sont également impliquées dans la mort des lymphocytes T, il s'agit de l'AIF et de l'endonucléase G. Cette voie peut être activée par les récepteurs de mort cellulaire ou suite à des altérations de l'ADN, elle aboutit à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et à la libération des enzymes protéolytiques. Les lysosomes et le réticulum endoplasmique jouent un rôle central dans ce mécanisme.

## **Génération du répertoire mémoire**

Certaines cellules, ayant déjà rencontré l'antigène, échappent à la contraction clonale et peuvent persister durant de longues périodes, il s'agit des lymphocytes mémoires, il en existe deux types. D'une part les cellules mémoires effectrices qui vont permettre l'élimination immédiate des cellules infectées. D'autre part les cellules mémoires centrales qui sont capables de produire des lymphocytes T effecteurs plus rapidement et pour des doses d'antigènes plus faible que lors d'une réponse primaire impliquant des cellules T naïves.

Les mécanismes qui gouvernent la constitution du répertoire mémoire restent largement inconnus, néanmoins la génération des cellules mémoire semble débiter dès la première rencontre antigénique (pour revue (Williams et coll. 2007)). Deux modèles différents ont été proposés :

- Des stimulations antigéniques répétées des lymphocytes T CD8 entraînent plusieurs cycles de divisions successives. Dans ce cas, la différenciation et l'expansion est un modèle séquentiel (Lanzavecchia et coll. 2002).
- Une stimulation de courte durée suffit à faire entrer les lymphocytes T CD8 dans le programme de différenciation, mais, dans ce cas le nombre de cellules n'est pas

très important (van Stipdonk et coll. 2001). Dans ce modèle, la qualité et le contexte dans lequel le signal initial est donné a un impact sur la différenciation des lymphocytes (Masopust et coll. 2004).

Quoi qu'il en soit, la rencontre initiale, au cours de laquelle les cellules dendritiques présentent leur antigène cible aux lymphocytes T naïfs, est un élément décisif pour la génération du répertoire mémoire. Des études chez la souris ont montré que cette interaction démarre par une polarisation de la cellule dendritique, qui tend ses dendrites vers le lymphocyte, suivie de trois phases. Premièrement, pendant les huit premières heures, des séries de contacts brefs de l'ordre d'une minute; puis, pendant les douze heures suivantes, une série de longs contacts de plusieurs heures aboutissant à la production de cytokine enfin, à partir du second jour, à nouveau des séries de contacts brefs coïncidant avec la phase de prolifération. L'ensemble pouvant durer jusqu'à trois jours (Hugues et coll. 2004; Mempel et coll. 2004).

Par ailleurs, la durée d'engagement entre le lymphocyte T et la cellule dendritique semble avoir un rôle majeur. En effet si un contact de courte durée est suffisant à l'expansion clonale et à la différenciation des lymphocytes T naïfs (van Stipdonk et coll. 2001), un contact prolongé est nécessaire à la génération d'une mémoire immunologique. Une étude récente a montré que l'expression de la molécule ICAM par les cellules dendritiques était indispensable à une interaction prolongée entre lymphocytes T CD8 et cellules dendritiques, et qu'il s'agit d'un pré-requis indispensable à la génération d'une mémoire efficace (Scholer et coll. 2008).

Plusieurs modèles de différenciation des lymphocytes T naïfs en cellules effectrices et mémoires ont été proposés. Ces études reposent sur l'observation de sous-populations lymphocytaires mémoires ayant des caractéristiques différentes. Ces sous-populations sont définies sur la base de l'expression d'un ensemble de marqueurs phénotypiques, ainsi que sur l'étude de leurs capacités effectrices.

### **Différenciation des lymphocytes T mémoires**

La plupart des connaissances concernant le développement et les caractéristiques des cellules mémoires ont été acquises grâce à l'étude de modèles viraux. Cependant, si les connaissances de l'immunité anti-tumorale sont moins vastes, les trois phases décrites dans les modèles viraux (expansion, contraction et génération de cellules mémoire) ont également été décrites dans des modèles tumoraux (Hwang et coll. 2006).

Contrairement aux cellules naïves qui ne se divisent normalement pas, le maintien des lymphocytes T mémoires est la résultante d'un taux faible de prolifération associé à des signaux cytokiniques de survie (IL-7, IL-15) (Goldrath et coll. 2002a). Cette survie est indépendante du CMH-peptide ; des lymphocytes T CD8 transférés à des souris classe I déficientes ( $\beta 2m^{-/-}$ ) survivent très bien à long terme (Murali-Krishna et coll. 1999). Dans ce contexte, les lymphocytes T CD4 jouent un rôle important : en leur absence, la persistance et la fonctionnalité des cellules mémoires, et par conséquent la réponse secondaire, sont fortement altérées (Sun et coll. 2003; Janssen et coll. 2003).

#### *L'importance du 2<sup>nd</sup> signal*

La génération de lymphocytes T cytotoxiques nécessite un second signal. Le CD28 durant la première rencontre antigénique permet l'expansion et la survie et la production d'IL-2 par les lymphocytes répondeurs (Sharpe et coll. 2002). Ce co-signal est particulièrement important lorsque le signal TCR est faible ou de courte durée.

La seconde molécule importante est le 4-1BB. Les souris déficientes présentent une réponse primaire peu perturbée, mais il est particulièrement important dans la survie des cellules activées dans la phase tardive de la réponse (Bertram et coll. 2002a), ainsi que pour la génération du répertoire mémoire (Myers et coll. 2006).

#### *Le rôle des lymphocytes T CD4*

L'absence de lymphocytes T CD4 est à l'origine du développement de lymphocytes T CD8 mémoires peu efficaces, qui répondent faiblement lors d'un second contact antigénique. Il semble que les CD4 soient important pour l'enclenchement du programme de différenciation dès le premier contact antigénique. Une étude récente suggère que l'interaction entre lymphocytes T CD4 et cellule dendritique crée un gradient de chémokine attirant les lymphocytes T CD8 naïfs sur le site où ils peuvent recevoir l'ensemble des signaux nécessaires à leur différenciation en cellules mémoires (Castellino et coll. 2006). En l'absence de CD4 les lymphocytes T CD8 exprime TRAIL lors qu'une seconde stimulation antigénique. Ces cellules sont destinées à entrer en apoptose (AICD) car elle expriment également le récepteur de mort TRAIL-R (Janssen et coll. 2005).

#### *Le contexte cytokinique*

### iii. L'interleukine-2

L'IL-2, c'est une cytokine indispensable durant la première rencontre antigénique pour obtenir des cellules mémoires. La présence du CD25 augmente d'un facteur 100 l'affinité de l'IL-2. Des souris KO pour le CD25 présentent un nombre important de d'effecteur suite à une première stimulation antigénique, ces effecteurs sont capables de se différencier rapidement en cellules mémoires, mais, ces cellules mémoires sont incapables de répondre correctement à une seconde stimulation antigénique : elles se divisent puis meurent (D'Souza et coll. 2003). Ceci semble indiquer le rôle instructif apporté par l'IL-2 dès la réponse primaire.

Une équipe a montré que l'IL-2 est nécessaire à la réponse des cellules CD8 mémoires lors d'un second challenge antigénique, et qu'elle est indispensable à la prolifération de ces même lymphocytes, en particulier ceux exprimant le CD122 (ou IL-2/IL-15R $\beta$ : chaîne  $\beta$  commune aux récepteurs à l'IL-2 et à l'IL-15) (Williams et coll. 2006; Boyman et coll. 2006).

### iv. L'interleukine-7

L'IL-7 joue un rôle important dans la survie des cellules mémoires durant la phase de contraction clonale. Elle est également importante durant la rencontre initiale, mais ne semble pas suffisante à la formation d'un répertoire mémoire (Sun et coll. 2006). La forte expression du récepteur à l'IL-7 : IL7-R $\alpha$  (CD127) est corrélé avec l'expression de Spi6 (*Serine protease inhibitor 6*) qui protège la cellule de ses propres granules de granzymes. La sur-expression de Spi6 est corrélée à un nombre plus important de lymphocytes T mémoires (Zhang et coll. 2006).

## **Classification des sous-populations lymphocytaires**

Différents marqueurs sont utilisés pour étudier la différenciation des lymphocytes T. On peut distinguer différentes catégories de marqueurs selon leur rôle :

- Le CD45R est une phosphatase transmembranaire qui participe à la transduction activatrice du signal par le TCR (Trowbridge et coll. 1994). Le CD45R existe sous deux isoformes, CD45RO et RA qui sont issues d'un épissage alternatif (Streuli et coll. 1987)
- Les molécules d'adhérence : le CD62L est une sélectine et le CD49d (VLA A4), le CD49e (VLA A5), le CD18 (LFA-1), le CD58 (LFA-3) et le CD29 sont des intégrines.

Le CCR7 est un récepteur de chémokines qui induit la migration des lymphocytes T vers les ganglions lymphatiques (Förster et coll. 1999).

- Les molécules d'activation ou de co-stimulation : CD27 et CD28
- Des récepteurs de cytokines : le CD127 (IL-7R $\alpha$ )

Les marqueurs plus fréquemment utilisés sont : le CD45RA, CD45RO, le CD62L, le CCR7, le CD27, le CD28, le CD127. Au cours du temps différents modèles ont été proposés.

### Les différents modèles de différenciation

#### i. Modèle de Hamann et al.

Les premières classifications décrites ne tenaient pas compte des spécificités antigéniques et ont analysé l'ensemble des CD8. Une description des différentes sous-populations lymphocytaires T CD8 mémoires dans le sang périphérique a été faite par Hamann *et al.*. Cette classification est basée sur l'expression des marqueurs CD45RA et CD27 en association avec des molécules d'adhérence (CD62L et intégrines CD49d, CD49e, CD18, CD29), d'activation ou de co-stimulation (CD27 et CD28). Cette étude est complétée par la description des capacités fonctionnelles des différentes sous-populations (Hamann et coll. 1997b). Trente donneurs ont été analysés, ce qui permet d'estimer la représentation de chaque sous-population, dans le sang périphérique (cf. Figure 7):

- 55% des cellules sont naïves : **CD45RA+/CD45RO-/CD27+/CD28+/CD62L+** et peu cytotoxiques
- 45% des cellules sont mémoires
  - 30% des cellules sont mémoires **CD45RA-** et produisent IL2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 
    - dont 4% CD27- (CD28+/-)
    - 25% **CD27+CD28+** et sont cytotoxiques après re-stimulation
  - 15% des cellules sont mémoires **CD45RA+** et sont **CD27-/CD28-/CD62L-** sont très cytotoxiques (production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ ) , mais produisent peu d'IL2

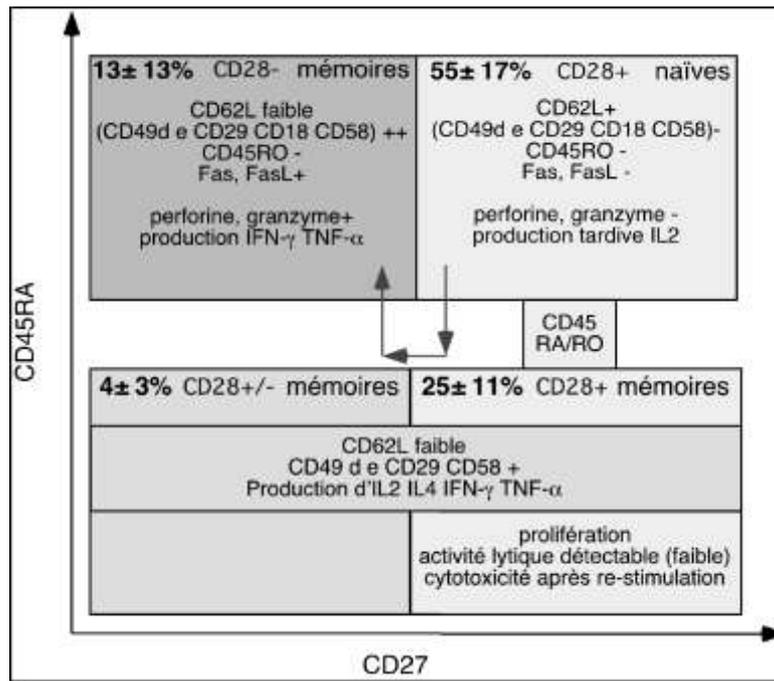


Figure 7 : modèle de différenciation des LT mémoire de Hamann (Hamann et coll. 1997b)

## ii. Modèle proposé par Sallusto *et al.*

Sur la base de l'expression du CD45RA, du CCR7 et du CD62L une autre classification a été proposée par Sallusto *et al.*. Bien que l'étude concerne les lymphocytes T CD4, la classification proposée est largement utilisée comme référence. Deux types de lymphocytes T mémoires ont été décrites en fonction de leur phénotype, de leur localisation et de leurs fonctions: les lymphocytes T mémoires centraux ( $T_{CM}$ ) et les mémoires effecteurs ( $T_{EM}$ ) (Sallusto et coll. 1999) :

Les  $T_{CM}$  expriment les marqueurs CD62L et CCR7, molécules nécessaires à l'extravasation et à la migration vers les ganglions lymphatiques. Ces cellules sont présentes dans le sang, les organes lymphoïdes secondaires ainsi que dans la moëlle osseuse (Mazo et coll. 2005). Ces cellules sont dépourvues d'activité effectrice véritable (faible sécrétion d'INF- $\gamma$  et de granules cytolytiques), mais ont une grande capacité proliférative (forte sécrétion d'IL-2), permettant de régénérer le stock de  $T_{EM}$ .

Les  $T_{EM}$  n'expriment peu ou pas de CD62L et CCR7. On trouve ces cellules dans les tissus périphériques, au plus proche des sites de réinfection potentiels. Ces cellules sont très cytotoxiques et joueraient le rôle de « sentinelle » permettant une réponse immédiate au niveau périphérique.

iii. Le modèle proposé par Appay *et al.*

Appay *et al.* ont proposé un schéma de différenciation des lymphocytes T CD8 suite à l'étude du phénotype des lymphocytes T spécifiques d'épitopes viraux (antigènes de l'EBV, du CMV, du HIV et du HCV (Appay et coll. 2002). Ils montrent que selon l'antigène considéré, les cellules mémoires spécifiques ne présentent pas des phénotypes identiques. Leur analyse rejoint celle de Hamann *et al.*, puisqu'ils proposent qu'au cours de la différenciation, les cellules passent d'un stade de meilleure capacité proliférative (molécules de co-stimulation+, perforine faible) à un stade de meilleure fonction cytotoxique (perforine fort et granzyme+). L'évolution progressive entre ces deux populations s'accompagne de changement phénotypique des marqueurs CD28 et CD27. Les cellules spécifiques sont d'abord **CD28+CD27+** (précoce), puis **CD28-CD27+** (intermédiaire) puis **CD28-CD27-** (tardives) (cf. Figure 8).

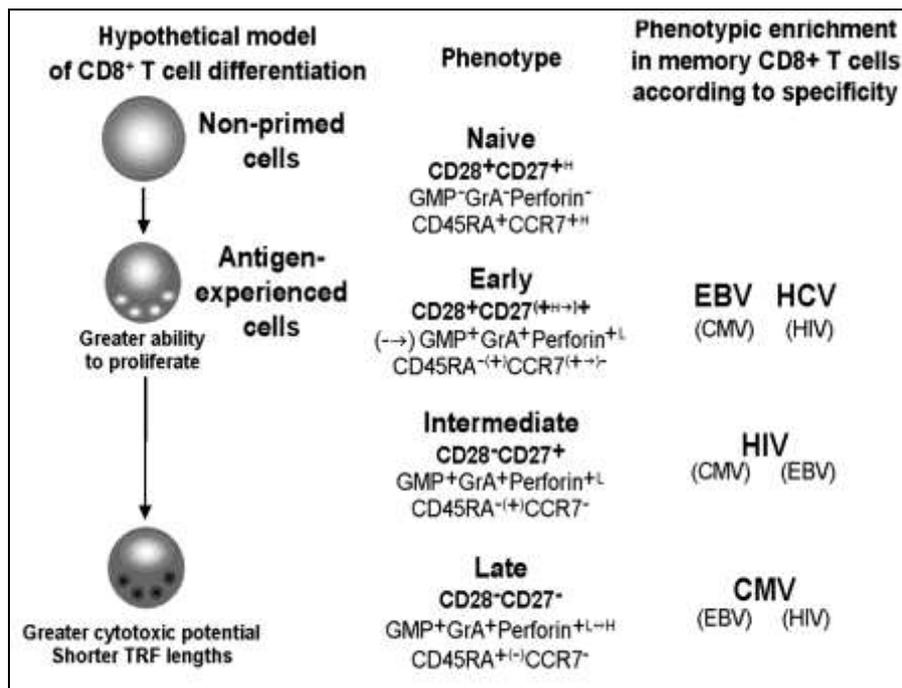


Figure 8 : modèle de différenciation des LT mémoire de Appay *et al.* (Appay et coll. 2002).

iv. Modèle proposé par Roméro *et al.*

Récemment une étude multiparamétrique des marqueurs phénotypiques des lymphocytes T CD8 de 15 donneurs sains a été publiée par Romero *et al.* (Romero et coll. 2007). Elle définit 4 sous-populations en fonction des molécules CD45RA/CCR7 et des sous-populations en fonction du CD27 et du CD28

- Naïfs : CCR7+/CD45RA+/CD27+/CD28+(33%)
- T<sub>CM</sub> : CCR7+/CD45RA-/CD27+/CD28+ (5%)
- T<sub>EM</sub> : CCR7-/CD45RA-
  - T<sub>EM1</sub> : CD27+/CD28+ : 21%
  - T<sub>EM2</sub> : CD27+/CD28- : 2%
  - T<sub>EM3</sub> : CD27-/CD28- : 2%
  - T<sub>EM4</sub> : CD27-/CD28+ 2% = T<sub>EM1</sub>
- T<sub>EFF</sub> ou T<sub>MRA</sub> : CCR7-/CD45RA+
  - E : CD27-/CD28- 22%
  - pE1 : CD27+/CD28+ :4%
  - pE2 : CD27+/CD28- 7%

Au fur et à mesure de leur différenciation, les cellules présentent des télomères de plus en plus courts et augmentent leur capacité de cytotoxicité. La progression suggérée par cette analyse multiparamétrique est schématisée sur la Figure 9.

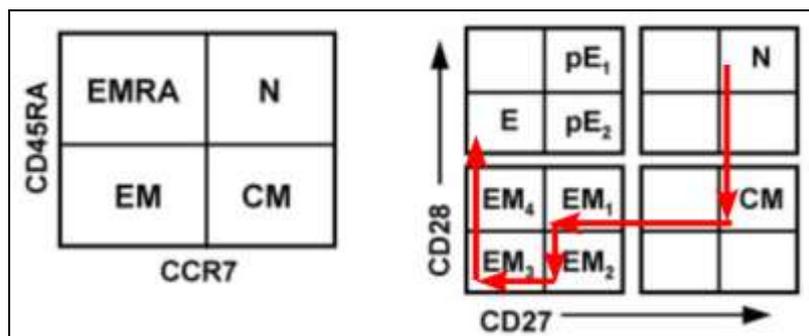


Figure 9 : différentes populations de lymphocytes T CD8+  
 En fonction des marqueurs CD45RA/CCR7/CD27 et CD28. En rouge schéma évolutif hypothétique suggéré par la longueur des télomères et les capacités cytotoxiques. D'après les auteurs : EM1 et EM4 seraient les mêmes populations (Romero et coll. 2007).

### Cas des stimulations antigéniques chroniques

Des modèles d'infections virales chroniques ont montré une altération de la réponse immune concernant l'acquisition et l'amplitude fonctions effectrices ainsi que les capacités prolifératives (Klenerman et coll. 2005). Ces altérations ont également été décrites dans des modèles tumoraux puisque des stimulations gp100 répétées aboutissent également aux mêmes effets (Overwijk et coll. 2003). En plus de ces altérations fonctionnelles, ces cellules présentent également des signes de sénescence comme l'expression du CD57, de KLRG-1 et une réduction de la longueur des télomères

(Brenchley et coll. 2003; Thimme et coll. 2005; Papagno et coll. 2004). Les cellules les plus touchées seraient celles dirigées contre des épitopes immunodominants (John Wherry et coll. 2003) (cf. Figure 9).

En plus ces changements fonctionnels, les cellules soumises à des stimulations antigéniques répétées ont également un phénotype modifié. Par exemple, des immunisations répétées par le peptide gp100 entraînent la perte des marqueurs CD62L et CCR7 ( $T_{CM}$ ), générant ainsi principalement des  $T_{EM}$  et des  $T_{EFF}$  (effecteurs mémoires terminaux) ayant des capacités protectrices moindre que les  $T_{CM}$  (Powell et coll. 2004)

Par ailleurs, ces cellules perdent progressivement l'expression des récepteurs à l'IL-7 ( $IL-7R\alpha$ ) ainsi que la chaîne  $\beta$  du récepteur à l'IL-2/IL-15. Cytokines nécessaires à la survie et à la prolifération des lymphocytes (Boutboul et coll. 2005; Wherry et coll. 2004). Elles perdent également l'expression des molécules de co-stimulation CD27 et CD28. Récepteurs nécessaires à l'activation, la prolifération et la génération de cellules mémoires (Powell et coll. 2004; Appay et coll. 2002).

Il semble également que la molécule inhibitrice PD-1 soit sur-exprimée, empêchant à la fois la prolifération et l'acquisition des fonctions effectrices (Ha et coll. 2008).

Les cellules constituant le répertoire mémoire n'ont donc pas les mêmes caractéristiques phénotypiques selon l'antigène considéré, en particulier, la persistance de l'antigène dans le cas des infections chroniques et latentes influence la composition du répertoire mémoire.

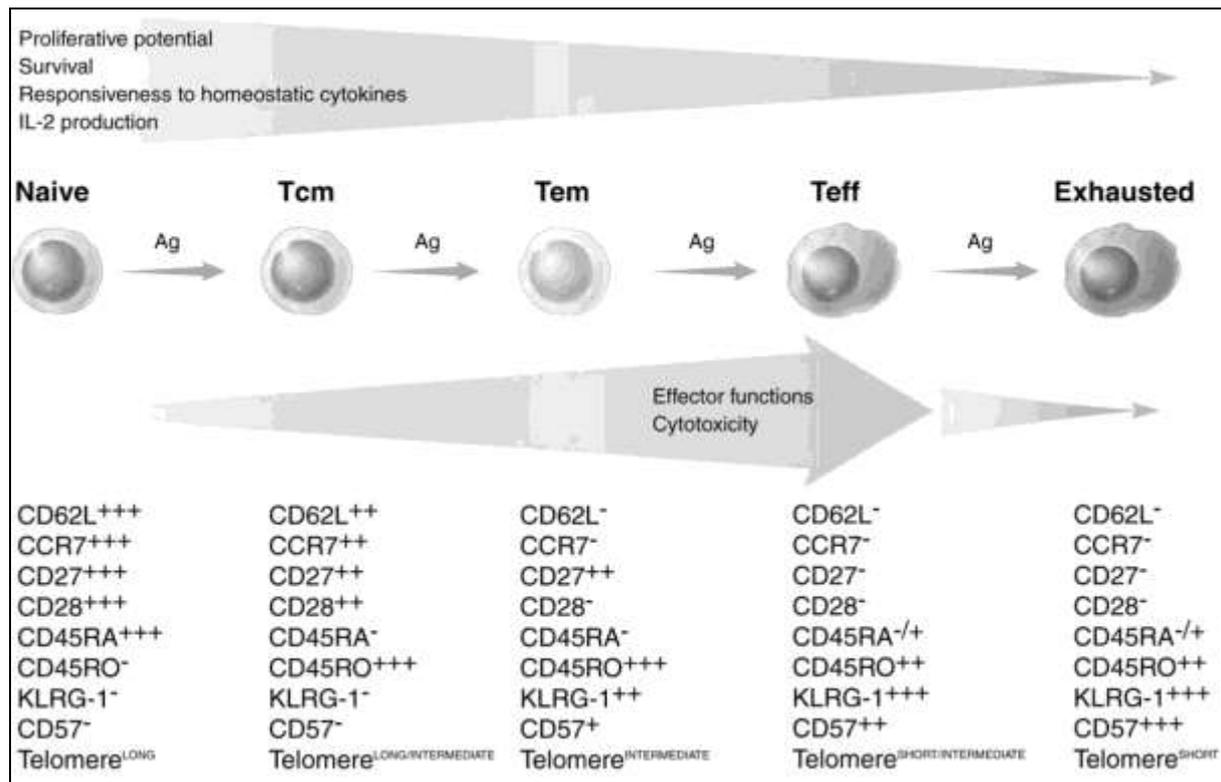


Figure 10 : exposition antigénique chronique  
 Changement fonctionnels et phénotypiques des lymphocytes T CD8+ lors d'une exposition antigénique chronique (Klebanoff et coll. 2006).

### Cytokines et Homéostasie des cellules mémoires

La survie des lymphocytes T CD8 mémoires est indépendante du **CMH-peptide** ; des lymphocytes T CD8 transférés à des souris déficientes pour les molécules de classe I ( $\beta$ 2m ou TAP-déficientes) survivent très bien à long terme (Jabbari et coll. 2005; Murali-Krishna et coll. 1999). Ces expériences ayant été faites chez des souris lymphopéniques, il n'est pas exclus que des interactions de faible avidité avec des ligands du soi soient nécessaires au maintien des cellules mémoires, comme le sous-entendre le lent déclin des CD8 mémoires après délétion de leur TCR (Polic et coll. 2001). Des résultats similaires ont été mis en évidence pour les populations de lymphocytes T CD4 mémoires (Kassiotis et coll. 2003)

Si les **CD4** sont indispensables à la génération du répertoire mémoire lors du premier contact antigénique, ils le sont également pour leur homéostasie. En effet, on observe un déclin progressif du nombre de lymphocytes T CD8 mémoires anti-viraux après leur transfert chez des souris déficientes en lymphocytes TCD4, (Sun et coll. 2004; Badovinac et coll. 2006). Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle

tumoral (Antony et coll. 2005).

**L'IL-7 est l'IL-15** sont impliquées dans le maintien du nombre de cellules mémoires in vivo. Les cellules naïves, comme les cellules mémoires, expriment l'IL-7R, à l'origine d'un signal de survie. L'IL-15 est plus spécifique, des souris KO pour l'IL-15 sont incapables d'assurer la survie des cellules mémoires. La signalisation de l'IL15 aboutit à l'expression du 4-1BB sur les lymphocytes T CD8+, plus intensément sur les cellules mémoires « CD28- » que sur les cellules naïves « CD28+ » (Kim et coll. 2002). Ceci suggère que les molécules de la superfamille du TNF contribuent à l'homéostasie des lymphocytes T CD8 mémoires. Il a en effet été montré que les couples CD27/CD70, OX40/OX40 ligand et 4-1BB/4-1BB ligand jouent un rôle important dans la survie et la réponse secondaire des lymphocytes T CD8 mémoires (Hendriks et coll. 2005).

### L'interleukine-7

L'IL-7 est la cytokine la plus impliquée dans le contrôle de la lymphopoïèse thymique où elle joue un rôle de facteur de croissance et de survie vraisemblablement en augmentant les taux de Bcl-2 (von Freeden-Jeffry et coll. 1997).

Les cellules naïves expriment l'IL-7R $\alpha$ , l'IL-15R $\alpha$ , l'IL-2/IL-15R $\beta$  et la chaîne  $\gamma_c$ , mais pas le CD25, elles répondent donc mal à l'IL-2. C'est principalement l'IL-7 qui a un rôle dans le maintien en survie des lymphocytes T naïfs avant la rencontre avec l'antigène. L'IL-7 est produite par le tissu stromal de la moelle osseuse, les cellules thymiques intra-épithéliales et par les cellules de l'épithélium intestinal (pour revue (Marrack et coll. 2000)).

L'IL-7 est une cytokine essentiellement impliquée dans le contrôle de la survie et le renouvellement des lymphocytes T périphérique quiescents. Ses effets sont contrôlés par l'expression de la chaîne  $\alpha$  de son récepteur : IL-7R $\alpha$  ( ou CD127) qui varie selon le stade de différenciation des cellules (cf. Figure 11).

L'IL-7R est exprimé sur toutes les cellules quiescentes, il se compose de l'IL-7R $\alpha$  (CD127) et de la chaîne  $\gamma_c$  (CD132). La fixation de l'IL-7 à son récepteur entraîne une diminution de l'expression du CD127, suggérant que les cellules ayant bénéficié du signal « laisse » l'IL-7 encore disponible à celles ne l'ayant pas encore reçu (Park et coll. 2004), laissant ainsi à chaque cellule T une chance de se de maintenir en vie.

Après activation, l'expression de l'IL-7R $\alpha$  est diminuée, l'expression l'IL-2R $\alpha$  , de l'IL-15R $\alpha$  et d'autre cytokine est induite (Xue et coll. 2002) (cf. Figure 11).

Lorsque les cellules reviennent au repos, l'expression de l'IL-7R $\alpha$  est à nouveau induite, spécialement sur les CD4 (Li et coll. 2003). L'IL-7 n'a donc pas de rôle particulier dans le contrôle des phases de prolifération et de la contraction clonale, mais, comme l'IL-15, elle joue un rôle important de survie à long terme des lymphocytes T mémoires (pour revue, (Bradley et coll. 2005)).

La ré-expression de l'IL-7R $\alpha$  définit une sous-population de cellules mémoires capables de survivre à long terme, exprimant des niveaux plus importants de Bcl-2, et proliférant plus intensément que leurs homologues IL7-R $\alpha$  (Kaech et coll. 2003; Bengsch et coll. 2007). Ceci suggère que les cellules IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> seraient des cellules mémoires à long terme. Cependant la re-expression du CD127 serait variable selon le contexte : en cas de persistance de l'antigène, la ré-expression serait quasiment nulle (EBV, CMV, HIV) dans le cas contraire, sa ré-expression serait significative (grippe) (van Leeuwen et coll. 2005; Hammerbeck et coll. 2008).

### L'interleukine-15

L'IL-15 est produite principalement par les monocytes, par les cellules dendritiques et par les cellules stromales de la moelle osseuse. Elle joue un rôle majeur sur le développement et l'activation des lymphocytes T CD8 et des NK.

Comme l'IL-7, l'IL-15 est impliquée dans l'homéostasie des lymphocytes T naïfs (Schönland et coll. 2003). Les souris déficientes en IL-15 ou en IL-15R $\alpha$  ont environ deux fois moins de lymphocytes T CD8 naïfs que les souris normales (Lodolce et coll. 1998). La surexpression de l'IL-15 inhibe spécifiquement l'apoptose dépendante de l'IL-2 (Marks-Konczalik et coll. 2000) en inhibant l'AICD induite par Fas et TRAIL (Mueller et coll. 2003; Oh et coll. 2008).

L'effet principal de l'IL-15 sur l'activation T concerne l'homéostasie des cellules T mémoires et leur survie à long terme (Sato et coll. 2007). Alors que l'IL-7 semble avoir plutôt un rôle de survie stricte, l'IL-15 participe à l'homéostasie en permettant une prolifération basale des cellules mémoires en l'absence de signal antigénique (Goldrath et coll. 2002b). L'IL-15 a alors un rôle opposé à celui de l'IL-2, qui semble plutôt inhiber cette survie à long terme. Un des mécanismes responsable du rôle essentiel de l'IL-15 dans la survie à long terme des lymphocytes T mémoires est que cette cytokine, et vraisemblablement l'IL-7, activent les télomérases des lymphocytes T (Hsu et coll. 2007; Wallace et coll. 2006; Li et coll. 2005). Une étude récente suggère que l'IL-15 pourrait se

substituer au lymphocytes T CD4, et serait capable de générer des lymphocytes T CD8 fonctionnels et de les maintenir à long terme (Oh et coll. 2008).

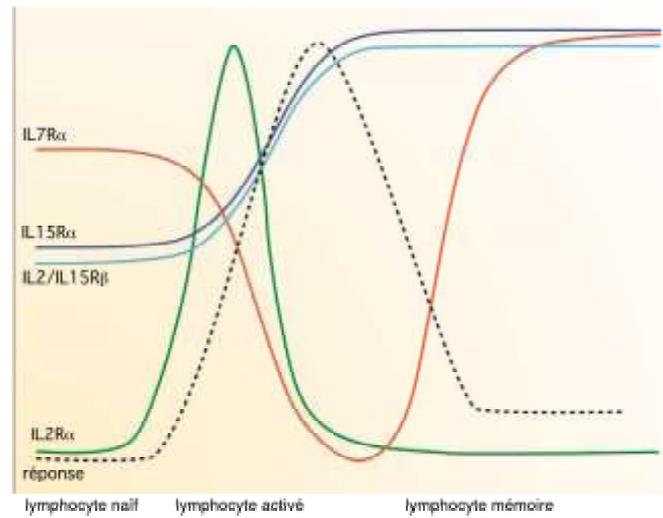


Figure 11 : Evolution de l'expression des récepteurs aux cytokines IL-2, IL-7 et l'IL-15 au cours de la réponse T (Schluns et coll. 2003)

# Le mélanome

Le mélanome est une tumeur maligne développée à partir d'une cellule mélanocytaire. N'importe quelle zone comportant des mélanocytes peut être le siège d'un mélanome, cependant, près de 90 % des mélanomes sont des tumeurs cutanées. Elle peut se développer à partir d'une peau normale ou d'une tumeur mélanocytaire bénigne préexistente: le naevus. Cette tumeur a un très grand potentiel métastatique, quelques millimètres cube de tumeur peuvent entraîner une dissémination métastatique diffuse rapidement létale. Les récurrences tardives (>10 ans) sont possibles et observées en clinique d'une manière régulière.

## Données épidémiologiques

L'incidence du mélanome dans les pays industrialisés n'a cessé d'augmenter au cours des 25 dernières années. 6000 à 8000 nouveaux cas sont détectés chaque année en France, plus de 130 000 de par le monde. La probabilité, pour un individu naissant en l'an 2000, de développer un mélanome durant sa vie est estimée à 1/75 soit 1,33% (Tromme 2007). En 1994 ce risque était estimé à 0,7% (0,6% pour les hommes et 1% pour les femmes) au début du siècle il était de moins 1/1500 (Souques 1999).

Le mélanome cutané est en constante augmentation avec un doublement de l'incidence tous les dix ans en Europe. C'est le cancer dont l'augmentation a été la plus rapide parmi les populations caucasiennes entre les années 1970 et le début du XXI<sup>ème</sup> siècle. L'incidence est de 5 à 15 nouveaux cas pour 100.000 habitants par an en Europe. Ce taux est bien plus élevé en Australie et en Nouvelle-Zélande (40 à 50 nouveaux cas pour 100.000 habitants par an), mais par contre nettement plus bas dans les pays à phototype V (cf. Tableau 1) dominant (Asie, Amérique Latine), plus bas encore en Afrique (rares cas de mélanomes palmo-plantaires). En Europe, l'incidence diminue du Nord vers le Sud avec 15 nouveaux cas pour 100.000 habitants par an en Scandinavie et 5 à 7 nouveaux cas pour 100.000 habitants par an au pourtour de la Méditerranée. (Lens et coll. 2004)

Comme c'est le cas en Australie, depuis quelques années, l'incidence se stabilise en Europe Occidentale avec même une tendance à la diminution surtout chez les femmes dans certaines parties de l'Europe (Bataille 2006). La mortalité tend à se stabiliser

également en Amérique du Nord et en Europe du Nord et dans les pays où elle croît toujours (Europe centrale et du Sud), c'est dans une proportion moindre que l'incidence. Cette différence d'évolution entre l'incidence et la mortalité doit être attribuée à une détection plus précoce des mélanomes plutôt qu'à un meilleur traitement. En effet, l'augmentation globale d'incidence est à mettre en relation avec une augmentation des mélanomes fins, tandis que les mélanomes d'épaisseur moyenne à élevée restent stables en termes d'incidence. Dans un même ordre d'idées, on remarquera que la mortalité reste globalement en augmentation chez les hommes âgés, et tend à diminuer chez les femmes jeunes, ceci indiquant les populations les plus réceptives aux campagnes de dépistage précoce.

En Europe, le mélanome cutané est plus fréquent chez la femme: environ 13 cas chez la femme (dont 5 à 6 sur les membres inférieurs) pour 9 cas chez l'homme (dont 4 à 5 sur le tronc). En Australie cependant, le rapport est inversé avec un risque cumulatif de 4% chez l'homme et de 3% chez la femme. L'âge moyen est de 55 ans mais est un peu plus bas chez la femme que chez l'homme.

## **Facteurs de risque**

Le risque de développer un mélanome cutané est le résultat d'une conjonction de facteurs constitutionnels et externes. Par exemple, on sait que le nombre et le type de naevus est un excellent marqueur du risque de mélanome. Or le développement de ceux-ci est dépendant de facteurs d'hérédité mais aussi de comportement (exposition solaire, surtout durant l'enfance).

### **Les facteurs de risque constitutionnels:**

Les principaux facteurs de risques sont :

- Un antécédent personnel de mélanome : facteur de risque multiplié 2,5 à 8,5
- Un antécédent familial de mélanome : facteur de risque multiplié par 2 ou 3 pour un parent du premier degré.
- Un nombre élevé de naevus et/ou la présence de naevi atypiques :facteur de risque multiplié par 4-5 au-delà de 50 naevus de plus de 2 millimètres sur l'ensemble du corps)

### Les facteurs de risque extrinsèques :

L'exposition au soleil représente le principal facteur de risque, à plus forte raison lorsqu'elle est intense, intermittente et a lieu durant l'enfance (on estime que 80 % des expositions solaires ont lieu avant l'âge de dix-huit ans). A cet âge, en effet, la peau est particulièrement sensible aux ultraviolets. Les ultraviolets artificiels (cabine de bronzage) font courir les mêmes risques quel que soit l'âge. Le risque est également fonction du "phototype", autrement dit de la sensibilité de la peau au rayonnement solaire. Il existe six phototypes différents, plus le phototype est faible plus le risque est grand et plus la protection solaire est nécessaire (cf. Tableau 1).

<b>Phototype I</b>	Peau extrêmement blanche, cheveux blonds, yeux bleus/verts	Brûle toujours facilement, ne bronze jamais
<b>Phototype II</b>	Peau blanche, cheveux blonds roux à bruns, yeux verts/bruns	Brûle toujours facilement, bronze à peine
<b>Phototype III</b>	Peau moyenne, cheveux bruns, yeux bruns	Brûle modérément, bronze graduellement et uniformément
<b>Phototype IV</b>	Peau olivâtre, cheveux bruns/noirs, yeux bruns/noirs	Brûle à peine, bronze toujours bien
<b>Phototype V</b>	Peau brun foncé, cheveux noirs, yeux noirs	Brûle rarement, bronze beaucoup
<b>Phototype VI</b>	Peau noire, cheveux noirs, yeux noirs	Ne brûle jamais, la peau est fortement pigmentée en permanence

Tableau 1 : Classification des phototypes

## **Classification**

### Classification anatomo-clinique des mélanomes cutanés

#### Mélanome à extension superficielle (SSM)

C'est la forme la plus fréquente (70% des mélanomes). Il est d'évolution biphasique et comporte un temps variable d'extension horizontale intra-épidermique (2 à 5 ans) auquel succède une phase d'invasion verticale intradermique. Devant une tache pigmentée, l'abécédaire suivant permet de fixer l'attention sur les points les plus importants:

**A** : Asymétrie,

**B** : Bords irréguliers avec des contours indentés polycycliques encochés par des

incisures,

**C** : Couleur hétérogène (zones noires, marrons ou roses),

**D** : Diamètre supérieur à 6 mm,

**E** : Caractère évolutif avec extension progressive en surface.

### Mélanome Nodulaire

C'est une forme plus rare, d'emblée invasive (sans phase d'extension horizontale) et de pronostic redoutable. Il réalise un nodule noir, infiltré, saignant facilement, parfois achromique et de diagnostic difficile. Il est souvent observé sur la plante du pied, le cuir chevelu, le lit de l'ongle.

### Mélanome Acral Lentigineux

Il représente 5 % des mélanomes dans les populations à peau blanches et 60 % chez les populations à peau noire ou asiatique. Sa phase radiale est longue et sa phase verticale agressive. L'atteinte palmo-plantaire est plus fréquente que l'atteinte unguéale réalisant une bande noire extensive avec volontiers une pigmentation du repli sous-unguéal.

### Mélanome de Dubreuilh

Il s'agit d'un mélanome intra-épidermique. La mélanose de Dubreuilh se présente comme une tache assez large, de couleur inhomogène, à contours irréguliers, apparaissant presque exclusivement sur le visage des sujets de plus de 50 ans, avec une longue phase d'extension superficielle (5 à 15 ans). L'apparition d'un nodule ou d'une plaque irrégulière noire très foncée signe la transformation.

### **Classification histologique des mélanomes cutanés**

Histologiquement, les mélanomes sont classés selon deux indices : l'indice de Clark et l'indice de Breslow (cf. Figure 12).

**L'indice de Clark** traduit le niveau d'infiltration en profondeur de la lésion.

Clark I : intra-épidermique (mélanome in situ)

Clark II : quelques cellules mélanocytaires atypiques infiltrant le derme papillaire

Clark III : infiltration de tout le derme papillaire

Clark IV : envahissement du derme réticulaire

Clark V : atteinte de l'hypoderme.

**L'indice de Breslow** traduit l'épaisseur en millimètres de la lésion depuis la partie haute de la couche granuleuse jusqu'à la partie la plus profonde de la tumeur. C'est l'indice pronostic le plus important qui guidera le traitement et le suivi.

La classification internationale la plus utilisée est celle de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) et de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC). C'est une classification pronostique basée sur des courbes de survie, elle permet de classer les patients en groupes plus homogènes afin de faciliter l'analyse des essais thérapeutiques. La dernière édition (6<sup>ème</sup>) prend en compte l'ulcération de la tumeur primitive et le statut du ganglion sentinelle (cf. Tableau 2).

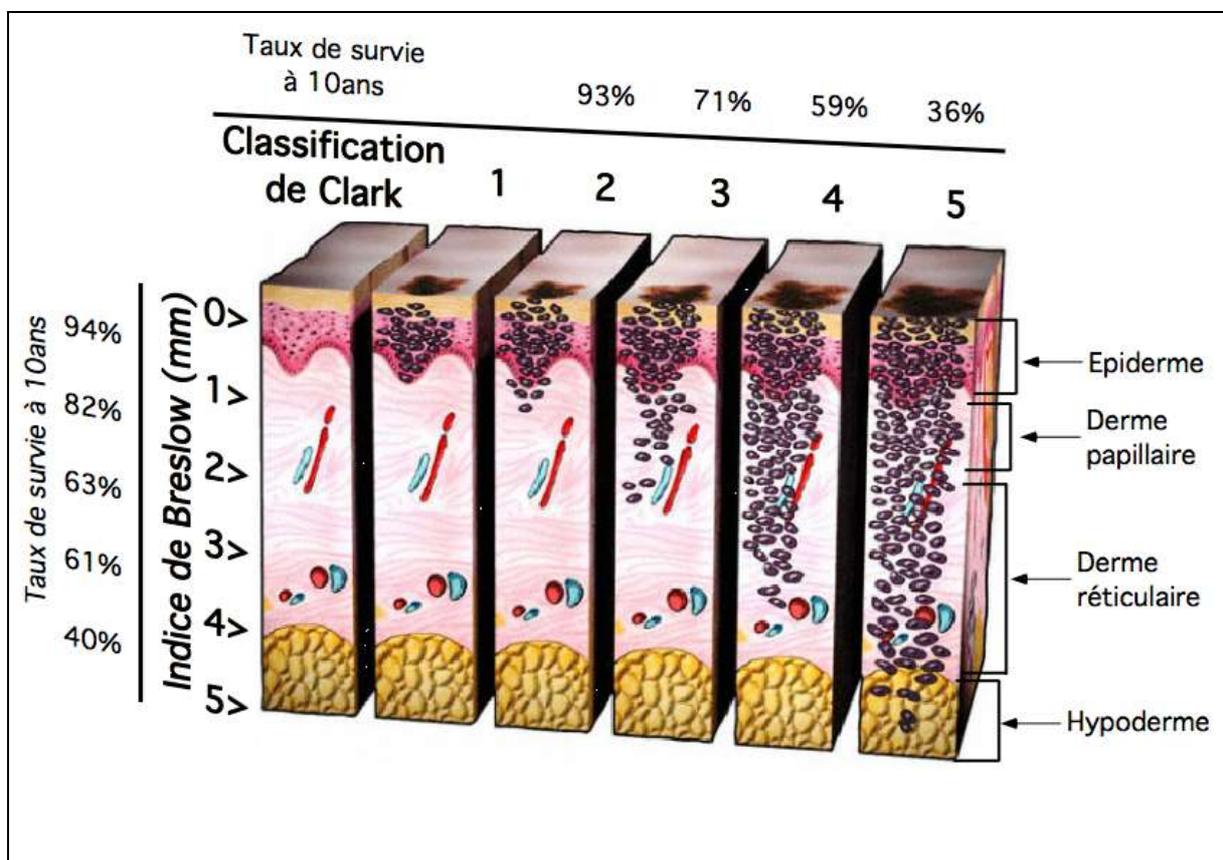


Figure 12 : Progression tumorale et classification de Breslow et de Clark

Stades	Critères
--------	----------

<b>Stade IA</b>	Tumeur inférieure ou égale à 1 mm d'épaisseur, niveau de Clark II ou III, sans ulcération (pT1a) ; N0, M0
<b>Stade IB</b>	Tumeur inférieure ou égale à 1 mm d'épaisseur, niveau de Clark IV ou V ou avec ulcération (pT1b) ; N0, M0
	Tumeur supérieure à 1 mm et inférieure ou égale à 2 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT2a) ; N0, M0
<b>Stade IIA</b>	Tumeur supérieure à 1 mm et inférieure ou égale à 2 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT2b) ; N0, M0
	Tumeur supérieure à 2 mm et inférieure ou égale à 4 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT3a) ; N0, M0
<b>Stade IIB</b>	Tumeur supérieure à 2 mm et inférieure ou égale à 4 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT3b) ; N0, M0
	Tumeur supérieure à 4 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT4a), N0, M0
<b>Stade IIC</b>	Tumeur supérieure 4 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT4b), N0, M0
<b>Stade IIIA</b>	Tumeur sans ulcération (tous pT), métastases microscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux (N1a, 2a) ; M0
<b>Stade IIIB</b>	Tumeur sans ulcération (tous pT), métastases macroscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux ou métastases « en transit » (N1b, 2b, 2c); M0
	Tumeur avec ulcération (tous pT), métastases microscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux ou métastases « en transit » (N1a, 2a, 2c) ; M0
<b>Stade IIIC</b>	Tumeur avec ulcération (tous pT), métastases macroscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux (N1b, 2b), M0
	Tumeurs avec ou sans ulcération (tous pT), métastases dans 4 ganglions lymphatiques régionaux ou plus ou métastases en transit avec métastase(s) ganglionnaire(s) régionale(s) (N3)
<b>Stade IV</b>	Métastases à distance (tous pT, tous N, M1)

*Tableau 2 : Classification TNM des mélanomes  
Classification anatomo-pathologique (pTNM) de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) et de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC)*

### **Les mélanomes non cutanés**

Le **mélanome oculaire** est une tumeur de l'adulte qui dérive des structures

pigmentées de l'oeil : iris, corps ciliaires et la choroïde.

représente environ 5% des mélanomes, 80-90% ont une origine uvéale, 5 à 12% se développe à partir de corps ciliaires et 3 à 8% à partir de l'iris. C'est la plus fréquente des tumeurs oculaires malignes primitives de l'adulte. C'est une tumeur relativement rare puisque seulement 500 à 600 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année en France. Elle se développe préférentiellement dans les yeux bleus ou verts et il est vraisemblable que l'exposition solaire favorise sa survenue. La dissémination métastatique survient dans 50% des cas environ parfois plusieurs années après le diagnostic initial. Le seul traitement de cette tumeur a longtemps été l'énucléation (ou ablation chirurgicale de l'œil), depuis une vingtaine d'années, les progrès ont concerné le traitement conservateur de l'œil grâce à l'apparition de nouvelles méthodes de radiothérapie (Stang et coll. 2005).

Le **mélanome des muqueuses** est une pathologie rare qui représente 0,03% des cancers et 1,3% des mélanomes. Il se localise principalement sur les muqueuses de la tête et du cou (bouche, fosses nasales, tractus digestif haut), mais également au niveau, du tractus génito/urinaire et des muqueuses ano/rectales (Patrick et coll. 2007).

## **Facteurs pronostiques des mélanomes cutanés**

### **Histologiques**

#### **L'ulcération**

L'ulcération apparaît comme un facteur pronostique indépendant dans plusieurs études multi-variées (Eigentler et coll. 2004) (Balch et coll. 2001). Elle se définit comme une perte de substance complète de l'épiderme en surface d'une portion importante d'un mélanome primitif. L'épithélium est remplacé par une membrane fibrino-leucocytaire reposant sur un tissu de granulation. Il est important de distinguer cette ulcération du mélanome aux lésions de grattage qui correspondent à des excoriations superficielles sans interruption complète de l'épithélium ou d'un décapage artéfactuel lors du prélèvement (Balch et coll. 2001; Balch et coll. 2001).

#### **L'index mitotique**

Différentes méthodes sont utilisées pour évaluer l'index mitotique des tumeurs, la

plus utilisée en routine clinique est l'évaluation du nombre de mitoses par 10 champs au fort grossissement. Cette méthode pose cependant un problème de reproductibilité, parce que les champs d'un microscope n'ont pas de valeur universellement définie. Il est donc préférable de définir le nombre de mitoses par mm<sup>2</sup>. La valeur seuil étant définie comme < 1mitose/mm<sup>2</sup>. L'index mitotique émerge surtout comme facteur prédictif de l'agressivité du mélanome et donc du risque que le ganglion sentinelle soit positif (Busam 2004; Francken et coll. 2004).

### *TIL (Tumor Infiltrating Lymphocytes)*

La présence de lymphocytes infiltrant le mélanome est considérée comme un facteur de bon pronostic. On distingue l'absence d'infiltrat de l'infiltrat léger, défini comme la présence de un ou plusieurs foyers de TIL à la périphérie ou dans la tumeur, et de l'infiltrat abondant, défini comme la présence de TIL dans toute la zone de croissance verticale ou couvrant toute la base de la tumeur (Gimotty et coll. 2004)

### *Non histologiques*

Les stratégies de prévention étant de plus en plus efficaces, les mélanomes sont détectés de plus en plus précocement et donc de plus en plus fins. De fait, d'autres facteurs de pronostics ont dû être mis en évidence dans les mélanomes fins. Ainsi il apparaît que pour un mélanome d'épaisseur égale, être une femme est de meilleur pronostic, alors que le mélanome acral lentigineux est le sous-type avec le plus mauvais pronostic, de même qu'une localisation au niveau du tronc postérieur. L'âge est également un facteur pronostique : plus on est âgé, moins le pronostic est bon (Eigentler et coll. 2004; Leiter et coll. 2004).

## **Altérations génétiques impliquées dans l'apparition des mélanomes**

Dans les mélanomes, comme dans la plupart des cancers, l'apparition du phénotype tumoral résulte de la survenue de modifications génétiques qui altèrent des voies de signalisation cellulaires impliquées dans la prolifération, la survie, la sénescence ou l'apoptose.

Cependant, de nombreuses fonctions cellulaires clefs doivent être altérées pour transformer une cellule normale en cellule tumorale, expliquant la nécessité d'un processus en plusieurs étapes. Ces étapes permettent l'acquisition de fonctions

cellulaires indispensables à l'immortalisation, à la transformation et à la progression tumorale. Les altérations géniques sont soit présentes dans le génome de l'hôte, et donc transmises de façon héréditaire, soit acquises par le génome tumoral. Les altérations cellulaires aboutissant à la perte du contrôle de la sénescence, de la mort et de la prolifération cellulaire peuvent être considérées comme les événements les plus précoces. Les altérations qui concernent les relations entre cellules tumorales et les autres cellules de l'organisme surviennent plus tardivement (invasion, angiogénèse, métastases). Dans ce chapitre, nous ne décrivons que les altérations impliquées dans le développement et la propagation du mélanome.

### **Voies de signalisation perturbées**

#### La voie des MAPkinases

La cascade de signalisation des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) (Ras /Raf /MEK/Erk) joue un rôle clé dans la prolifération des mélanomes. Dans des conditions physiologiques normales, la voie des MAPKinases régule la croissance, la survie et la migration cellulaire, en réponse à de nombreux ligands. Le point central de cette réponse est l'activation des GTPases Ras. La dérégulation de cette voie, comme une activation constitutive est très fréquente dans de nombreux cancers.

Les signaux extracellulaires qui permettent d'activer la voie de MAPKinase sont multiples : des facteurs de croissance, des cytokines, des hormones ou encore des neurotransmetteurs. Parmi les récepteurs, on peut noter : EGF-R (*Epidermal Growth Factor Receptor*) VEGF-R (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*), PDGF-R (*Platelet-derived Growth Factor Receptor*), c-KIT (ou récepteur du facteur de steel), FGF-R (*Fibroblast Growth Factor Receptor*), FLT-3 (*fms-related tyrosine kinase-3*)...

La fixation du ligand sur son récepteur à activité tyrosine kinase, provoque l'autophosphorylation de tyrosines dans la partie cytoplasmique du récepteur. Ce domaine phosphorylé interagit avec des domaines SH2 de la protéine Grb2 (elle-même associée au facteur d'échange Sos) ce qui a pour effet de transloquer le complexe Grb2/Sos à proximité de la protéine Ras sous la membrane plasmique. La protéine Sos peut alors promouvoir l'échange GDP en GTP sur Ras. La protéine Ras-GTP recrute à la membrane plasmique des protéines sérine-thréonine kinases membres de la famille RAF, qui phosphoryle la protéine MEK (*Mitogen-induced Extracellular Kinase*) (ou MAPKK pour *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*) qui à son tour phosphoryle la

protéine ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) (ou MAPK) qui se transloque dans le noyau.

Ces cascades de phosphorylation permettent l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de gènes qui contrôlent la survie, l'apoptose et la prolifération cellulaire. De nombreuses altérations de cette voie jouent un rôle clef dans le développement et la progression du mélanome

i. Mutation de ras :

Elles sont présentes dans 15% des mélanomes. La forme mutée la plus commune est **N-RAS**. L'incidence de cette mutation semble être corrélée avec les mélanomes des parties exposées chroniquement au soleil. Des mutations sont également retrouvées dans la plus de 81% des naevi congénitaux (Bauer et coll. 2007). Les mutations de **H-RAS** sont très rares et les mutations de **K-RAS** n'ont jamais été mises en évidence.

ii. Mutation de BRAF

BRAF est une sérine/thréonine kinase de la famille RAF, dont le gène code pour trois oncogènes (ARAF, BRAF, CRAF). Dans le mélanome, 80% des mutations sont représentées par la substitution de la valine 600 par un acide glutamique (V600E) (Davies et coll. 2002). Cette mutation mime une phosphorylation et rend active constitutivement la protéine BRAF. Cette mutation est à l'origine de plusieurs phénomènes :

- Prolifération : due à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur et à l'inhibition des CDK (Kortylewski et coll. 2001)
- Pouvoir métastatique par remodelage de la matrice extra-cellulaire (Smalley 2003)
- Angiogénèse en stimulant la sécrétion de VEGF (Giuliani et coll. 2004)
- Augmentation de la survie par modulation de MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor*) (Widlund et coll. 2003), et par protection vis-à-vis de l'apoptose induite par Fas (Holmström et coll. 2000).

**MITF** est un facteur de transcription essentiel dans les mélanocytes. Il est impliqué dans la régulation de l'expression de protéines de la mélanogenèse comme les tyrosinases et les protéines MelanA/MART-1. Il est également retrouvé dans de nombreux mélanomes humains (15 à 20%) où son expression semble essentielle pour la prolifération et la survie tumorale (Levy et coll. 2006). Cependant son mécanisme n'est

pas encore complètement élucidé.

Dans le mélanocyte normal, il joue un double rôle d'inducteur ou de répresseur de la prolifération cellulaire. En effet, cette protéine est un inhibiteur de la progression du cycle cellulaire, elle prévient la division inappropriée des cellules ; mais dans certains cas, elle est aussi capable d'activer le cycle cellulaire. Si une activité minimale de MITF est nécessaire à la survie, un niveau élevé inhibe la prolifération des cellules et favorise leur différenciation (mécanisme associé à un arrêt du cycle cellulaire via p16, Cdk2, p21) et un niveau diminué induit un mécanisme d'apoptose.

Dans le mélanome, l'interaction de MITF avec d'autres protéines comme BRAF, rend son étude plus compliqué. De forts taux de protéines ont un effet anti-prolifératif (Wellbrock et coll. 2005), ces résultats semblent être confirmés par les taux très faibles de MITF retrouvés dans les mélanomes invasifs. Cependant, son expression est essentielle à la prolifération et à la survie des cellules en régulant des gènes comme CDK2 et Bcl-2 (McGill et coll. 2002). Devant ces mécanismes opposés, il est probable que BRAF régule son expression afin d'assurer des niveaux de MITF permettant à la fois la survie et la prolifération du mélanome (Dynek et coll. 2008).

L'incidence des mutations de BRAF varie selon le type histologie et la topologie des lésions : elles sont très rares dans les mélanomes muqueux (6%) mais sont présentes dans plus de 50% des mélanomes cutanés superficiel ou nodulaires. L'existence d'un lien avec des expositions chroniques au soleil est encore débattue (Maldonado et coll. 2003; Venesio et coll. 2008). Il semble cependant que les mutations de BRAF soient corrélées à des zones exposées de façon intermittente au soleil (Cohen et coll. 2004).

Beaucoup de naevi présentent cette mutation de BRAF (plus de 80% (Pollock et coll. 2003)), cela semble signifier que cette mutation n'est pas suffisante à la transformation maligne d'un naevus préexistant.

### La voie PI3K/Akt

En réponse à des facteurs de croissance ou des cytokines, la PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase) permet la phosphorylation l'inositol biphosphate en inositol triphosphate. Une fois phosphorylés ces lipides membranaires jouent le rôle de seconds messagers et sont capables d'activer la voie Akt/PKB (*Protéine Kinase B*). Akt/PKB est l'élément clé de la voie PI3K. En effet, son activation est impliquée dans l'activation dans

la prolifération cellulaire l'apoptose et la survie. L'inactivation de ces voies survient après déphosphorylation des lipides par la phosphatase PTEN (*Phosphatase and TENSin homolog*).

La voie PI3K/Akt joue un rôle important dans de nombreux cancers. Dans le mélanome, la plupart du temps, la dérégulation de cette voie est due à une mutation du gène suppresseur de tumeur **PTEN**. Les taux de mutations de PTEN sont présents dans 30 à 50% des mélanomes. Dans 57 à 70% des cas c'est la région du chromosome 10 codant pour PTEN qui est perdue. Étonnamment, les mutations de PTEN son rarement retrouvées dans les mélanomes métastatiques, mais les taux de protéines sont très diminués ce qui suggère d'autres mécanismes d'inactivation de PTEN (Zhou et coll. 2000).

Seuls de très faibles taux de mutation de la **PI3K** ont été retrouvés dans le mélanome (Omholt et coll. 2006).

La sur-activation de la voie **Akt** est retrouvée dans près de 50% des mélanomes et dans plus de 75% des mélanomes métastatiques (Dai et coll. 2005). Cependant, dans 40 à 60% des mélanomes sporadiques, on ne retrouve aucune mutation des gènes de la PI3K ou de PTEN. Cette activation sélective de Akt pourrait être due à une augmentation des copies du gène Akt et à une diminution de l'activité de PTEN (Stahl et coll. 2004).

### La voie WnT

La voie Wnt est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la migration, la différenciation et la prolifération. Cette voie induit une stabilisation des  $\beta$ -caténine. En l'absence de signalisation WnT, les  $\beta$ -caténine sont phosphorylées par un complexe formé, entre autres, par l'APC (*Adenomatosis Polyposis Coli*) et la GSK-3 $\beta$ . Après liaison au récepteur, la phosphorylation des  $\beta$ -caténine est inhibée, elles s'accumulent alors dans le cytoplasme, et se lient au Tcf/Lef (*T-cell factor/lymphoïd enhancing factor*). Ce complexe induit la transcription de gènes impliqués dans la tumorigenèse comme c-Myc et la cycline D1.

L'accumulation des  **$\beta$ -caténine** est retrouvée dans environ 30% des mélanomes. Cependant les mutations du gène des  $\beta$ -caténine (CTNNB1 :Cadherin-associated protein) ne sont retrouvées que dans 2 à 8% des mélanomes. La plupart des altérations de cette voie sont dues à des mutations et/ou des hyperméthylation du gène **APC** (15%) (Reifenberger et coll. 2002). Actuellement la dérégulation des  $\beta$ -caténine sans mutations

de CTNNB1 ou de APC reste inconnue.

### Les gènes suppresseurs de tumeur

Les principaux gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans le mélanome sont P14ARF (ARF), p53 et p16INK4a (P16). p16 lie le complexe CDK4/6, cycline D empêchant ainsi la phosphorylation de Rb. La forme non phosphorylée de Rb interagit et inhibe E2F ce qui bloque la cellule en phase G1 du cycle cellulaire. ARF bloque la dégradation de p53 par HDM2. p53 arrête le cycle cellulaire en activant p21. p21, en se liant au complexe cycline E/CDK2, inhibe la phosphorylation de Rb, dans ce cas le cycle cellulaire est arrêté.

Les protéines p14ARF et P16 sont codées par un même gène: le gène Cdkn2A. Ainsi toute altération du locus p16INK4a altère également p14ARF.

Les altérations peuvent toucher ces différents acteurs.

- Les mutations de **CDKN2A/ARF** ont été retrouvées dans 40 à 70% des mélanomes.
- Le gène suppresseur de tumeur TP53 (**p53**) est fréquemment muté dans de nombreux cancers. Bien que l'exposition aux ultraviolets soit responsable de mutations de TP53 (Moshinsky et coll. 1997), le rôle de p53 reste controversé dans le mélanome puisqu'on ne retrouve de mutations que dans 7% des cas en moyenne (0 à 24%) (de Snoo et coll. 2005). Des mutations sont en revanche plus fréquemment retrouvées dans certains naevi (23%) et certains mélanomes muqueux (20%), ce qui semble signifier que les mutations peuvent être causées par d'autres mécanismes que les UV (Ragnarsson-Olding et coll. 2002).
- **L'inactivation de P16** entraîne la phosphorylation de RB et donc la prolifération cellulaire.
- La **mutation de ARF** entraîne la dégradation de p53 via son interaction avec HDM2 et également la perte de la répression de P21 sur les cyclines E/CDK2
- La **diminution de l'activité de p53** entraîne la progression du cycle cellulaire par la phosphorylation de RB et la libération du facteur de transcription E2F.
- Mutation de **Rb** décrite dans de nombreux cancers mais peu dans le mélanome
- Mutation du gène de **p21** (CDKN1A) peu fréquent
- Mutation de **CDKN2B** : rare surtout formes familiales
- Mutation de **CDKN2A** : 50% des mélanomes

### Mutations des voies de l'apoptose :

Il est intéressant de noter que certaines altérations génétiques survenant dans les mélanomes augmentent la résistance de ces tumeurs à l'apoptose. C'est le cas des mutations **N-RAS** et **BRAF**, de la surexpression des protéines anti-apoptotiques de la superfamille Bcl2 et une diminution de l'expression des molécules pro-apoptotiques de cette même famille (Hussein et coll. 2003). On note également une surexpression du facteur de transcription **NFκB** (*Nuclear Factor kappa B*) et de la perte d'expression de **PTEN**. D'autres signaux de survie cellulaire peuvent provenir de mutations de la voie signalisation **β caténine/APC** (*Adénomateux Polyposis of Colon*) ou de la perte d'expression de protéines telles que **APAF-1** (*Apoptotic Protease Activating Factor 1*) (Anichini et coll. 2006).

### Susceptibilité génique et les différentes formes de mélanomes

Ces mutations ne sont pas présentes dans toutes les formes de mélanome.

#### Les mélanomes sporadiques

De nombreux gènes sont impliqués dans le développement et la progression du mélanome cutané sporadique. Parmi eux des gènes suppresseurs de tumeur (CDC2L1, CDKN2A, TP53...) et des proto-oncogènes (CDK4, CTNNB1).

##### i. Histoire naturelle

La transformation d'un naevus en mélanome est encore mal connue. BRAF semble jouer un rôle au départ. Les naevi dysplasiques présentent souvent une perte d'expression de CDKN2A et/ou PTEN, une augmentation de CD1 marque la phase de croissance radiale, alors que la croissance verticale nécessite beaucoup de mutation dont la perte des E-cadherines, l'expression des N-cadherines, de l'intégrine αVβ3 et de la MMP2. Sur la base de ces altérations géniques, Dahl et Guldberg ont imaginé un modèle hypothétique d'évolution de la progression du mélanome (cf. Figure 13).

*Figure 13 : la progression du mélanome*

*Evolution hypothétique de la progression du mélanome selon Dahl et Guldberg (Dahl et coll. 2007)*

ii. Classification alternative des mélanomes cutanés

La connaissance accrue des altérations génétiques impliquées dans le mélanome ont amené Curtin et coll à établir une classification en fonction du degré d'exposition aux rayons ultraviolets. Les 4 catégories de cette classification sont :

- les mélanomes cutanés de zones exposées chroniquement au soleil,
- les mélanomes cutanés de zones exposées au soleil de façon intermittente,
- Les mélanomes muqueux,
- Le mélanome acral.

L'analyse des altérations au sein de ces différentes catégories ont amené les auteurs aux conclusions suivantes :

- Les mutations de BRAF associé à une perte de PTEN ou des mutations de N-RAS seules sont fréquentes dans les groupes de tumeurs de zones exposées au soleil de façon intermittente.
- En revanche dans les trois autres groupes la majorité des tumeurs ne présentent pas de mutation de BRAF ou N-RAS mais présentent un nombre de copies de CCND1 ou de CDK4 augmenté (Curtin et coll. 2005).

*Formes familiales*

La forme de mélanome familial ou FAMMM (*Familial Atypical Mole-Malignant Melanoma syndrom*) est caractérisée par la présence de très nombreux naevi dysplasique et de grandes tailles. Dans ces familles, le risque de développer un mélanome est proche de 100%, et les malades sont beaucoup plus jeunes que la population atteinte de mélanome sporadique. Des instabilités chromosomiques ont été retrouvées à la fois sur les cellules dysplasiques de naevi, mais également dans de la peau normale de 3 générations de familles atteinte de ce syndrome. Les gènes de

susceptibilité de ces mélanomes familiaux sont essentiellement **CDKN2A** (qui code pour les protéines ARF et p16) et **CDK4**, les mutations germinales de CDKN2A étant retrouvées chez près de 30 à 40% des patients.

L'implication de mutations de BRAF n'est pas encore confirmée dans ce type de mélanome, alors qu'elles sont responsables d'une augmentation de l'incidence des mélanomes sporadiques.

### Mélanome oculaire

Quelques études sur l'histoire de la maladie montrent que la transformation du naevus initial en mélanome pourrait être dû à l'inhibition de p53 (Erol et coll. 2004). La perte d'un chromosome 3 donne des mélanomes de l'uvée plus agressif (néoangiogénèse et infiltration locale) (Aalto et coll. 2001). Dans les mélanomes de l'uvée, les principales altérations sont (d'après <http://atlasgeneticsoncology.org>):

- **TGF- $\beta$ -R2** (*Transforming Growth Factor-beta Receptor, type 2*) 61% des mélanomes oculaires ont cette voie perturbée. Le TGF- $\beta$  pourrait augmenter les niveaux de MMP-2, responsable entre autres de l'adhésion des mélanomes de l'uvée non invasif aux cellules du foie, cible préférentielle des métastases (Woodward et coll. 2005).
- **HDM2**, (*Mouse Double Minute 2 Homolog*) est surexprimé dans 90% des cas (Brantley et coll. 2002)
- **CCND1** (Cyclin D1) est surexprimée dans 40% des mélanomes oculaires
- **Bcl-2** (B cell CLL/lymphoma 2) surexprimé par la majorité des mélanomes de l'uvée

En revanche la mutation de CDKN2A semble rare dans le mélanome de l'uvée

L'évolution des connaissances des altérations à l'origine de la transformation maligne des mélanocytes devrait faciliter le développement de thérapeutique ciblées et permettre d'adapter les traitements aux mutations réellement présentes afin de réduire les échec thérapeutiques.

## **Prise en charge conventionnelle**

En cas de suspicion de mélanome, une exérèse complète de la lésion est réalisée, il s'agit du traitement de référence pour le traitement du mélanome primitif isolé (stade I et IIA de l'AJCC-UICC). Les traitements systémiques sont utilisés pour les maladies plus évoluées ou pour les patients à hauts risques de rechute (immunomodulateurs ou les molécules de chimiothérapie).

### **Traitement chirurgical**

L'exérèse chirurgicale, pratiquée en deux temps, est le seul traitement curatif pour les mélanomes primitifs. L'exérèse du ganglion sentinelle n'est pas systématique.

L'exérèse complète du mélanome permet d'effectuer un examen anatomo-pathologique et d'obtenir un indice de Breslow fiable car mesuré sur la totalité de la tumeur.

Une reprise d'exérèse sera réalisée pour tout mélanome confirmé par l'examen anatomo-pathologique, le plus précocement possible après la première exérèse

Les marges d'exérèse doivent être adaptées à l'épaisseur du mélanome (Cf. Tableau 3). En cas d'atteinte ganglionnaire (stade III), le curage des zones identifiées sera réalisé. Pour les maladies développées à distance (stade IV), l'exérèse chirurgicale des métastases est envisageable.

Épaisseur de Breslow	Marges d'exérèse recommandées
Mélanome in situ	0,5 cm
0 - 1 mm	1 cm
1,01 - 2 mm	1-2 cm
2,01 - 4 mm	2 cm
> 4 mm	2-3 cm

Tableau 3 : Marges d'exérèses recommandées en fonction de l'indice de Breslow

### **Traitements systémiques**

#### **L'interferon $\alpha$**

L'utilisation de cette cytokine chez les patients atteints de mélanome repose sur la présomption que la stimulation précoce du système immunitaire est capable, en

éradiquant les micro-métastases, de prévenir ainsi le développement d'une future rechute de la maladie. L'analyse des essais cliniques effectués dans le cadre du mélanome montre une efficacité variable selon la dose et le stade de la maladie.

Utilisé à très faible dose (1 MUI) l'INF- $\alpha$  n'améliore ni la survie globale ni la survie sans récurrence des patients atteints d'un mélanome cutané, quel que soit le stade. À faible dose (3 MUI) il semble améliorer la survie sans récurrence des patients atteints d'un mélanome cutané sans envahissement ganglionnaire cliniquement décelable. À forte dose (20 MUI/m<sup>2</sup>), l'INF $\alpha$  semble améliorer la survie sans récurrence, mais pas la survie globale. Ni l'INF $\gamma$  (Imukin®) ni l'association de l'IL2 (Proleukin®) à l'INF $\alpha$  n'améliorent la survie des patients.

Ainsi l'immunothérapie par interféron alpha peut être proposée en traitement adjuvant chez les patients atteints d'un mélanome de stade IIB, IIC et III (breslow <1,5mm) :

- De faibles doses d'INF $\alpha$ 2a (Roferon®) sont indiquées dans le cadre du traitement adjuvant de mélanome de stade II sans maladie décelable après exérèse chirurgicale: administration sous-cutanée ou intramusculaire de 3 MUI 3 fois par semaine pendant 18 mois, en commençant au plus tard 6 semaines après l'intervention chirurgicale.
- De fortes doses d'INF $\alpha$ 2b (Introna®) sont utilisées chez des patients dont la rémission a été obtenue par chirurgie, mais considérés comme à haut risque de rechute systémique, par exemple les patients ayant une atteinte primaire ou secondaire des ganglions lymphatiques (clinique ou pathologique). Pour le traitement d'induction : administration par voie intraveineuse de 20 MUI/m<sup>2</sup> par jour, 5 jours par semaine sur une période de 4 semaines; et 10 millions d'UI/m<sup>2</sup> administrées par voie sous-cutanée, 3 jours par semaine (tous les 2 jours) pendant 48 semaines pour le traitement d'entretien.

### Chimiothérapie/ Radiothérapie

Une chimiothérapie peut être proposée pour le traitement des mélanomes avec atteinte cutanée ou ganglionnaire non résécable ou métastatique viscérale. Les bénéfices attendus et les effets indésirables doivent être discutés avec le patient. Les médicaments utilisés en première ligne thérapeutique sont la dacarbazine (Deticene®) et la fotemustine (Muphoran®, en particulier en cas de métastases cérébrales). Au-delà de la

première ligne thérapeutique, il n'y a pas d'attitude standard.

La radiothérapie peut être utilisée comme traitement adjuvant. Elle constitue le traitement standard pour les métastases osseuses symptomatiques, éventuellement associée à la chimiothérapie ou à la chirurgie. Elle peut également être utilisée seule ou après exérèse des métastases cérébrales.

### **Efficacité des traitements systémiques**

Les traitements systémiques n'ont pas ou peu d'impact sur les maladies déjà avancées. Pour les mélanomes métastatiques, seule une minorité de patients répond aux traitements systémiques et il ne s'agit que de rémission, généralement de courte durée (Nathan et coll. 1998). La dacarbazine, qui est considérée comme la plus active des molécules pour le traitement du mélanome, ne permet qu'un taux de réponse de 20% pendant en moyenne 4 à 5 mois. D'autres traitements ont été évalués, les taux de réponse ne dépassent pas 15%, au prix de nombreux effets indésirables (temozolomide, cisplatine, carboplatine, vinca alcaloïdes, taxanes, nitrosoureas...).

Une méta-analyse du réseau Cochrane a analysé 28 essais cliniques randomisés comparant l'utilisation de chimiothérapie (dacarbazine, temozolomide, vindesine, cisplatine) versus chimio-immunothérapie ( $IFN\alpha \pm IL-2$ ) chez des patients atteints de mélanome métastatique (Sasse et coll. 2007). Le critère d'évaluation principal a été la survie globale à la clôture des essais : il n'y a pas de différence de survie statistiquement significative, ni entre chimiothérapie et chimio-immunothérapie, ni selon le type d'immunothérapie ( $IFN\alpha$  seul ou  $IFN\alpha+IL-2$ ). Le second critère évalué a été la survie globale à 1,2 et 5 ans. L'analyse des 13 et 11 essais ayant évalués respectivement le taux de survie à 1 et 2 ans, ne montre pas de différences significatives entre les groupes. L'analyse à 5 ans n'a pu être effectuée que sur 2 essais, bien qu'il n'y ait pas de différence significative entre les 2 groupes, une balance bénéfice risque de 2,34 ( $p=0,06$ ) semble être en faveur du groupe chimio-immunothérapie. Les taux de réponse globale (complet ou partiels) ont pu être évalués sur 17 études, un avantage statistiquement significatif en faveur de la chimio-immunothérapie ( $p<0,0001$ ) a été détecté sans distinction entre  $IFN\alpha$  seul ou  $IFN\alpha+IL-2$ . Par ailleurs, l'intensité des effets indésirables dus aux molécules de chimiothérapie semble être majorée par l'adjonction des cytokines.

Ainsi, bien que le taux de réponse global soit en faveur de la chimio-immunothérapie par rapport aux chimiothérapies seules, elle n'améliore ni le taux de

survie global ni la qualité de vie.

Actuellement, dans le cas d'un mélanome isolé faiblement infiltré, le seul traitement permettant une guérison définitive est l'exérèse chirurgicale, les mesures préventives et le diagnostic précoce ont donc une place extrêmement importante. Pour les mélanomes avec disséminations à distance, les traitements de chimiothérapie systémiques classiques seules ou associés n'améliorent que très faiblement la survie globale chez un très faible nombre de patient au prix d'effets indésirables parfois graves. Dans ce contexte, il est important de développer de nouveaux axes de recherche afin de pouvoir proposer aux patients des alternatives thérapeutiques. Le mélanome étant un cancer très immunogène, une des voies thérapeutiques développée par plusieurs équipes depuis de nombreuses années, consiste à induire ou à renforcer les réponses immunitaires dirigées contre la tumeur. Dans ce contexte l'immunothérapie adoptive semble une alternative thérapeutique de choix.

# L'immunothérapie du mélanome

L'espoir que le système immunitaire puisse éliminer les cellules cancéreuses est né il y a près d'un siècle. Dans les années 1940 puis 1950, l'utilisation de tumeurs transplantables a permis de montrer que des greffes tumorales pouvaient être rejetées chez des souris et que ces rejets étaient médiés par le système immunitaire, dans la plupart des cas par des lymphocytes T. L'espoir se précisait donc, sans que l'on comprenne comment des lymphocytes T peuvent distinguer les cellules tumorales des cellules normales. La découverte des antigènes tumoraux a été faite sur une tumeur de souris en 1975. En 1982, la génération dans un modèle murin de mutation au niveau de cellules tumorales a permis de déclencher une réponse immunitaire contre une tumeur jusque là non immunogène. De cette expérience est née l'hypothèse selon laquelle toutes les tumeurs expriment des antigènes, même si ils sont parfois trop faiblement exprimés pour induire une réponse immune efficace (Van Pel et coll. 1982). Les recherches ont abouti vers 1985 à la conclusion que les tumeurs murines portent des antigènes qui peuvent servir de cible à une attaque par des CTL. Les premiers antigènes exprimés par une tumeur humaine ont été décrits en 1991 par l'équipe de Thierry Boon. Les gènes dont ils étaient issus ont été nommés « MAGE », il s'agissait d'antigènes de mélanome (van der Bruggen et coll. 1991). Depuis plusieurs dizaines d'antigènes ont été décrits, ils ont été classés selon leur modalité d'expression. On distingue les antigènes spécifiques de tumeurs, (regroupant les antigènes appelés « cancer- testis » ou « cancer germ-line », les antigènes mutés et ceux d'expression aberrante) ainsi que les antigènes du soi (regroupant les antigènes surexprimés et les antigènes de différenciation).

- **Cancer testis** : le nom de ces antigènes provient de leur expression restreinte aux cellules germinales testiculaires. Ces cellules n'exprimant pas de molécules HLA , elles ne peuvent pas les présenter aux CTLs. Cependant certaines cellules tumorales, suite à des phénomènes de déméthylation, sont capables de les exprimer (De Smet et coll. 1994). L'antigène MAGE A1 appartient à cette catégorie, depuis plusieurs familles ont été découvertes (MAGE, GAGE, LAGE, SSX...)
- **Les antigènes mutés et d'expression aberrante** : ils correspondent à des protéines altérées exprimées par les cellules tumorales suite à des mutations

géniques ou des réarrangements chromosomiques créant ainsi une nouvelle séquence capable de se lier aux molécules de HLA. Ces mutations peuvent s'effectuer au hasard, elles créent alors des mutations uniques, spécifiques du patient, et de fait non exploitables en immunothérapie. En revanche, certaines mutations oncogéniques apparaissent fréquemment au niveau de résidus particuliers et sont partagées par des tumeurs d'origines histologiques variées. Ces cibles sont intéressantes en immunothérapie car leur spécificité élimine tout risque auto-immun et leur expression partagée permet de traiter potentiellement un grand nombre de patient. Cependant très peu d'épitopes de ce type sont actuellement connus dans le cadre du mélanome (NA17A, NY-ESO-1, LAGE).

- **Les antigènes surexprimés** : ils sont issus de protéines exprimées à un niveau de base (souvent faible) dans les cellules normales, mais surexprimées par certains types tumoraux. L'utilisation en immunothérapie de ces antigènes souvent ubiquitaires, peut être à l'origine d'un risque important d'auto-immunité, par rupture de tolérance au soi. La fréquence d'expression de ces différents antigènes dans le mélanome est extrêmement variée. Parmi eux on peut noter : MMP2, p53, HER-2/neu....
- **Les antigènes de différenciation** : ils sont issus de protéines intervenant dans la différenciation cellulaire, par conséquent ils sont exprimés par les cellules saines et les cellules tumorales de la même lignée histologique. Une immunothérapie ciblant ces antigènes ne peut être envisagée que si les cellules saines exprimant cet antigène ne sont pas vitales, ce qui est le cas des mélanocytes dont la destruction est à l'origine de l'apparition d'un vitiligo. Les antigènes issus des protéines gp100, Melan-A/MART-1, tyrosinase font partie de cette catégorie.
- **Les antigènes viraux** représentent une dernière catégorie intéressante d'antigènes tumoraux. La transformation tumorale de certains tissus peut être causée par des virus. C'est le cas pour le carcinome du col utérin (papillomavirus), le lymphome de Burkitt (Virus d'Epstein-Barr) ou certains lymphomes T (virus HTLV-1). Les cellules portent à leur surface des molécules HLA chargées de peptides antigéniques codés par le génome viral. Ces antigènes peuvent être utilisés pour stimuler l'immunité antitumorale des patients porteurs de ce type de tumeur.

On sait grâce à des modèles animaux de tumeurs expérimentales, que les réponses immunitaires peuvent s'opposer efficacement au développement de cellules cancéreuses greffées, et que des lymphocytes spécifiques d'antigènes de tumeurs sont des effecteurs essentiels de ces réponses. Rarement spontanées, les réponses immunitaires anti-tumorales ont été induites chez l'animal par deux grands types de manipulations du système immunitaire : l'immunothérapie active, ou vaccination thérapeutique et l'immunothérapie passive ou adoptive

De même chez les patients atteints de mélanomes métastatiques, les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'antigènes de tumeurs sont présents *in vivo* et sont potentiellement fonctionnels puisqu'ils peuvent être activés *in vitro*. Si des régressions partielles sont fréquemment décrites, ces lymphocytes n'induisent que très exceptionnellement des régressions tumorales complètes (Emanuel et coll. 2008). Cette absence de réponse adaptative anti-tumorale peut être due à un défaut d'activation *in vivo* ou à un contexte tumoral suppresseur. De fait, les deux types d'immunothérapies sont basées sur l'activation de lymphocytes T spécifiques d'antigènes de tumeurs :

- L'immunothérapie active ou vaccination thérapeutique dont le but est de stimuler le système immunitaire *in vivo* et d'aboutir à la destruction de la tumeur. Cette approche consiste à injecter des antigènes sous différentes formes : peptides, protéines, cellules tumorales autologues ou allogéniques ou cellules dendritiques.
- L'immunothérapie passive ou adoptive consiste à transférer à des patients des lymphocytes autologues spécifiques de la tumeur, préalablement sélectionnés et amplifiés *ex vivo*. Ces lymphocytes peuvent être issus du site tumoral lui-même, appelé TIL (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*), qu'ils soient présents au niveau de la tumeur primaire ou secondaire (métastases viscérales ou ganglionnaires) ou de PBMC (*Cellules mononuclées du sang périphérique*) stimulées. Il peut s'agir de populations polyclonales ou de clones T de spécificité bien définie.

### **L'immunothérapie active ou vaccination thérapeutique**

Le but de ces vaccinations est de faire réagir le système immunitaire du patient et plus particulièrement les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL), contre des antigènes tumoraux exprimés par sa propre tumeur : on attend que ces CTL activés par le vaccin, détruisent les cellules tumorales, sans altérer les tissus normaux. Indépendamment de la constitution du vaccin, l'objectif consiste toujours à fournir l'antigène dans un contexte

idéal de stimulation afin de permettre la génération in vivo d'une réaction immunitaire anti-tumorale. Ces vaccins constituent une forme active d'immunothérapie puisqu'ils sont fondés sur la capacité du receveur à induire une réponse immunitaire contre les antigènes administrés. Ainsi, les patients participant à ces essais cliniques doivent être immunocompétents.

### **Les vaccins peptidiques ou protéiques**

Comme nous l'avons décrit précédemment, de nombreux peptides tumoraux exprimés par les mélanomes ont été identifiés. La simplicité de la production et de l'administration de vaccins basés sur des peptides a permis le développement de nombreux essais cliniques et plusieurs groupes ont développé des stratégies dans lesquelles ces peptides sont utilisés seuls ou en association avec des cytokines (IL-2, IL-12, GM-CSF) ou des adjuvants (adjuvant incomplet de Freund, ligand des récepteurs Toll) (Parmiani et coll. 2002). L'un des premiers essais cliniques utilisant des peptides tumoraux de mélanome a été entrepris par le groupe de Rosenberg (Rosenberg et coll. 1998). Des patients atteints de mélanomes de grade IV ont été vaccinés avec un peptide immuno-dominant de l'antigène gp100. En se basant sur les critères RECIST (nouvelles recommandations pour l'évaluation de la réponse tumorale dans les tumeurs solides), l'efficacité de cette première tentative de vaccination n'a pas été probante. En effet, aucune réponse correspondant à ces critères n'est mise en évidence. En 1998, les critères d'évaluation des réponses étaient moins encadrés, et les auteurs estimaient que la grande majorité des patients (10 sur 11) avaient répondu de façon positive à l'immunisation contre ce peptide. Ils soulignaient cependant qu'aucun des malades n'avait connu de rémission complète.

Depuis, plusieurs essais ont été entrepris et l'analyse des données récentes de la littérature confirme que cette stratégie n'apporte que des réponses limitées d'un point de vue thérapeutique (Slingluff et coll. 2003). En effet, une méta-analyse de 11 essais cliniques de vaccination peptidique, ayant inclus 175 patients montre que, selon les critères RECIST, seul 7 patients, soit 4%, ont montré une réponse objective (Rosenberg et coll. 2004). Un des problèmes de la vaccination peptidique repose sur l'instabilité des peptides. Par exemple, il a été montré que le peptide Melan-A subissait une dégradation rapide par des protéases in vivo (Brinckerhoff et coll. 1999), tandis que la modification chimique de certains acides aminés semble le rendre plus résistant (Blanchet et coll.

2001).

La vaccination par protéines de tumeurs et non plus par des peptides tumoraux, semble permettre le développement d'une réponse polyclonale. Des essais de phase I, effectués avec l'antigène tumoral NY-ESO-1 associé à un adjuvant, ont permis d'obtenir des réponses immunologiques et sembleraient ralentir l'évolution tumorale (Davis et coll. 2004; Valmori et coll. 2007).

### **La vaccination par cellules tumorales :**

La vaccination par cellules tumorales consiste à injecter des cellules de mélanomes autologues ou allogéniques inactivées, associées à un adjuvant, dans le but de potentialiser la réponse immunitaire. L'utilisation de cellules tumorales autologues, comme l'utilisation de protéines totales, est à même d'entraîner une réponse immune polyclonale. Indépendamment des difficultés techniques liées à l'extraction et la purification des cellules tumorales, à l'heure actuelle, cette technique n'a pas montré d'efficacité dans le mélanome : ainsi, Berd et al n'obtiennent que 12% de réponses cliniques chez des patients atteints de mélanomes métastatiques (Berd et coll. 2001). La découverte d'antigènes communs exprimés par les mélanomes et la difficulté que représente la purification de cellules tumorales ont conduit à utiliser en thérapeutique des lignées allogéniques de mélanome portant des antigènes fréquemment exprimés tels que MelanA/MART1, MAGE-1, gp100. Deux vaccins cellulaires établis à partir de lignées humaines montrent une efficacité en association avec des adjuvants dans des études de phase II, mais l'efficacité est diminuée chez des patients présentant des métastases (Hsueh et coll. 1998). Ainsi en 2004, une étude analysant 5 essais cliniques ayant évalué l'efficacité de l'injection de cellules tumorales natives ou modifiées dans différents types de cancers métastatiques (2 mélanomes, 2 poumons et 1 sein) montre que seuls 6 patients sur 142, soit 4,2%, ont eu une réponse au traitement (Rosenberg et coll. 2004).

### **La vaccination par protéines de choc thermique :**

Les protéines de choc thermique (HSP) sont des protéines chaperonnes présentes dans le réticulum endoplasmique ou le cytosol. Elles jouent un rôle dans l'homéostasie cellulaire en protégeant les protéines intracellulaires de l'agrégation en cas de stress. Certaines de ces protéines, notamment HSP70 et HSP96 (gp96) sont chargées en peptides de tumeurs antigéniques et peuvent être endocytées par des cellules

dendritiques. Cette endocytose provoque la maturation de la cellule dendritique ainsi que l'apprêtement de l'antigène par les molécules de CMH de classe II mais également de classe I. L'utilisation de la protéines gp96 dans des protocoles de vaccinations a été évaluée dans deux études cliniques, chez des patients porteurs de mélanomes métastatiques, leur analyse montre que seulement 2 patients sur 44, soit 4,5%, ont présenté une réponse clinique (Belli et coll. 2002). Un essai plus récent, de phase II, associant, chez des patients atteints de mélanomes métastatiques, la vaccination par des complexes gp96/peptides issus de cellules tumorales et GM-CSF/INF $\alpha$  ne retrouve pas les réponses cliniques décrites par les études précédentes (Pilla et coll. 2006).

### **Injection de cellules présentatrices chargées :**

La majorité de ces protocoles utilisent, en tant que CPA, des cellules dendritiques générées *ex vivo*, bien que, par souci de simplification, certaines équipes aient utilisé des PBMC autologues (Peterson et coll. 2003). Les cellules dendritiques sont produites à partir de monocytes issus de PBMC ou à partir de progéniteurs CD34+ différenciés et amplifiés *in vitro* à l'aide de cocktails de cytokines. Ces cellules peuvent être sensibilisées aux antigènes tumoraux par chargement direct de peptides synthétiques spécifiques, ou par chargement indirect à l'aide de corps apoptotiques ou d'exosomes provenant de la tumeur autologue. Le chargement de ces cellules dendritiques par des peptides tumoraux a pour avantage de ne pas nécessiter le prélèvement des cellules tumorales des patients.

L'utilisation de cellules tumorales comme source d'antigène présente quant à elle l'avantage d'induire des réponses immunitaires polyclonales incluant éventuellement des réponses immunes contre des antigènes tumoraux encore inconnus, mais elle nécessite d'avoir accès aux cellules tumorales des patients et d'établir ces tumeurs en culture primaire. Dans la plupart des études de phase I, des réponses immunologiques avec apparition de lymphocytes T spécifiques sont retrouvées, cependant la plupart de ces études n'avaient pas vocation à étudier la réponse clinique. En 2004, une étude analysant 10 essais cliniques ayant évalué l'efficacité de l'injection de cellules dendritiques chargées en peptide ou en lysat cellulaire dans différents types de cancers métastatiques (5 concernant le mélanome, 2 le rein, 1 le colon, 1 en pédiatrie et 1 de multiples cancers) montre que seuls 14 patients sur 148, soit 7,1%, ont montré une réponse au traitement (Rosenberg et coll. 2004).

### **Vaccination par plasmides ou vecteurs viraux :**

L'utilisation de plasmides ou de vecteurs viraux codant pour des antigènes tumoraux est une autre approche utilisée dans des stratégies de vaccinations anti-tumorales. Dans ce type de vaccination, l'activation de lymphocytes T cytotoxiques par les cellules dendritiques présentant des antigènes de tumeurs, peut s'effectuer de deux façon différentes. L'ADN codant pour un antigène tumoral peut être soit directement transfecté ou apporté par infection virale dans des cellules dendritiques, soit ce sont des cellules non présentatrices d'antigènes qui sont transfectées ou infectées par cet ADN.

Dans une étude de phase I portant sur des patients atteints de mélanome de stade IV et vaccinés avec un plasmide codant pour l'antigène gp100, 1 seul patient sur 22 a développé une réponse clinique partielle (Rosenberg et coll. 2003). Une étude plus récente a évalué les réponses immunologiques chez des patients atteints de mélanomes après injection d'un plasmide codant pour 7 peptides antigéniques. Ce plasmide a été injecté soit tel quel, soit inséré dans un virus Ankara (forme modifié du virus de la vaccine). L'utilisation du vecteur viral a favorisé l'augmentation des CTL spécifiques par rapport au plasmide nu (Smith et coll. 2005).

L'utilisation de vecteurs viraux, comme les adénovirus, canarypox virus ou virus de la vaccine, codant pour l'ADNc d'intérêt, présente l'avantage d'avoir une forte efficacité d'infection des cellules dendritiques. Plusieurs études vaccinales utilisant différents virus recombinants codant pour divers antigènes tumoraux du mélanome (gp100, MART-1, tyrosinase) se sont avérées décevantes car elles n'ont montré que des réponses immunologiques occasionnelles et des réponses cliniques exceptionnelles (van Baren et coll. 2005; Lindsey et coll. 2006; Jäger et coll. 2006). De plus, même l'utilisation de cellules infectées par des virus recombinants codant à la fois pour des antigènes tumoraux, et d'autres molécules favorisant l'induction des réponses immunes comme les molécules de costimulation (CD80, CD86) n'ont donné dans l'ensemble que de faibles réponses sur le plan clinique (Zajac et coll. 2003; Kaufman et coll. 2003).

En 2004, une étude analysant 9 essais cliniques ayant évalué l'efficacité de l'injection de vecteurs viraux dans le mélanome métastatique montre que seuls 3 patients sur 160, soit 1,9%, ont montré une réponse au traitement (Rosenberg et coll. 2004). Une des limites de cette technique réside dans le fait que les patients développent souvent une réponse immune antivirale, associée à la production d'anticorps dirigés contre les protéines du vecteur viral (Rosenberg et coll. 1998).

Il apparaît donc que si les protocoles vaccinaux permettent l'augmentation de CTL spécifiques, très peu de bénéfices thérapeutiques objectifs ont été obtenus, et ce, quels que soient les cancers considérés et les approches vaccinales utilisées.

Certaines études ont montré que la fréquence des cellules spécifiques avait augmenté d'un facteur 5 ou 6 (Eder et coll. 2000), mais il n'est pas exclu que ce nombre soit encore insuffisant pour détruire la tumeur. Néanmoins, d'autres études ont pu obtenir des fréquences beaucoup plus élevées et malgré cela, aucune régression tumorale n'a été observée (Rosenberg et coll. 1998; Rosenberg et coll. 2005). Ces données viennent conforter des observations faites chez la souris, où il a été démontré que la présence d'un grand nombre de cellules T spécifiques d'antigènes tumoraux n'était pas suffisante pour entraîner une régression tumorale, les cellules devant être dans un état d'activation et de différenciation correcte pour être efficaces (Overwijk et coll. 2003; Speiser, Miranda, et coll. 1997). Par ailleurs la faible efficacité des approches de vaccination peut être expliquée par des mécanismes d'échappement tumoral. En effet, malgré le processus de surveillance, l'apparition clinique d'une masse tumorale indique que le cancer en développement a été capable d'éviter sa reconnaissance (ignorance immunologique) ou sa destruction (tolérance ou échappement) par le système immunitaire. Ainsi, lors du développement d'un cancer, les obstacles semés par les cellules tumorales ne semblent pouvoir être dépassés ni par une réponse immune physiologique ni, pour l'instant, par des approches de vaccination thérapeutique. Dans cette optique, l'immunothérapie passive permet, en partie, de s'affranchir de l'ignorance immunologique et d'un certain nombre de mécanismes d'échappements. Elle présente en plus l'intérêt de pouvoir contrôler les phénomènes d'activation ainsi que la caractérisation et le suivi *in vivo* des cellules injectées.

### **L'immunothérapie adoptive**

Les stratégies d'immunothérapie cellulaire passive anti-tumorale consistent à injecter le plus grand nombre possible d'effecteurs cellulaires. Cette approche doit tenir compte d'un certain nombre de contraintes, en particulier, les cellules injectées doivent être capable de migrer vers les sites tumoraux, de survivre chez l'individu suffisamment longtemps pour initier une réponse, l'idéal étant qu'elle puissent se multiplier *in vivo*. Des modèles animaux de tumeurs expérimentales ont montré que le transfert de lymphocytes T spécifiques d'antigènes de tumeurs pouvait induire une immunité

passive, capable d'empêcher le développement des cellules cancéreuses greffées ou même d'éradiquer des métastases établies de ces cancers.

Chez l'homme, les premiers essais d'immunothérapie passive ont consisté en la réinjection de cellules appelées LAK (*Lymphokine Activated Killer*), obtenues par la culture du sang périphérique en présence de fortes doses d'interleukine-2. Il avait en effet été établi que ces cellules étaient capables de lyser les cellules tumorales (Grimm et coll. 1982) Des doses massives d'IL2 étaient associées à l'injection, visant à générer ces mêmes cellules *in vivo* (Rosenberg et coll. 1987). Ces traitements ont permis des régressions ou des stabilisations sporadiques de la croissance tumorale, mais étaient relativement toxiques et mal tolérés, principalement à cause de l'IL2. Finalement, une étude prospective a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre une thérapie par LAK et une thérapie par IL2 seule chez des patients atteints de carcinome rénal métastatique ou de mélanome (Rosenberg et coll. 1993).

À la différence de ces premiers essais, actuellement les protocoles d'immunothérapie passive sont spécifiques d'antigènes. Les CTL sélectionnés et amplifiés *in vitro* peuvent être obtenus à partir de TIL ou à partir de PBMC.

### **Injection de TIL**

Les TIL sont des lymphocytes qui infiltrent les tumeurs. Plusieurs études ont montré que parmi ces TIL, il y avait des lymphocytes T CD8 spécifiques de la tumeur et qu'ils étaient capables de la lyser *in vitro*. A partir d'un fragment de tumeur, il est possible d'isoler et de cultiver ces cellules *ex vivo* en présence d'IL2. Ainsi, différents essais d'immunothérapie basés sur la ré-injection de grandes quantités de TIL amplifiés *ex vivo* ont été menés.

L'intérêt thérapeutique des TIL a d'abord été montré chez la souris. L'équipe de Rosenberg a montré que la ré-injection de TIL entraînait la disparition de métastases hépatiques et pulmonaires (Rosenberg et coll. 1986). Chez l'homme, plusieurs essais cliniques par injection de TIL associés à de l'IL2 ont été menés. Des réponses immunologiques sont fréquemment observées, et dans un certain nombre de cas, les traitements sont associés à des réponses cliniques.

Un premier essai clinique significatif, de part le nombre de patients inclus (86), a consisté à injecter des TIL associés à de fortes doses d'IL2 (doses maximales tolérées par les patients) chez des patients atteints de mélanome métastatique. Des taux de réponses

objectives de 34% ont été enregistrés, contre 31% par un traitement par IL-2 seule. La fréquence des réponses au traitement est significativement plus importante chez les patients traités par des TIL issus de cultures jeunes, qui se divisent le plus rapidement et qui sont les plus cytotoxiques vis-à-vis de la tumeur autologue (Rosenberg et coll. 1994). Ces résultats illustrent que les conditions d'amplification *ex vivo* des cellules injectées influencent les réponses cliniques ou immunologiques *in vivo*. Des régressions cliniques objectives ont été observées chez six patients parmi les treize évaluables, avec une démonstration de la survie prolongée et de la multiplication des TIL injectés dans le sang des patients (plus de quatre mois), et de leur migration dans la tumeur. Cinq patients ont développé une réponse auto-immune de type vitiligo (dépigmentation cutanée) ou uvéite. Ces réponses et les régressions tumorales, souvent associées chez un même patient, tendent à confirmer le rôle des TIL spécifiques de ces antigènes dans l'effet thérapeutique obtenu. Deux patients ont cependant développé des effets secondaires graves : un lymphome B-EBV et une infection par un virus syncytial, deux maladies dont on sait que l'émergence est favorisée par des traitements immunosuppresseurs. Ils montrent également que chez deux des patients traités c'est une sous-population de lymphocytes T CD8 clonale (dérivée d'un seul lymphocyte) et spécifique du même antigène mélanocytaire, Melan-A/MART-1, qui a survécu et s'est multipliée dans le sang, jusqu'à représenter la majorité des lymphocytes T CD8 circulants (Dudley et coll. 2002). Cette étude a été poursuivie, sur trente-cinq patients traités, dix-huit réponses objectives ont été enregistrées, dont trois réponses complètes (Dudley et coll. 2005).

Actuellement l'injection de TIL polyclonaux est réalisée essentiellement par deux groupes : celui dirigé par Steven Rosenberg et le nôtre, dirigé par Francine Jotereau. La différence majeure réside dans la lymphodéplétion réalisée par le groupe de Rosenberg. Il s'agit d'une déplétion lymphocytaire sévère mais non lymphoablative réalisée par administration de cyclophosphamide puis de fludarabine avant l'injection de TIL. Les auteurs justifient la lymphodéplétion comme une stratégie permettant d'augmenter la survie des lymphocytes T injectés par des mécanismes d'homéostasie, et d'augmenter leur efficacité en éliminant les populations régulatrices.

Malgré cette différence, des taux de réponses cliniques objectives comparables sont obtenus. Un premier essai randomisé visant à établir l'efficacité clinique de l'injection de TIL+IL2 versus l'IL2 seule a inclus 88 patients. Bien que le pourcentage de

survie sans rechute des deux groupes ne soit pas significativement différent, une analyse par sous-groupe révèle une survie plus longue des patients présentant un seul ganglion envahi et traités par injection de TIL. Parmi les trente-quatre patients concernés (un seul ganglion envahi), le taux de survie sans rechute est de 66% pour le sous-groupe traité par TIL+IL2, contre 31% pour les patients traités par l'IL2 (Brigitte Dréno et coll. 2002), cette corrélation a été confirmée dans une actualisation des résultats cliniques publiée sept ans après le dernier patient traité (Khammari et coll. 2007). Ceci illustre que les meilleures chances de réussite de l'immunothérapie sont associées à des stades moins avancés de la maladie. L'analyse fonctionnelle des TIL injectés a permis de montrer que la survie est corrélée à la présence, parmi les TIL injectés de lymphocytes réactifs vis-à-vis de la tumeur autologue (Nathalie Labarrière et coll. 2002). Des conclusions similaires avaient été apportées par une étude prospective du groupe de Rosenberg (Kawakami et coll. 1995). Une analyse à posteriori de la spécificité des TIL injectés a montré qu'il existait une corrélation entre la présence de lymphocytes spécifiques de Melan-A et la survie sans rechute de patient HLA-A\*02 (Benlalam et coll. 2007).

Ainsi l'utilisation de TIL ne nécessite pas la caractérisation préalable d'antigènes de tumeurs, et peut permettre d'injecter des effecteurs dont la spécificité antigénique n'est pas connue. Néanmoins, il s'avère que les TIL ne contiennent pas toujours des proportions significatives de lymphocytes T qui reconnaissent la tumeur. Ces études de caractérisation, qui nécessitent de disposer de la lignée tumorale autologue, peuvent difficilement être menées avant l'injection au patient. De plus, l'obtention de TIL à partir du site tumoral (ou des ganglions envahis par la tumeur) est un processus lourd qui freine le développement à plus grande échelle de ces stratégies. Aussi d'autres stratégies ont été développées en parallèle.

### **Injection de populations enrichies en lymphocytes T CD8 spécifiques**

Des cellules spécifiques des antigènes tumoraux sont également détectées dans le sang périphérique de patients, parfois à des fréquences assez élevées, en particulier dans le contexte Melan-A/MART-1 (Pittet et coll. 1999). Ainsi, quelques essais ont étudié l'injection de cellules provenant d'échantillons de sang périphérique du patient, plus facilement accessibles.

Les lymphocytes T CD8 totaux triés peuvent être stimulés ex vivo de manière antigène-spécifique afin de garantir un enrichissement en lymphocytes T spécifiques. Ainsi, dans un essai clinique récent, Meidenbauer et al. ont injecté à huit patients porteurs de mélanomes avancés et réfractaires aux traitements standards, des populations T CD8 pures enrichies en lymphocytes T anti Melan-A/MART-1 obtenus par re-stimulation par des cellules dendritiques chargées en peptide. Les populations injectées contenaient en moyenne 42% de lymphocytes spécifiques, ce qui représentait de  $0,25$  à  $11 \times 10^8$  cellules. Afin de suivre leur devenir dans l'organisme, l'ensemble a été préalablement marqué par un radio-élément (indium-111). Il n'y a pas de résultat clinique associé à l'étude, mais les auteurs montrent que les cellules injectées se localisent dans les poumons, la rate et le foie et dans les lésions métastatiques et sont capables de survivre dans l'organisme pendant quelques semaines (Meidenbauer et coll. 2003).

Par ailleurs on recense deux essais de phase I ayant évalué l'injection de lymphocytes issus de sang périphérique. L'objectif primaire de ces études était de démontrer la faisabilité et d'évaluer la toxicité de l'injection de lymphocytes dérivant du sang périphérique. Aucun patient n'a montré de réponse dans l'essai de l'équipe de Powell, et seuls 2 patients ont répondu au traitement dans l'essai de Mackensen (Powell et coll. 2006; Mackensen et coll. 2006).

### **Injection de clones**

Une autre stratégie vise non plus à injecter des populations polyclonales, mais des clones T CD8+ dirigés contre des épitopes antigéniques spécifiques de la tumeur. Cette approche est séduisante car les caractéristiques des clones (spécificité, avidité, fonctions effectrices) peuvent être déterminées avant l'injection, rendant l'interprétation des résultats plus évidente. Le développement de cette approche est rendu possible par la caractérisation fine de nombreux antigènes tumoraux.

Le premier essai de phase I a été mené par le groupe de Greenberg chez dix patients atteints de mélanome métastatique (Yee et coll. 2002). Dans cette étude, les clones, issus de PBMC, ont été sélectionnés pour leur spécificité contre les antigènes mélanocytaires Melan-A/MART-1 ou gp100 et ont été injectés accompagnés ou non d'IL2, sans conditionnement immunosuppresseur préalable. Une stabilisation de la maladie a été observée, mais aucune réponse clinique objective n'a pu être obtenue. Des

arguments immunologiques intéressants sont rapportés dans cette étude : chez un patient, trois jours après l'injection, les clones injectés représentaient plus d'un tiers des lymphocytes CD8 infiltrant une des tumeurs, ceci suggère une migration et une accumulation préférentielle des lymphocytes injectés dans le site tumoral. De plus, sur des biopsies tumorales de 3 patients sur 5, le groupe a noté une perte d'expression des antigènes après injection, alors que les immuno-marquages montraient une intense expression de ces mêmes antigènes avant traitement (Yee et coll. 2002, 2000). Ainsi, chez des patients pour lesquels une régression tumorale a été observée, la présence d'une forte proportion de clones sur le site tumoral associée à une perte d'expression des antigènes ciblés, sont en faveur d'une contribution directe des lymphocytes injectés. Cependant, si les clones transférés persistent en moyenne deux semaines, ils disparaissent ensuite rapidement de la circulation périphérique, et malgré quelques régressions isolées de métastases, aucune réponse clinique objective n'a pu être obtenue.

Le groupe de Rosenberg a également mené un essai de phase I par injection de clones associés à différentes doses d'IL2, chez des patients porteurs de mélanome métastatique ayant préalablement subi un traitement immunosuppresseur. Les clones, issus de TIL ou de PBMC, étaient sélectionnés en fonction de leur capacité à sécréter de l'INF- $\gamma$ , GM-CSF, IL-2, TNF- $\alpha$  et très peu d'IL-4 et d'IL-10. Après injection, ils sont devenus rapidement indétectables en deux semaines et aucune réponse clinique objective n'a été observée chez les onze patients traités (Dudley et coll. 2001).

Parallèlement, notre équipe a réalisé un essai basé sur l'injection d'un ou deux clones de lymphocytes T CD8+ spécifiques de Melan-A chez 16 patients porteurs d'un mélanome de stade IV, une étude intermédiaire sur les 10 premiers patients à été publiée en 2005 (Vignard et coll. 2005). Les clones ont été obtenus par dilution limitante après stimulation ex vivo des PBMC par une lignée tumorale allogénique chargée avec le décimère modifié Melan-A<sub>26-35</sub> (Gervois et coll. 2000). Bien que les marquages tétramères montrent une augmentation du nombre des CTL spécifiques de Melan-A chez tous les patients, le suivi des clones injectés ne montre leur persistance en périphérie que chez trois patients. D'un point de vue clinique, des régressions de métastases ou des stabilisations de la maladie ont été enregistrées chez 6 patients et un patient a présenté une régression complète. Chez ce patient, on a détecté des clonotypes spécifiques de melan-A différents de ceux injectés, ils présentaient une meilleure avidité. Ceci suggère

que les clones injectés ont pu initier une réponse contre la tumeur et que cela a pu aboutir à l'expansion du répertoire dirigé contre Melan-A/MART-1. Ce phénomène appelé « *repertoire spreading* » a été décrit pas d'autres équipes au cours de protocoles de vaccination avec des peptides issus de l'antigène de mélanome MAGE (Germeau et coll. 2005; Lurquin et coll. 2005).

### **Transfert de lymphocytes modifiés génétiquement**

Une des limites majeures des thérapies adoptives réside dans le fait qu'elles sont très lourdes techniquement et logistiquement à mettre en place. Dans cette optique le groupe de SA Rosenberg a cloné les chaînes a et b d'un TCR anti-Melan-A à partir d'un clone issu de TIL obtenu chez un patient atteint de mélanome métastatique ayant montré une régression presque complète après un transfert adoptif de TIL (Dudley et coll. 2002). Un vecteur rétroviral a été construit et optimisé pour l'expression de ce TCR. In vitro, 50% des lymphocytes infectés expriment le TCR et les cellules sont capables de produire de l'INF- $\gamma$  et du GM-CSF en réponse à la présentation du peptide (Hughes et coll. 2005). Ainsi un essai clinique ayant inclus 17 patients a évalué, après lymphodéplétion, l'efficacité du transfert de PBL autologues transduites par le TCR anti-Melan-A. Les lymphocytes injectés ont été détectés à des fréquences supérieures à 10% des PBL jusqu'à au moins deux mois après l'injection chez 15 patients. Pour 2 patients, des régressions tumorales objectives ont été obtenues et les cellules étaient encore détectées un an après l'injection (Morgan et coll. 2006). Depuis cette publication 14 nouveaux patients ont été inclus et deux présentent une régression objective (Dudley et coll. 2007). Une autre équipe s'est intéressée à cette approche, 15 patients ont reçu des CTL allogéniques transfectées par un TCR anti-Melan-A directement dans les sites tumoraux. Des régressions tumorales ont été obtenues à la fois sur les sites ayant reçu les cellules mais également sur des sites non traités (Duval et coll. 2006).

Les derniers essais de transfert adoptif de TIL sont très encourageants puisque les résultats des 2 principales équipes les réalisant montrent des réponses cliniques objectives chez près de la moitié des patients traités. Au stade actuel, une des questions qui subsiste concerne la cible des cellules injectées. Est-il préférable de cibler une spécificité antigénique ou bien obtiendra-t-on un bénéfice supplémentaire à injecter des populations dirigées contre plusieurs épitopes différents? Jusqu'à présent, c'est la

protéine Melan-A/MART-1 qui est la plus souvent ciblée dans les protocoles cliniques contre le mélanome parce que cet antigène est fréquemment exprimé par les cellules tumorales et parce qu'un large répertoire T dirigé contre cet antigène existe chez les patients. Cependant, un risque potentiel des stratégies qui ne viseraient qu'un seul antigène est de voir la tumeur échapper en perdant son expression, comme cela a déjà été montré suite à un protocole de vaccination peptidique (Lee et coll. 1998). De plus, le clonage est un processus long qui nécessite de multiples stimulations, or il a été démontré à plusieurs reprises que ces re-stimulations successives pouvaient être à l'origine de la sélection de certains clonotypes (Alexander-Miller et coll. 1996; Zeh et coll. 1999). Ces éléments de réponse pourraient expliquer les résultats cliniques décevants obtenus dans les protocoles basés sur l'injection de clones (Yee et coll. 2002; Dudley et coll. 2002) ou de lymphocytes transfectés par un TCR particulier (Morgan et coll. 2006).

## Projet de recherche et objectif du travail

La thérapie adoptive des cancers s'intéresse aux pathologies capables de générer une réponse immunitaire et pour lesquels des lymphocytes spécifiques naturels existent. De nombreux protocoles d'immunothérapie passive reposent sur l'injection de lymphocytes T CD8+ humain. L'équipe de Francine Jotereau mène depuis de nombreuses années des recherches sur l'étude des lymphocytes T dirigés contre le mélanome, à ce titre, plusieurs essais d'immunothérapie adoptive ont été réalisés, que ce soit par l'injection de TIL (Labarrière et coll. 2002), ou de clones lymphocytaires T anti-Melan-A (Vignard et coll. 2005). Dans le cadre de l'injection de clone, la méthode de génération de cellules à usage thérapeutique nécessite une production de plusieurs mois. Pour les protocoles basés sur l'injection de TIL, si la production de cellule est plus rapide, on ne peut présager ni du ratio de lymphocytes CD8+ par rapport au CD4+ ni leurs spécificités, avant la fin de la production. De fait, des optimisations concernant les méthodes de génération de cellules à usage thérapeutique sont à développer, notamment en termes de rapidité et la simplicité. Ainsi le projet de recherche que nous développons consiste à mettre au point de nouvelles stratégies d'obtention de cellules spécifiques cytotoxiques capable de lyser les cellules tumorales.

Le premier travail auquel j'ai participé concernait la source des cellules spécifiques de Melan-A. Jusqu'à présent, la majorité des lymphocytes T spécifiques amplifiés étaient issus soit de ganglions (TILN), soit du site tumoral (TIL), soit de cellules circulantes après une étape de clonage. Très peu d'essais cliniques se sont intéressés à l'injection de populations polyclonales issues du sang périphérique (Meidenbauer et coll. 2003).

Dans une première partie, nous montrons que les lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A présents dans le sang périphérique, présentent les mêmes caractères de diversité de répertoire et de fonctionnalité que leurs homologues issus de TILs. Pour mener à bien ce projet, nous avons été amené à utiliser une méthode de tri immunomagnétique afin de purifier les populations spécifiques de Melan-A. Cette technique, basée sur l'interaction entre le TCR et un complexe CMH/peptide donné, s'est avérée très efficace en termes de pureté et de qualités des cellules obtenues. Aussi, nous avons décidé d'adapter cet outil afin de l'exploiter dans le cadre d'essais clinique chez l'homme, puisque aucune technique de grade clinique ne permettait le tri de

lymphocytes T sur la base de leur spécificité.

L'étape suivante a donc été d'adapter cet outil en vue d'une utilisation en médecine humaine. Jusqu'à présent, l'immobilisation des complexes CMH-peptides recombinants sur les supports immuno-magnétiques, était assurée par l'interaction biotine/streptavidine. La streptavidine étant une protéine d'origine bactérienne, et donc potentiellement immunogène, aucune forme de grade clinique n'était et n'est à ce jour disponible.

De fait, nous avons développé une méthode pour laquelle l'immobilisation des complexes CMH-peptide à la surface de la bille immuno-magnétique se fait par le biais d'un anticorps, et non plus par le couple streptavidine-biotine. Chaque élément pouvant être produit selon les bonnes pratiques de fabrication, cette technique de tri devient utilisable pour de futurs protocoles d'immunothérapie.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés aux signaux de co-stimulation des lymphocytes T CD8+.

En effet, les différents essais cliniques de transfert adoptif développés au CHU de Nantes utilisent, pour la génération des lymphocytes T CD8, une méthode de re-stimulation polyclonale par de la PHA associée à de l'IL-2 (150UI/ml) et des cellules nourricières irradiées. Si ces stimulations sont nécessaires à l'obtention d'un nombre suffisant de cellules spécifiques, elles aboutissent à un état de différenciation avancé, objectivé entre autres, par la perte du marqueur CD28. Or, il est aujourd'hui bien établi que les cellules CD28+ ont des capacités prolifératives supérieures au CD28- (Powell et coll. 2005), et que la présence de ces lymphocytes, semble être corrélé à une meilleure efficacité clinique des protocoles d'immunothérapie (Zhou et coll. 2005).

L'objectif de ce travail était de déterminer l'impact des co-signaux sur la stimulation de lymphocytes T CD8 spécifiques. Nous avons choisi d'étudier les effets d'un anticorps anti-CD28 et du 4-1BBL sur des lymphocytes T CD8+ stimulés ex vivo par un complexe CMH/peptide recombinant. Ces ligands sont indispensables à une stimulation correcte des lymphocytes, si certaines de leur fonctions restent à élucider, le 4-1BB et le CD28 jouent un rôle essentiel dans la génération et la maintenance d'un pool de lymphocytes T CD8 mémoires (Bertram et coll. 2002a; Borowski et coll. 2007; Pülle et coll. 2006a). Cet effet semble passer, entre autres, par le maintien d'un faible taux de la protéine pro-apoptotique Bim (Sabbagh et coll. 2006), et par une augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotique tel que Bcl-x<sub>L</sub> et c-FLIP<sub>s</sub> (Stärck et coll. 2005 ;

Kirchhoff et coll. 2000). En nous basant sur ces résultats, nous avons voulu comparer les effets du 4-1BB ligand recombinant humain produit dans le laboratoire (Rabu et coll. 2005) par rapport à la stimulation du CD28 à la fois dans un contexte de lymphocytes T CD8 naïfs mais également pour des lymphocytes ayant déjà été en contact in vivo avec l'antigène.

En nous appuyant sur des travaux déjà effectués dans le laboratoire (Rabu C. 2005), nous avons entrepris de développer un modèle de stimulation acellulaire afin d'étudier l'importance relative de ces molécules de co-stimulation dans un modèle de lymphocytes T CD8 anti-tumoraux. Notre choix s'est porté sur le modèle Melan-A/MART-1 en raison d'un répertoire naïf important chez une majorité de donneurs sains (Pittet et coll. 1999). Ce modèle nous permettait également d'étudier des lymphocytes T CD8 anti-tumoraux ayant déjà rencontrés l'antigène (malades). Disposant de complexe HLA-A\*0201/Melan-A et de 4-1BBL recombinant ainsi que d'un anticorps agoniste anti-CD28 nous avons, dans un premier temps, mis en place les conditions de culture, avant de tester différentes combinaisons de signaux : HLA-peptide seul ou associé soit à l'anticorps anti-CD28 soit au 4-1BBL. Nous avons ensuite évalué différents paramètres de la stimulation en termes de nombre et de phénotype des cellules obtenues.

# **RESULTATS**

# **Developpement d'une technique de tri utilisable en clinique**

## **Choix de la source de cellule spécifique de Melan-A**

Le succès des protocoles d'immunothérapie anticancéreuse repose sur la génération ex vivo et la persistance in vivo d'un nombre suffisant de cellules spécifiques. Ces cellules doivent avoir les caractéristiques fonctionnelles appropriées afin de pouvoir migrer au niveau des sites tumoraux et de détruire les cellules cancéreuses. Des lymphocytes anti-tumoraux ont été mis en évidence dans deux sources différentes : les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) qu'il s'agisse de la tumeur primaire, de métastases ou de ganglions envahis et les lymphocytes circulant dans le sang périphérique.

La réinjection de TIL dans le cadre de protocoles d'immunothérapie bénéficie d'un grand recul d'utilisation. Le premier essai thérapeutique humain ayant évalué l'efficacité de l'injection de TIL dans le mélanome date de 1988 (Rosenberg et coll. 1988). Depuis, de nombreuses équipes ont développé et amélioré cette approche, notamment au CHU de Nantes où plusieurs essais thérapeutiques utilisant l'injection de TIL anti-mélanome ont été développés (Dréno et coll. 2002; Khammari et coll. 2007).

Deux essais de phase I ont évalué l'injection de clones issus de TIL ou de PBMC, quelques réponses mineures ont été rapportées par les auteurs, cependant aucune réponse clinique objective, selon les critères RECIST, n'a été obtenue (Dudley et coll. 2001; Yee et coll. 2002). Il n'est pas exclu que la forte expansion ex vivo et les temps de culture très longs nécessaires à ces protocoles soient à l'origine de ces échecs.

Les lymphocytes T CD8 anti-tumoraux circulant dans le sang périphérique présentent l'avantage d'être facilement accessibles, cependant leur utilisation dans les protocoles d'immunothérapie bénéficie de moins de recul. Seuls deux essais de phase I évaluant l'injection de lymphocytes issus de PBL sont recensés. L'objectif primaire de ces études était de démontrer la faisabilité et d'apprécier la toxicité de l'injection de lymphocytes dérivant du sang périphérique. Cependant, aucun patient n'a montré de réponse dans l'essai de l'équipe de Powell, et seul 2 patients ont répondu au traitement dans l'essai de Mackensen (Powell et coll. 2006; Mackensen et coll. 2006). Ces taux de

réponse sont bien inférieurs à ceux qui ont été obtenus grâce à l'injection de TIL, pour lesquels des réponses cliniques, partielles ou totales, ont parfois été observées chez 50% des patients (Dudley et coll. 2005; Labarrière et coll. 2002). Ainsi, devant ces résultats, la question de l'origine des cellules se pose, et il paraît important de compléter nos connaissances sur cette source de lymphocytes anti-tumoraux à la fois en termes de répertoire et de fonctionnalité, mais également en termes de culture in vitro, afin d'éviter d'éventuels biais. Dans cette optique, des analyses de répertoire anti-Melan-A ont montré une diversité de répertoire plus étendue pour les PBMC que pour les TIL, ainsi que la présence de populations oligoclonales prédominante parmi les TILs (Cole et coll. 1997). En parallèle, dans une étude faite sur un seul patient, Mandruzzato et coll ont montré que le répertoire des cellules spécifiques différait entre les ganglions envahis et les PBMC, mais également entre les différents ganglions de ce même patient (Mandruzzato et coll. 2002). Concernant leur fonctionnalité, une étude de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A issus de différentes sources chez plus de 60 patients, a permis de montrer que les lymphocytes de forte avidité, qui sont préférentiellement sélectionnés in vivo, sont retrouvés dans le sang périphérique et capables de détruire efficacement la tumeur (Zippelius et coll. 2004).

Dans ce contexte, nous avons voulu comparer formellement les lymphocytes circulant dans le sang périphérique à ceux qui sont présents au niveau du site tumoral en termes de répertoire et de fonctionnalité. En effet, dans ces publications, les analyses de répertoire n'ont été effectuées que sur un nombre restreint d'individus et par ailleurs, pour leur majorité, les études fonctionnelles concernaient des clones anti-Melan-A. Ainsi, le premier travail auquel j'ai participé avait pour objectif d'évaluer la fonctionnalité de l'ensemble du répertoire de lymphocytes anti-tumoraux présents au niveau des différentes sources. Pour cela, nous avons mis au point et évalué l'efficacité d'une technique de tri immuno-magnétique de lymphocytes T CD8 spécifique de Melan-A. Une fois les populations pures obtenues, nous pouvions entreprendre les études fonctionnelles comparatives de cellules du sang périphérique vs celles présentes au sein des populations de TIL.

### **Effacité du tri immuno-magnétique**

Afin de trier les cellules spécifiques de Melan-A, nous avons utilisé une technique de tri immuno-magnétique basée sur l'interaction entre les TCR d'intérêt et des

monomères HLA-A\*0201-ELA biotinylés immobilisés sur les billes magnétiques Dynal M280-streptavidine. Pour ce travail, les cellules spécifiques de Melan-A ont été triées à partir de PBMC stimulés ou non par une lignée de mélanome allogénique en présence de peptide Melan-A<sub>26-35</sub> A27L (ELAGIGILTV), ou pour les TIL, directement après leur sortie du ganglion. Les cellules ont ensuite été amplifiées de manière poly-clonale par des cellules nourricières irradiées en présence d'IL-2. Nous montrons qu'un seul tri est suffisant pour obtenir une pureté supérieure à 90% pour les cellules issues de PBMC stimulées et de TIL pour 2 donneurs sur 3. Dans le cas de PBMC non stimulées, quel que soit le donneur, un second tri est nécessaire à l'obtention d'une pureté comparable. La pureté a été évaluée par marquage tétramère 14 jours après l'amplification poly-clonale (cf. Figure 14).

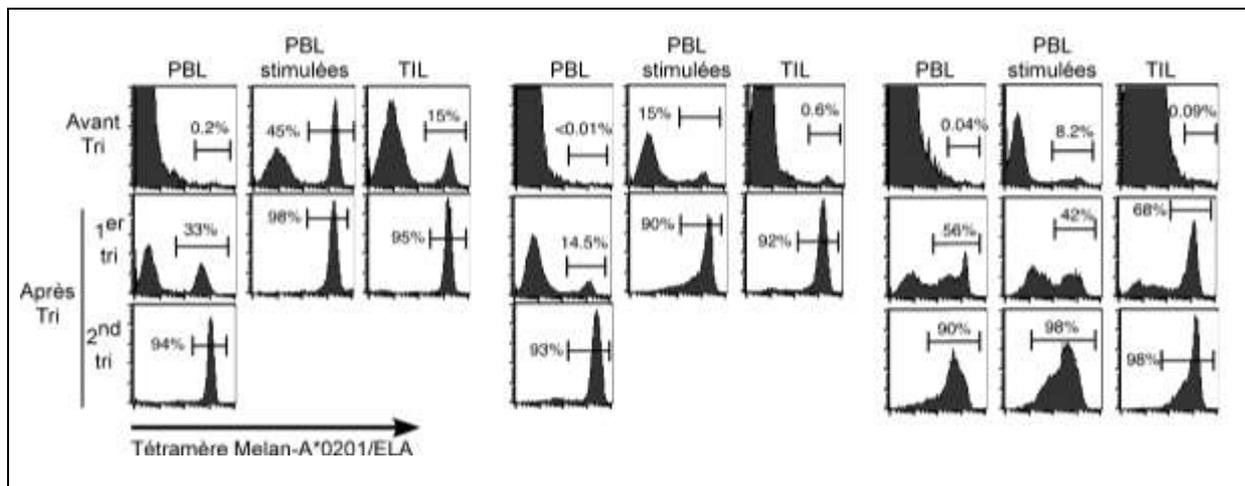
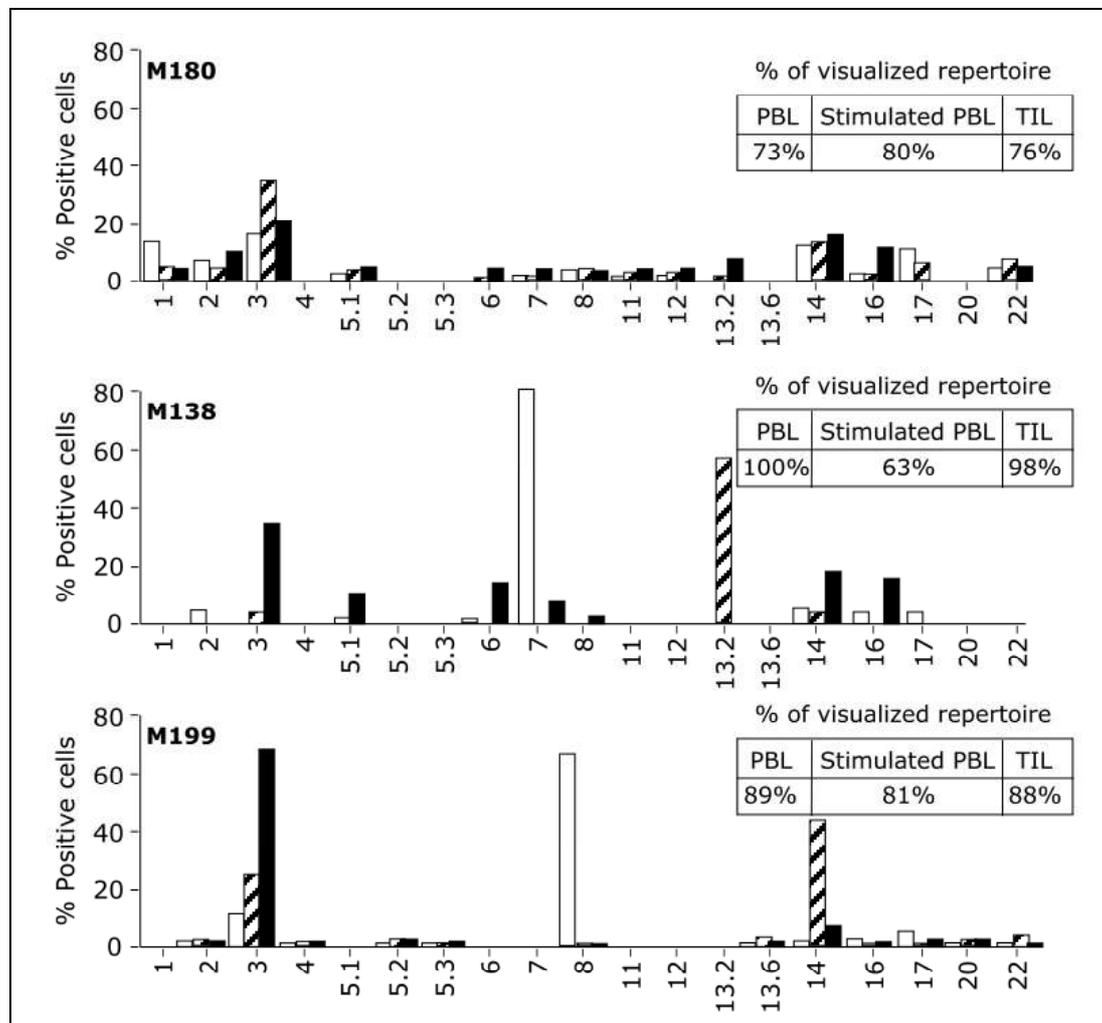


Figure 14 : Pureté des tris de cellules spécifiques issues de trois sources différentes PBMC, PBMC stimulé et TIL. La pureté a été évaluée par marquage tétramère.

### **Répertoire des populations triées**

Les populations triées ont une diversité de répertoire similaire quelle que soit la source considérée pour les patients M180 et M199. Pour le patient M138, le répertoire plus restreint retrouvé pour les PBMC stimulées peut s'expliquer par un pourcentage élevé (37%) de V $\beta$  non détecté avec le panel d'anticorps à notre disposition. Chez les patients M138 et M199, nous montrons la présence de populations oligoclonales variables d'un patient à l'autre et d'une source à l'autre. Chez le patient M138, le V $\beta$ 7 représente près de 80% du répertoire pour le tri issu des PBMC non stimulées; alors que plus de 50% des cellules triées à partir des PBMC stimulées expriment le V $\beta$ 13.2. Pour le

patient M199 : la majorité des cellules issues de TILs sont V $\beta$ 3 alors que celles issues de PBMC non stimulées sont V $\beta$ 8 et celles triées à partir de PBMC stimulées sont V $\beta$ 14 à 50% et V $\beta$ 3 à 25% (cf. *Figure 15*).



*Figure 15 : Analyse du répertoire des populations triées*  
 Populations triées à partir de PBMC non stimulées (blanc), PBMC stimulées (hachuré) ou de TILs (noir). Les tableaux indiquent le pourcentage de population caractérisée pour chaque tri.

Nous avons donc voulu savoir si ces différences de répertoire étaient à l'origine de variabilités fonctionnelles.

### **Etude fonctionnelle des cellules triées**

Afin de caractériser les cellules triées nous avons mesuré leur capacité lytique vis à vis de la lignée T2 chargée par le décapeptide naturel A26-35, le nonapeptide naturel

A27-35 et le décapeptide modifié A27L. Nous montrons que quel que soit le patient ou la population d'origine, les cellules triées présentent une plus forte avidité pour le décapeptide naturel et modifié que pour le nonapeptide naturel, ce qui n'est pas étonnant, étant donné qu'il s'agit du peptide que nous avons utilisé à la fois pour la stimulation et pour les tris.

Pour le patient M180, nous ne mettons en évidence aucune différence d'affinité quel que soit l'origine des cellules. Les lymphocytes triés à partir des TILs du patient M138 ont une meilleure avidité, alors que pour le patient M199 ce sont les cellules issues des PBL non stimulées qui présentent une EC50 plus élevée. Ainsi, dans notre modèle, l'avidité des populations des lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A ne semble pas dépendre de l'origine de leur source (cf. Figure 16).

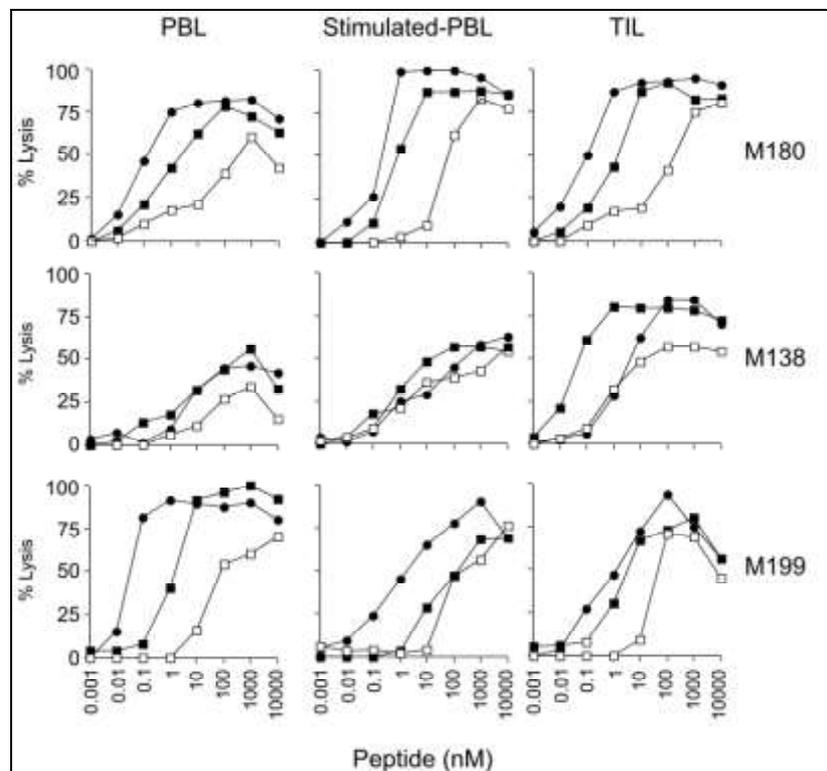


Figure 16 : Avidité des populations triées.

La lignée cellulaire T2 (TAP déficiente) a été chargée avec une gamme de concentrations de décapeptide naturel (carrés noirs), de nonapeptide naturel (carrés blancs) ou de décapeptide modifié A27L (cercles noirs). L'activité lytique a été évaluée au ratio effecteur : cible 10 :1, par la méthode de la libération du  $^{51}\text{Cr}$  pendant 4h.

Afin de documenter les différences d'avidité observées précédemment pour le patient M199, les populations V $\beta$ 8 et V $\beta$ 14, respectivement issues des tris PBMC non stimulées PBMC stimulées, ont été triées et leur avidité vis à vis des peptides a été

mesurée (cf. Figure 17).

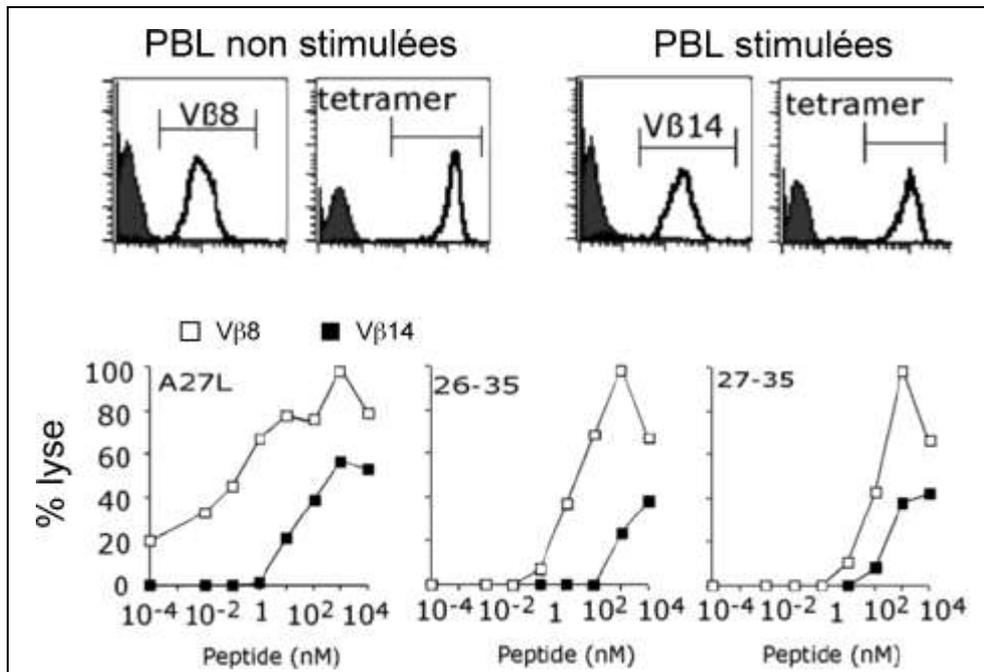


Figure 17 : Avidité des lymphocytes T  $V\beta 8$  et  $V\beta 14$  spécifiques de Melan-A

Analyse de l'avidité des lymphocytes T spécifiques de Melan-A  $V\beta 8$  et  $V\beta 14$  issus respectivement des tris de PBMC non stimulées et stimulées du patient M138. (A) analyse de la pureté des populations triées par marquage tétramère et  $V\beta$  correspondant. (B) Avidité des populations  $V\beta 8$  (carrés blancs) et  $V\beta 14$  (carrés noirs) vis à vis de la lignée cellulaire T2 (TAP déficiente) chargées avec une gamme de concentrations de décapeptide modifié A27L, de décapeptide naturel A26-35 ou de nonapeptide naturel A27-35. L'activité lytique a été évaluée au ratio effecteur : cible 10 :1, par la méthode du relargage du  $^{51}\text{Cr}$  pendant 4h.

Le tri  $V\beta 8$  présente une meilleure affinité que le tri  $V\beta 14$  vis-à-vis des 3 peptides testés. Ce qui est en accord avec les disparités d'avidité observées pour les populations non triées : le  $V\beta 8$ , majoritaire dans la population de lymphocytes spécifiques triés à partir de PBMC non stimulées, est à l'origine de la meilleure affinité de la population dont il est issu.

### **Conclusion et perspectives**

L'objectif de cette étude était de montrer que les lymphocytes du sang périphérique étaient une bonne source de lymphocytes anti-tumoraux. Nous voulions déterminer si les cellules spécifiques présentes dans le sang périphérique étaient d'une

part, accessibles à un tri immuno-magnétique, et d'autre part, si elles présentaient la même diversité et les mêmes caractéristiques fonctionnelles que celles qui sont présentes dans les ganglions lymphatiques métastatiques.

Dans la première partie de ce travail, nous montrons que notre procédé permet d'obtenir, à partir de populations parfois indétectables par marquage tétramère, plusieurs centaines de millions de cellules spécifiques. Si deux cycles de tri sont nécessaires pour obtenir une pureté supérieure à 90% à partir de PBMC non stimulées, la stimulation des PBMC par des lignées tumorales allogéniques nous a permis, dans 2 cas sur 3, d'obtenir des cellules pures après un seul tri. Dans une seconde partie, il nous semblait important de d'étudier la fonctionnalité des cellules spécifiques obtenues à partir de PBMC par rapport à celles présentes dans les TILs. L'analyse du répertoire a mis en évidence des variabilités intra et inter-individuelles, dépendantes du patient et de la source. En effet, pour le patient M180, la diversité du répertoire est similaire quel que soit l'origine des cellules, alors que pour les patients M138 et M199 nous observons la présence de V $\beta$  prédominants différents d'une source à l'autre chez un même patient. Ces différences de répertoire semblent être à l'origine des disparités fonctionnelles observées, puisque nous montrons que pour le patient M199, la forte réactivité de la population issue de PBMC non stimulées, est due à la présence majoritaire d'un V $\beta$  de forte avidité, le V $\beta$ 8, alors que dans la population issue de PBMC stimulées, la prédominance du V $\beta$ 14 pourrait expliquer la faible réactivité de la population totale. Certains auteurs ont montré que des stimulations antigéniques répétées pouvaient être à l'origine de la sélection de certains clonotypes (Alexander-Miller et coll. 1996; Zeh et coll. 1999). Dans notre étude, les variabilités de répertoire observées, entre PBMC stimulées et non stimulées, sont manifestes pour les patients M138 et M199. Pour ces deux patients, alors que les V $\beta$ 7 et V $\beta$ 8 sont indétectables dans la condition stimulée, les V $\beta$  13.2 et 14 ont disparu dans la condition non stimulée. Bien que nous ne mettions en évidence aucune corrélation entre avidité, réactivité et origine des cellules spécifiques ; il nous semble important d'envisager une diminution du nombre de stimulation peptidique, afin de nous affranchir d'un biais de répertoire inhérent à l'étape de stimulation et ainsi, de conserver une diversité optimale représentative de la population de départ.

Concernant la technique de tri en elle-même, de nombreuses équipes ont documenté une augmentation de la mortalité cellulaire due à l'interaction entre

multimères de classe I et lymphocytes T CD8 (Cebecauer et coll. 2005; Guillaume et coll. 2003). Cependant les mécanismes impliqués sont encore discutés (Bodinier 2001; Guillaume et coll. 2003), et aucune étude n'a montré la sensibilité accrue de certaines populations ni de corrélation avec l'avidité du TCR. Dans notre modèle, le faible nombre de cellules spécifiques à J0 ne permet pas d'analyser leur répertoire. Cependant nous n'avons pas mis en évidence de biais de répertoire qui pourrait être expliqué par une sélection dépendante de l'avidité du TCR pour le complexe CMH/peptide. En effet, les populations pures obtenues présentent de grandes disparités d'avidité (EC50 allant de 30nM à 0,05nM pour le peptide A27L), et de fait, ce paramètre ne semble pas conditionner la sélection des cellules.

Dans cette première partie nous montrons qu'il est possible de trier et d'amplifier efficacement les cellules spécifiques circulantes afin d'obtenir des populations pures capables de lyser efficacement leur cible. Cependant, en l'état, le transfert clinique de ce procédé n'était pas envisageable, car s'il était concevable d'obtenir des lots cliniques de billes magnétiques et de monomères biotinylés, la sécurisation de la streptavidine s'avérait être impossible en raison de son origine bactérienne, potentiellement immunogène. Ainsi il semblait donc nécessaire d'imaginer un autre moyen d'immobilisation des monomères sécurisés sur des billes de grade clinique.

## **Développement d'une technique de tri utilisable en clinique**

Dans la première partie de ce document, nous avons montré que les PBMC stimulées ex vivo par des cellules tumorales, irradiées et chargées en peptide, étaient une bonne source de cellules spécifiques de Melan-A. Nous avons également montré qu'il était possible de trier ces cellules spécifiques et d'obtenir une population pure qui, après amplification, était en nombre suffisant pour envisager le transfert de cette technique en médecine humaine. Cependant, la sécurisation de la streptavidine étant impossible, il nous fallait imaginer une autre technique afin d'immobiliser les monomères à la surface de billes. Au sein de l'équipe, nous disposions déjà d'un anticorps murin dirigé contre la séquence de biotinylation « Avitag® » développée par Avidity. Nous avons donc mis au point une méthode de tri immuno-magnétique de lymphocytes T CD8 utilisant des billes Dynal Epoxy recouvertes d'anticorps anti Avitag sur lesquelles nous pouvions immobiliser des monomères CMH-peptide portant la séquence de biotinylation Avitag (AvT) mais non biotinylés.

### **préparation des multimères HLA/peptide**

L'objectif initial de ce travail était de développer une technique de tri cellulaire basée sur l'utilisation de multimères HLA/peptide utilisables en clinique. Jusqu'à présent nous utilisons des billes magnétiques couplées à la streptavidine pour fixer les complexes HLA/peptide biotinylés. Or il n'existe pas de streptavidine de grade clinique. Nous avons décidé de la remplacer par un anticorps monoclonal dirigé contre la séquence de biotinylation développée par la société Avidity et nommée AviTag®.

### **Les protagonistes**

#### **i. Les monomères**

Les monomères HLA que nous utilisons jusqu'à présent contenaient la séquence de biotinylation classique (LHHILDAQKMVWNHR). Afin de pouvoir les utiliser dans notre système, nous avons remplacé cette séquence par la séquence AviTag® (GLNDIFEAQKIEWHE)®. Brièvement (cf. Figure 18):

- l'ADNc de la chaîne lourde du HLA-A\*0201 présent dans le plasmide pHN1 a été digéré par EcoRI et BamH1,
- l'ADNc de la séquence AviTag présent dans un plasmide pRmHA3 commercial

a été extrait par digestion EcoRI et BamH1,

- La chaîne lourde du HLA-A\*0201 a été insérée dans le plasmide pRmHA3 contenant la séquence AviTag.

- Un site de restriction HindIII a été introduit par PCR dans le plasmide pRmHA3 après la séquence AviTag

- Les plasmides pHN1 et pRmHA3-A2-AvT ont été digérés par EcoRI et HindIII.

- l'ADNc HLA-A\*0201-AvT a été inséré dans le plasmide pHN1

- Des bactéries XA90 ont été transfectées par le pHN1-contenant la séquence d'intérêt.

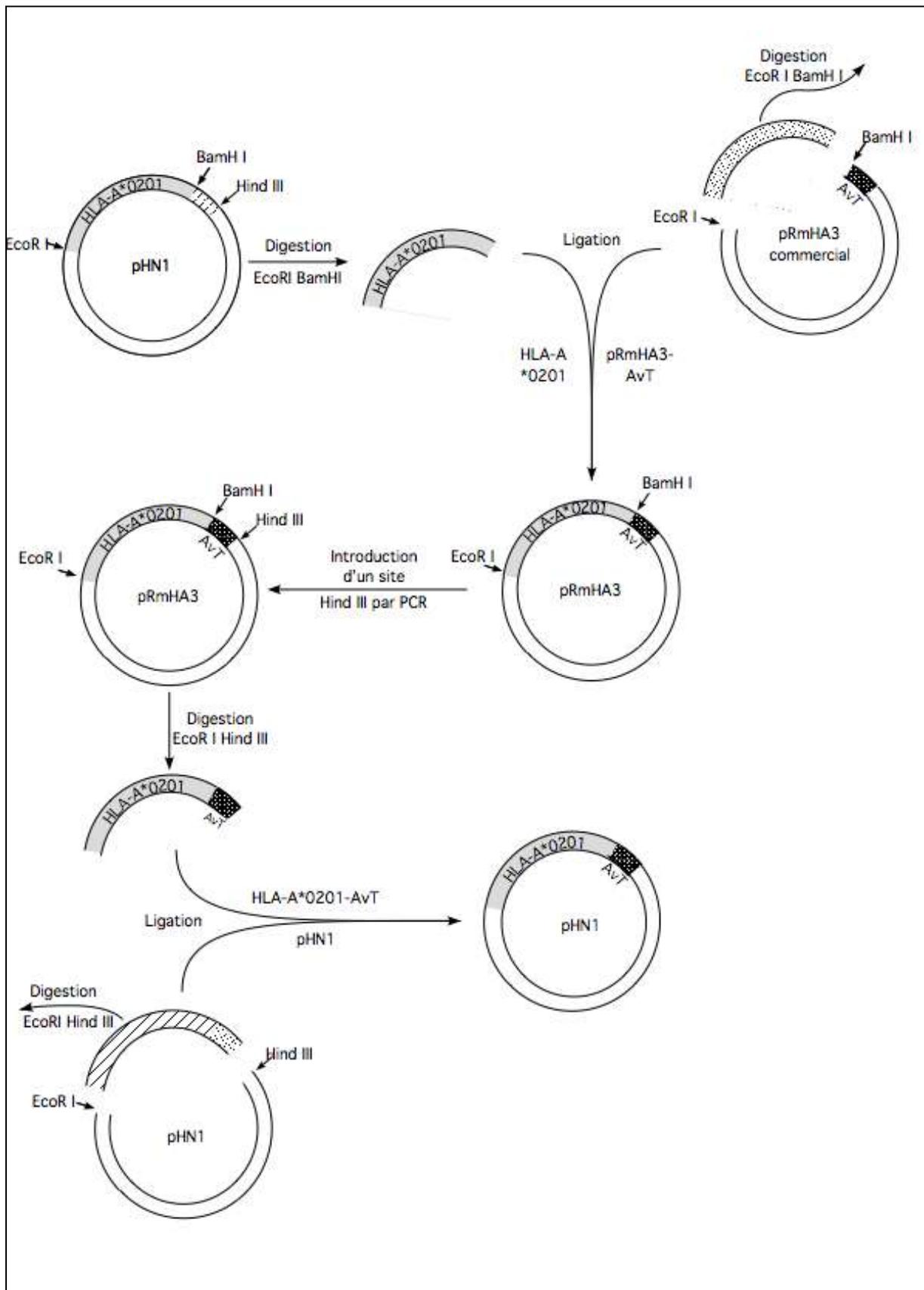


Figure 18 : Etapes de la construction du plasmide pHN1-HLA-A\*0201-AvT

## ii. L'anticorps

La technique d'immunisation développée nous a permis de générer des anticorps ayant la capacité de reconnaître la séquence AviTag® (MSGLNDIFEAQKIEWHE, Avidity). L'immunisation des souris a été faite avec le peptide couplé en amino-terminal à une protéine (KLH : Keyhole Limpet Hemocyanin). La reconnaissance des anticorps pour le peptide couplé en carboxy- et amino-terminal à l'ovalbumine a été testée. L'anticorps produit par l'hybridome 6A8 a été choisi pour sa capacité à reconnaître le peptide aussi bien en amino- qu'en carboxy-terminal mais également pour sa forte affinité vis-a-vis de la séquence AviTag®.

L'**affinité** de l'anticorps monoclonal pour les complexes HLA portant l'AviTag®, sur leurs chaînes lourdes, a été mesurée par résonance plasmonique de surface (BIAcore®) (Cf. matériel et méthode p.**Erreur ! Signet non défini.**). L'anticorps AvT-6A8 a été couplé de manière covalente à la matrice et la liaison aux complexes HLA/Melan-A a été analysée. Les résultats des sensorgrammes sont représentés sur la *Figure 19*. La valeur calculée de la constante de dissociation ( $K_d$ ) est de  $6,11 \times 10^{-9}$ , ce qui correspond à une bonne affinité de l'anticorps pour la séquence AviTag portée par le monomère HLA.

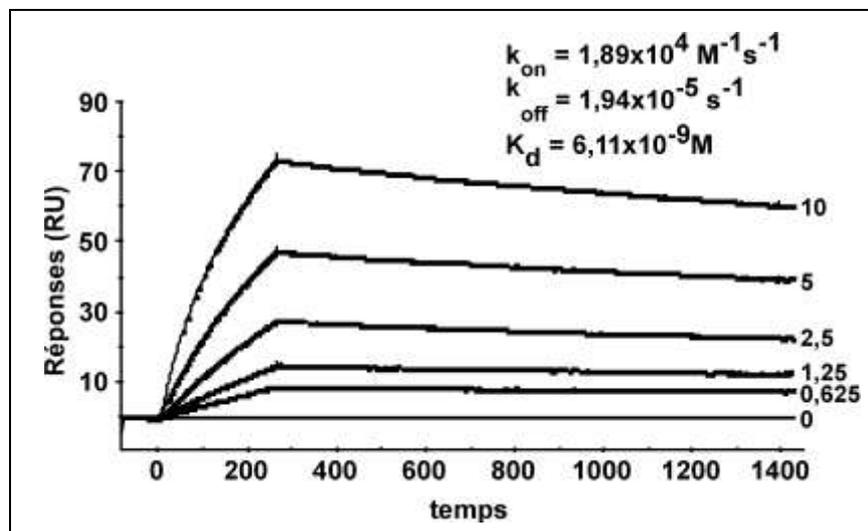


Figure 19 : Sensorgrammes

L'anticorps monoclonal Avt-6A8 dirigé contre le peptide AviTag a été couplé de façon covalente à la membrane de type CM5 du BIAcore. La liaison de l'AvT-6A8 aux monomères à différentes concentrations (de 0,625 à 10 µg/ml) a été testée à 25°C. Les constantes cinétiques ont été calculées sur la base de deux expériences indépendantes.

L'**alanine-scan** de la séquence AviTag nous a permis de déterminer les acides

aminés essentiels intervenants dans la reconnaissance de l'épitope. Cette technique permet de déterminer, entre autres, les zones d'interaction entre 2 protéines, en remplaçant tour à tour chaque acide aminé par une alanine. La Figure 20 montre que la substitution de la phénylalanine (acide aminé n°8) de la séquence AviTag, abroge totalement la reconnaissance de l'anticorps. L'épitope reconnu par l'anticorps 6A8 est donc situé au centre de la séquence AviTag, ce qui est en accord avec la capacité de l'anticorps à reconnaître la séquence aussi bien en amino- qu'en carboxy-terminal .

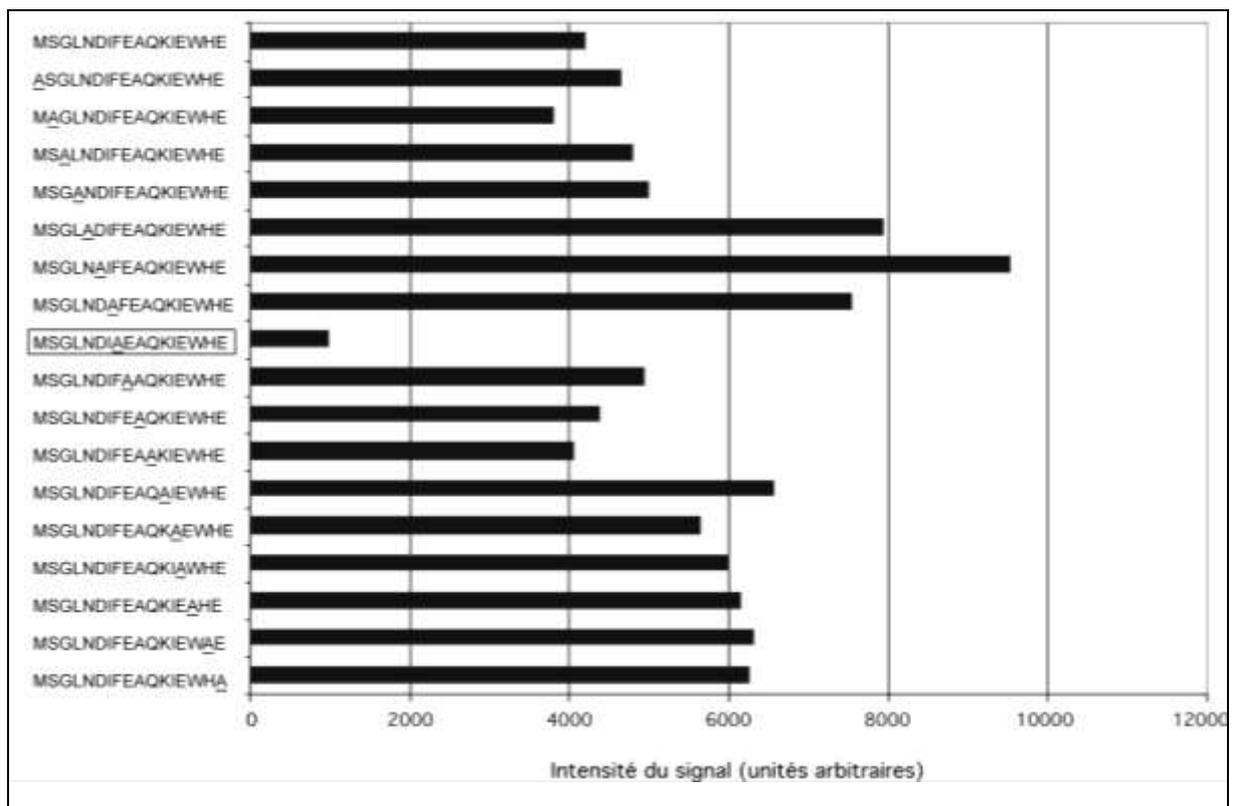


Figure 20 : Résultats de l'alanine-scan

### iii. Les billes

Afin de développer une technique utilisable en médecine humaine, il était nécessaire d'utiliser des billes dont des lots de grade clinique étaient disponibles. Nous avons choisi d'utiliser les billes M450-epoxy® de la société Dynal, leur surface époxy nous permettant de fixer de manière covalente l'anticorps par liaison amide.

#### Calibration des billes

Afin de déterminer avec précision la concentration saturante d'anticorps, nous

avons mis au point une technique de calibration à l'aide des recommandations du fabricant. Ainsi pour une quantité fixe de billes, nous avons évalué les paramètres suivants: la concentration d'anticorps saturante, la durée et la température d'incubation. Après incubation, les billes sont lavées, marquées par un fragment d'anticorps de chèvre F(ab')<sub>2</sub> anti-souris couplé à la phycoerythrine (PE) puis analysées en cytométrie de flux. La concentration saturante est définie comme la plus petite quantité d'anticorps permettant d'atteindre le plateau de fluorescence. Les résultats de ces calibrations nous ont conduit à retenir les conditions suivantes : 10µg d'anticorps 6A8 pour 10x10<sup>6</sup> billes M450, dans un volume de 25µl de tampon borate pH8,4, pendant une heure à température ambiante. (Cf Figure 21A).

Afin de déterminer avec précision la concentration saturante de HLA biotinylé et non biotinylé à utiliser sur les billes, nous avons effectué une seconde calibration des billes par cytométrie de flux. Une gamme de monomère de concentration décroissante est incubée avec une quantité fixe de billes M450-AvT pour le HLA non biotinylé et M280-streptavidine pour le HLA biotinylé. Ces billes sont ensuite marquées par un anticorps anti-HLA-ABC couplé au FITC et analysées en cytométrie de flux. La concentration saturante est définie comme la plus petite concentration de monomère permettant de rester au plateau de fluorescence (cf. Figure 26):

- Pour les billes M450-AvT, les moyennes de fluorescences maximales sont basses (MFI=30), elles sont obtenues avec des concentrations de 10µg/ml de complexe HLA/peptide non biotinylé (Figure 21B).
- Avec les billes M280-streptavidine, des concentrations de 2µg/ml de monomères biotinylés permettent d'atteindre le plateau de saturation (MFI maximale = 300), pour simplifier ces billes saturées en monomère seront nommées M280<sub>s</sub> (cf. Figure 21C).

La fixation de l'anticorps aux billes M450 étant élevée (MFI : 350), ces résultats nous indiquent que seule une petite fraction de l'anticorps AvT-6A8 est capable de fixer le monomère portant la séquence AviTag.

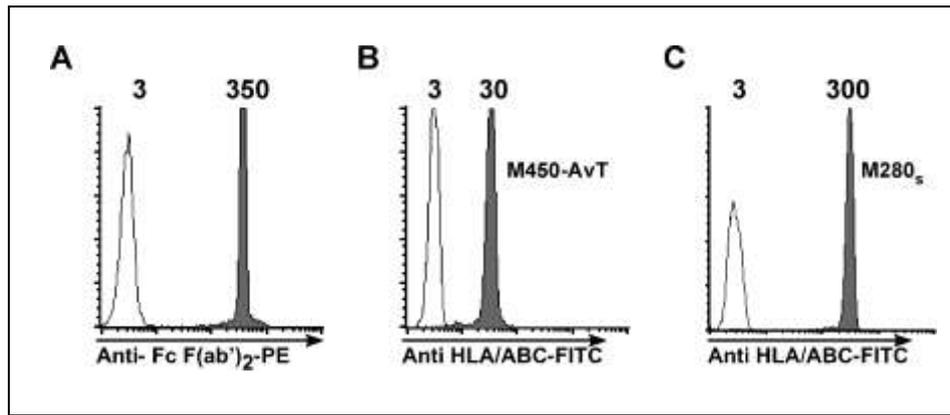


Figure 21 : Calibration des billes M450 et M280

**A** : l'anticorps monoclonal AvT-6A8 a été couplé de manière covalente aux billes M450-epoxy et la quantité d'anticorps fixé sur les billes a été évaluée par marquage avec un anticorps anti-souris couplé à la phycoerythrine (PE) (pic gris). **B** et **C** : Les monomères HLA-A\*0201/Melan-A-27L biotinylés ou non biotinylés ont été immobilisés respectivement sur les billes M450-AvT (**B**) ou M280-streptavidine (**C**). Les quantités de monomères fixées sur chaque type de billes ont été évaluées par marquage avec un anticorps anti-HLA-ABC couplé au FITC. Sur chaque histogramme, le pic blanc correspond au marquage des billes nues.

### Comparaison de l'efficacité des tris réalisés avec les billes M450-AvT ou M280<sub>s</sub>

Nous avons montré que la quantité de monomères fixés à la surface des billes M450-AvT est inférieure à celle des billes M280<sub>s</sub>, alors que les billes M450 sont plus grosses que les billes M280<sub>s</sub> (diamètres respectifs de 4,5µm et 2,8µm). Il semblait important de savoir si cette moindre densité pouvait avoir un impact sur l'efficacité des nouveaux multimères et sur les caractéristiques des cellules triées. Nous avons donc entrepris de comparer les tris effectués avec les deux types de billes.

#### Efficacité du tri

Tous les tris ont été effectués à partir de PBMC de patients atteints de mélanome. Les échantillons ont été obtenus après accord du Comité de Protection de la Personne de Nantes et information éclairée du patient ; un seul tri a été réalisé sur des TIL. Les PBMC ont été isolées à partir de 30ml de sang total. Nous avons optimisé les conditions de stimulation des lymphocytes T CD8+, d'une part pour nous affranchir de cellules tumorales irradiées comme cellules présentatrices d'antigène, d'autre part pour diminuer le nombre de stimulations et réduire le risque de sélectionner des clonotypes particuliers (cf. matériel et méthode) (Alexander-Miller et coll. 1996; Zeh et coll. 1999).

Après 14 jours de culture en présence de peptide, nous avons évalué le

pourcentage de cellules spécifiques par double CD8 et tétramère HLA-A\*0201/Melan-A. Les puits contenant des cellules spécifiques ont été mis en commun, puis marqués à nouveau par tétramère/CD8 afin de déterminer la proportion finale de cellules spécifiques à trier.

Le Tableau 4 résume les données concernant les tris. La Figure 22 montre les pourcentages de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A avant et après tris par les deux types de billes. Dans tous les cas, un seul tri, de 4 à 5 x 10<sup>6</sup> PBMC, effectué avec les billes M450-AvT a permis d'obtenir des populations de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A pures à plus de 95% après une re-stimulation de 14 jours (les facteurs d'enrichissement en cellules spécifiques varient de 422 à 4 563). Il semble apparaître, à la vue des pourcentages de cellules spécifiques présents dans les populations de départ (entre 0,24 et 44%), que les billes M450-AvT sont au moins aussi efficaces, si ce n'est plus, que les tris effectués avec les billes M280<sub>s</sub>.

	Melan-A								GP-100	NA17-A
	Pt 1 #1 (PBMC)		Pt 1 #2 (PBMC)		Pt 2 (PBMC)		Pt 3 (TIL)		Pt 5 (PBMC)	Pt 6 (PBMC)
<b>Population de départ</b>										
Nb de cellules (x10 <sup>6</sup> )	4		4		5		4		10	2.8
% LT CD8 spécifique <sup>a</sup>	2		44		0.24		6.8		0.23	0.1
Nb LT CD8 spécifiques <sup>b</sup>	8x10 <sup>4</sup>		1.76x10 <sup>6</sup>		1.2x10 <sup>3</sup>		2.72x10 <sup>5</sup>		2.3x10 <sup>4</sup>	2.8x10 <sup>3</sup>
<b>14 jours après tri/re-stimulation</b>										
Type de tri	M450-AvT	M280 <sub>s</sub>	M450-AvT	M280 <sub>s</sub>	M450-AvT	M280 <sub>s</sub>	M450-AvT	M280 <sub>s</sub>	M450-AvT	M450-AvT
Nb de cellules (x10 <sup>6</sup> )	380	210	751	1000	15.4	23.4	150	120	26	1.2
% LT CD8 spécifique <sup>a</sup>	96	88	99	96	95	89	96	94	90	95
Nb LT CD8 spécifiques <sup>b</sup>	3.65x10 <sup>8</sup>	1.85x10 <sup>8</sup>	7.43x10 <sup>8</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	1.42x10 <sup>7</sup>	1.78x10 <sup>7</sup>	1.44 x10 <sup>8</sup>	1.13x10 <sup>8</sup>	2.34x10 <sup>7</sup>	1.08 x10 <sup>6</sup>
Enrichissement <sup>c</sup>	4563	2313	422	625	1183	1483	529	415	1017	386

**Tableau 4 : Résultats des tris**

*Enrichissement et taux d'amplification des cellules spécifiques de Melan-A, GP100 et NA-17A obtenus après les tris multimères. <sup>a</sup> % de lymphocytes T spécifiques pour le complexe HLA\*A201/peptide déterminé par double marquage CD8/tétramère ; <sup>b</sup> nombre de cellules spécifiques est calculé à partir du pourcentage de cellules marquées par le tétramère multiplié par le nombre total de cellules ; <sup>c</sup> : Le facteur d'enrichissement est le ratio du nombre de cellules spécifiques avant et après un cycle de tri/re-stimulation.*

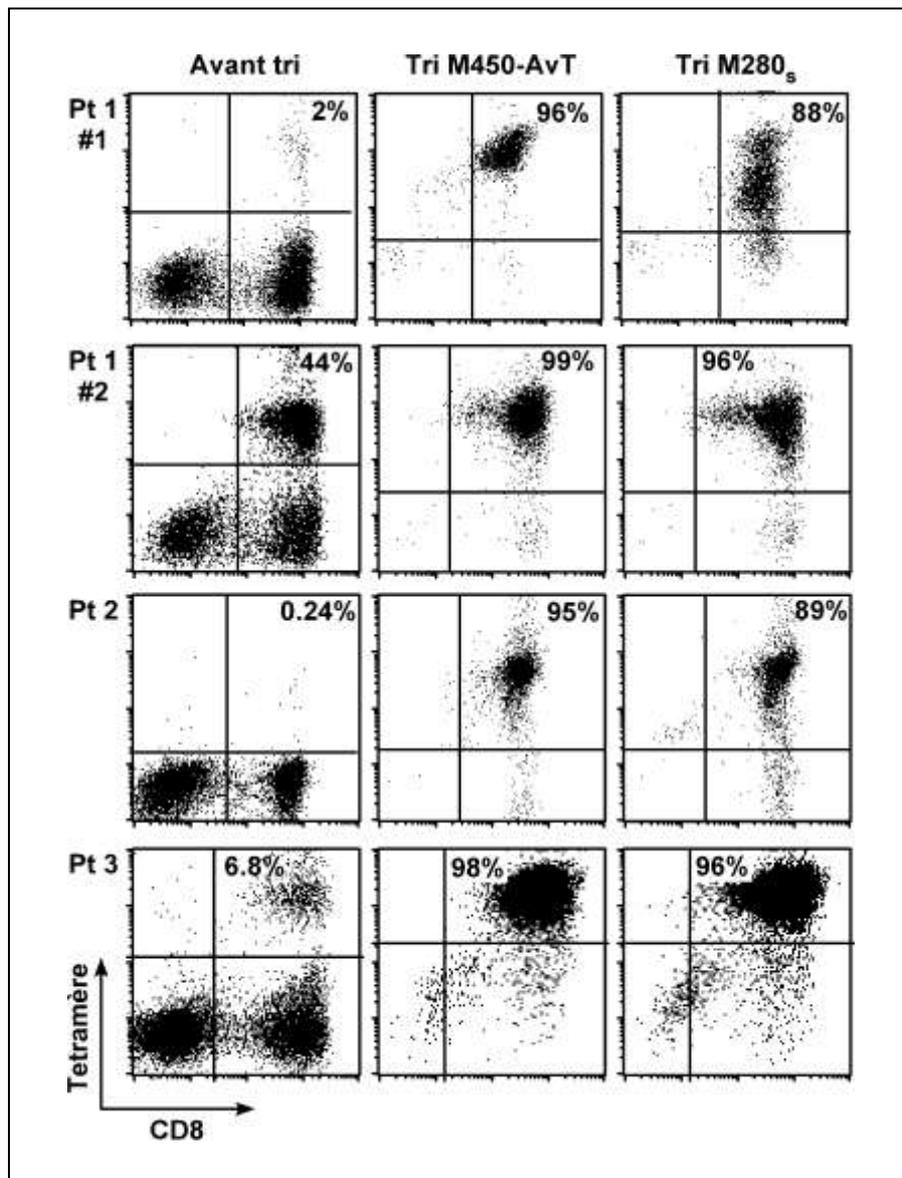


Figure 22 : Résultats des tris Melan-A

Résultats des tris de cellules spécifiques de Melan-A obtenus à partir de TIL ou après 14 jours de stimulation des PBMC avec le peptide Melan-A<sub>26-35</sub>A27L. Les cellules ont été triées avec les billes M450-AvT ou M280<sub>s</sub>, puis re-stimulées non spécifiquement pendant 14 jours. Les pourcentages de cellules spécifiques ont été obtenus par double marquage CD8/tétramère, ils sont indiqués dans le cadran correspondant.

#### Etude de répertoire

Nous avons ensuite voulu savoir si les multimères M450-AvT sélectionnaient le même répertoire de lymphocytes T CD8 anti-Melan A que les multimères M280<sub>s</sub>. Nous avons comparé les sous-familles de V $\beta$  présentes dans chacune des populations triées. Le panel d'anticorps utilisé nous a permis de détecter plus de 95% du répertoire pour chacun des trois patients (cf. Figure 23). Nous n'observons pas de différences significatives de V $\beta$  entre les deux populations triées. En effet, pour tous les patients, les

sous-familles majoritaires sont présentes dans les deux populations, avec parfois seulement quelques différences quantitatives observées pour quelques V $\beta$ . Concernant le patient #1, pour lequel deux puits différents ont été triés, nous notons que le degré de polyclonalité semble augmenter avec le pourcentage de cellules spécifiques présentes dans la population de départ. Ceci est vrai quel que soit le type de billes utilisées (#1 : 2% et 3 sous-familles, #2 : 44% et plus de 6 sous-familles).

Ainsi, bien que la densité de monomères HLA fixés sur les billes M450-AvT soit faible, le répertoire des cellules triées n'est pas plus restreint que celui des cellules triées avec les billes M280<sub>s</sub>.

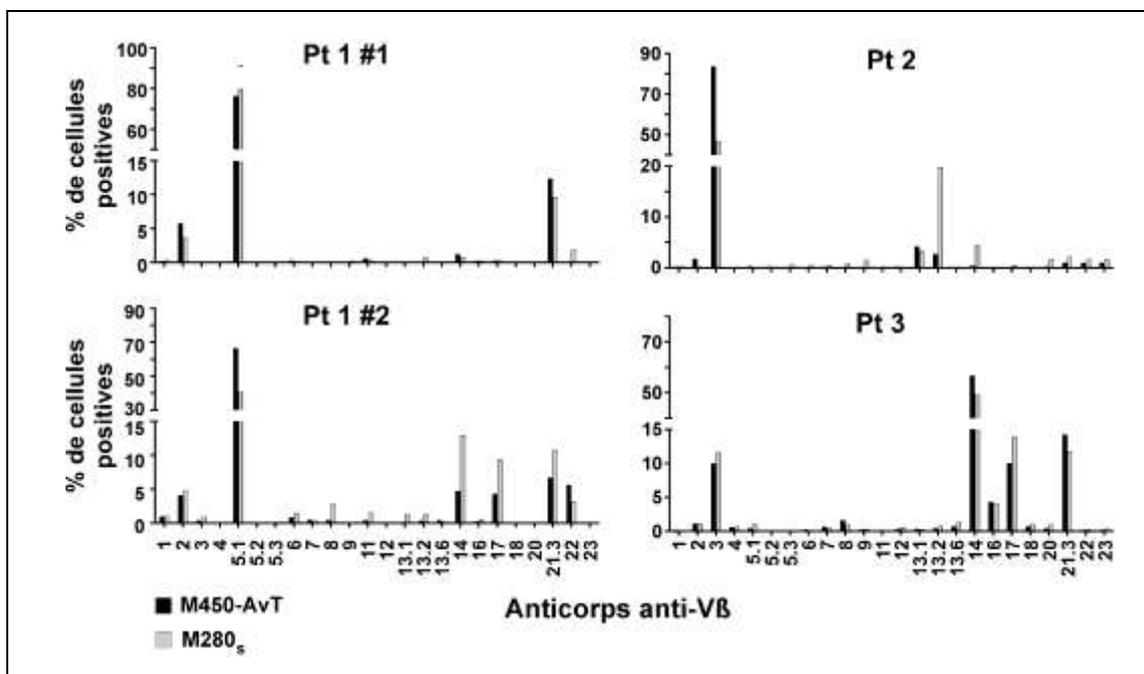


Figure 23 : Étude de répertoire des populations Melan-A triées  
Diversité du répertoire des lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A triés avec les billes M450-AvT (noir) ou M280<sub>s</sub> (gris). Les cellules ont été marquées par un panel de 24 anticorps anti-V $\beta$  puis analysées en cytométrie de flux.

#### Fonctionnalité des cellules triées avec les deux types de billes.

Nous avons ensuite comparé les lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A triés avec les billes M450-AvT et M280<sub>s</sub> en termes d'avidité, de cytotoxicité et de production de cytokines.

##### i. Cytotoxicité

L'avidité des cellules triées a été évaluée par un test de cytotoxicité vis-à-vis les cellules T2 chargées avec des concentrations croissantes de peptide Melan-A<sub>26-35</sub> A27L.

Les avidités obtenues sont illustrées dans la Figure 24A. Nous observons des variations significatives d'un patient à l'autre (EC50 allant de 0,007 à 400nM). En revanche, pour un patient donné, les populations sélectionnées par les deux types de billes sont très similaires. L'activité cytotoxique des populations triées vis-à-vis des lignées tumorales est identique pour les deux types de billes (cf Figure 24B : lignées M44 et M113 expriment le peptide Melan-A dans le contexte HLA-A\*0201; la lignée M6 exprime Melan-A dans un autre contexte). Ces résultats nous montrent que les lymphocytes sélectionnés par les deux types de billes sont capables de reconnaître le peptide naturel de Melan-A et qu'ils peuvent tuer efficacement les cellules tumorales.

## ii. Production de cytokines

Chez 2 patients, nous avons comparé la production de cytokines en réponse à des lignées de mélanomes ( cf. Figure 24C). Nous montrons que les lymphocytes triés par les deux types de billes produisent des taux comparables d'INF $\gamma$ , de TNF $\alpha$  et d'IL2.

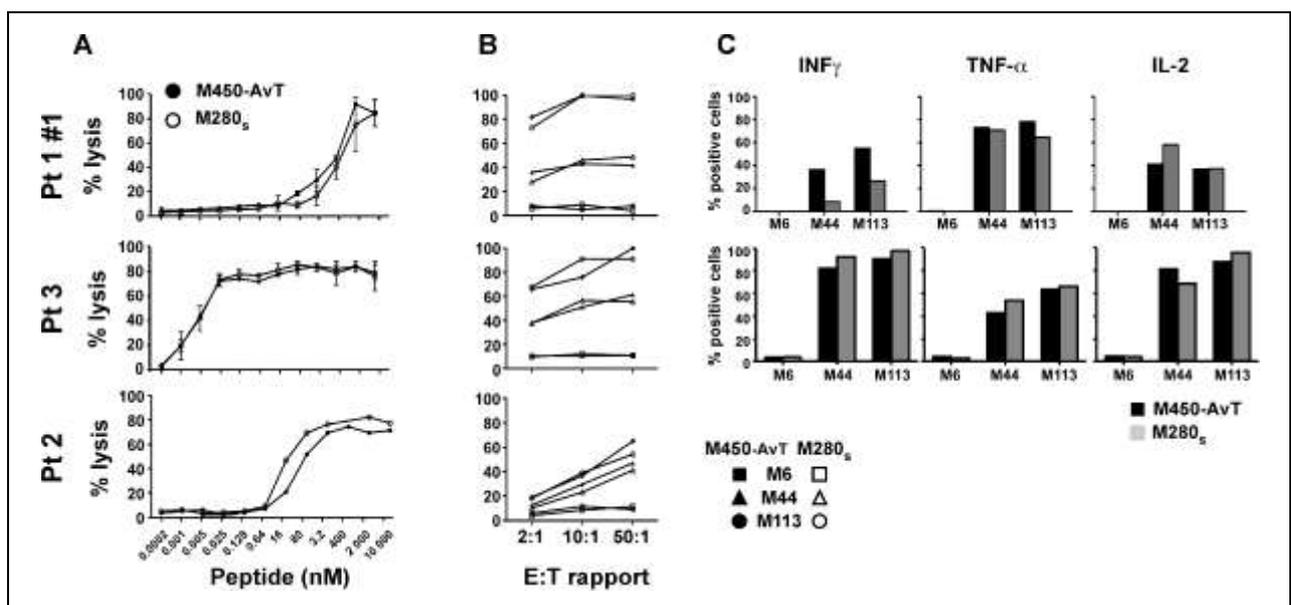


Figure 24 : Analyse fonctionnelle des tris Melan-A

Analyse fonctionnelle des lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A triés avec les billes M450-AvT. **A** : Avidité des populations triées par les billes M450-AvT (cercles noirs) ou M280<sub>s</sub> (cercles blancs). L'activité lytique est évaluée par mesure du <sup>51</sup>Cr libéré sur 4h lors de la lyse de la lignée T2, chargée avec des concentrations croissantes de peptide Melan-A<sub>26-35</sub> A27L, par les lymphocytes spécifiques. Le rapport effecteur:cible utilisé est de 10 :1 (n=2 sauf pour le patient 2). **B** : lyse de lignées de mélanome par les lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A triés avec les billes M450-AvT (noirs) ou M280<sub>s</sub> (blancs) évaluées par mesure du <sup>51</sup>Cr libéré sur 4h par les cellules tumorales à 3 rapports effecteur :cible différents (2 :1, 10 :1 et 50 :1). **C** : production de cytokine des lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A triés avec les billes M450-AvT (noirs) ou M280<sub>s</sub> (blancs) en réponse

à des lignées de mélanome. Les lymphocytes et les cellules tumorales sont co-incubés au rapport 1:2 pendant 6h à 37°C en présence de brefeldine A, puis marqués en intracellulaire avec un anticorps anti- *INF* $\gamma$ , *TNF* $\alpha$  et *IL2*. Le pourcentage de cellules positives pour chaque cytokine est déterminé par cytométrie de flux. Les lignées de mélanomes M44 et M113 expriment Melan-A dans le contexte HLA-A\*0201 alors que la lignée M6 exprime Melan-A mais n'exprime pas le HLA-A\*0201.

Ainsi, en ce qui concerne leurs fonctionnalités, les lymphocytes T spécifiques de Melan-A triés avec les billes M450-AvT ne diffèrent pas de ceux triés avec les billes M280<sub>s</sub>.

#### Utilisation des billes M450-AvT pour trier d'autres spécificités

Il est actuellement bien établi que le répertoire des lymphocytes T dirigés contre l'épitope Melan-A<sub>26-35</sub>, dans le contexte A2, est bien représenté hors du site tumoral des patients atteints de mélanome. De fait il est facile de les sélectionner et de les amplifier à partir de TIL ou de PBMC (Labarrière et coll. 2008; Gervois et coll. 2000; Cole et coll. 1997; Mackensen et coll. 2006). En revanche, pour d'autres antigènes de mélanome comme gp100 ou NA17-A, les lymphocytes T spécifiques sont souvent très peu abondants. Nous avons montré qu'il était nécessaire de réaliser plusieurs stimulations successives des PBMC pour amplifier ces rares lymphocytes spécifiques (Yang et coll. 2002; Labarrière et coll. 2002). Nous avons voulu savoir si notre méthode, basée sur une stimulation unique de PBMC suivie d'un tri, était applicable pour des épitopes de gp100 et NA17-A.

La fixation des monomères HLA-A\*0201/gp100 et HLA-A\*0201/NA17-A aux billes M450-AvT a été effectuée de la même manière que pour HLA-A\*0201/Melan-A. Le couplage des monomères, évalué par cytométrie de flux, a été identique à celui obtenu pour Melan-A (données non présentées).

La Figure 25A représente deux tris de PBMC avec les billes M450-AvT couplées au monomère HLA-A\*0201/gp100<sub>280-288</sub> (colonne de droite) ou HLA-A\*0201/NA17-A (colonne de gauche). Les deux dernières colonnes du Tableau 4 indiquent les taux d'amplification et les facteurs d'enrichissement obtenus.

#### iii. Tri gp100

À l'issue de 15 jours de stimulation non spécifique, le tri gp100 est pur à 90% (la faible fraction CD8-/tétramère correspondant à des cellules nourricières qui disparaissent au cours de la culture). L'analyse du répertoire révèle la présence d'une seule sous-famille de V $\beta$ : le V $\beta$ 14. Il est probable qu'il s'agisse d'une population

monoclonale. L'EC50, proche de 0,1nM, indique que les cellules triées ont une bonne avidité vis-à-vis de la lignée T2 chargée en peptide gp100. Les cellules sont capables de lyser les lignées tumorales exprimant gp100 dans le contexte HLA-A\*0201 (M113 et M88) mais pas dans un autre contexte (M6). Les cellules sont également capables de sécréter de l'INF $\gamma$ , du TNF $\alpha$  et de l'IL2 en réponse aux lignées tumorales M113 et M88, mais pas M6 (cf. Figure 25).

#### iv. Tri NA17-A

Des résultats comparables sont obtenus avec les cellules spécifiques de NA17-A triées par les billes M450-AvT. Bien que les cellules spécifiques soient très peu fréquentes après la stimulation peptide (0,1%), la population triée est pure à plus de 95% après un seul cycle de tri/amplification. Cette population est composée majoritairement de cellules exprimant le V $\beta$ 13.1. Mais nous trouvons également les sous-familles V $\beta$ 21.3 et V $\beta$ 23. Bien que l'avidité soit relativement faible (EC50 $\approx$ 100nM), les cellules sont capables de lyser efficacement les lignées tumorales exprimant NA17-A dans le contexte HLA-A\*0201 (DAGI et M6) mais pas celles qui n'expriment pas l'antigène (M113). En réponse aux cellules tumorales, alors qu'une fraction importante des cellules produit de l'INF $\gamma$ , seule une faible partie est capable de produire de l'IL2, probablement en raison de la faible avidité de la population (cf. Figure 25).

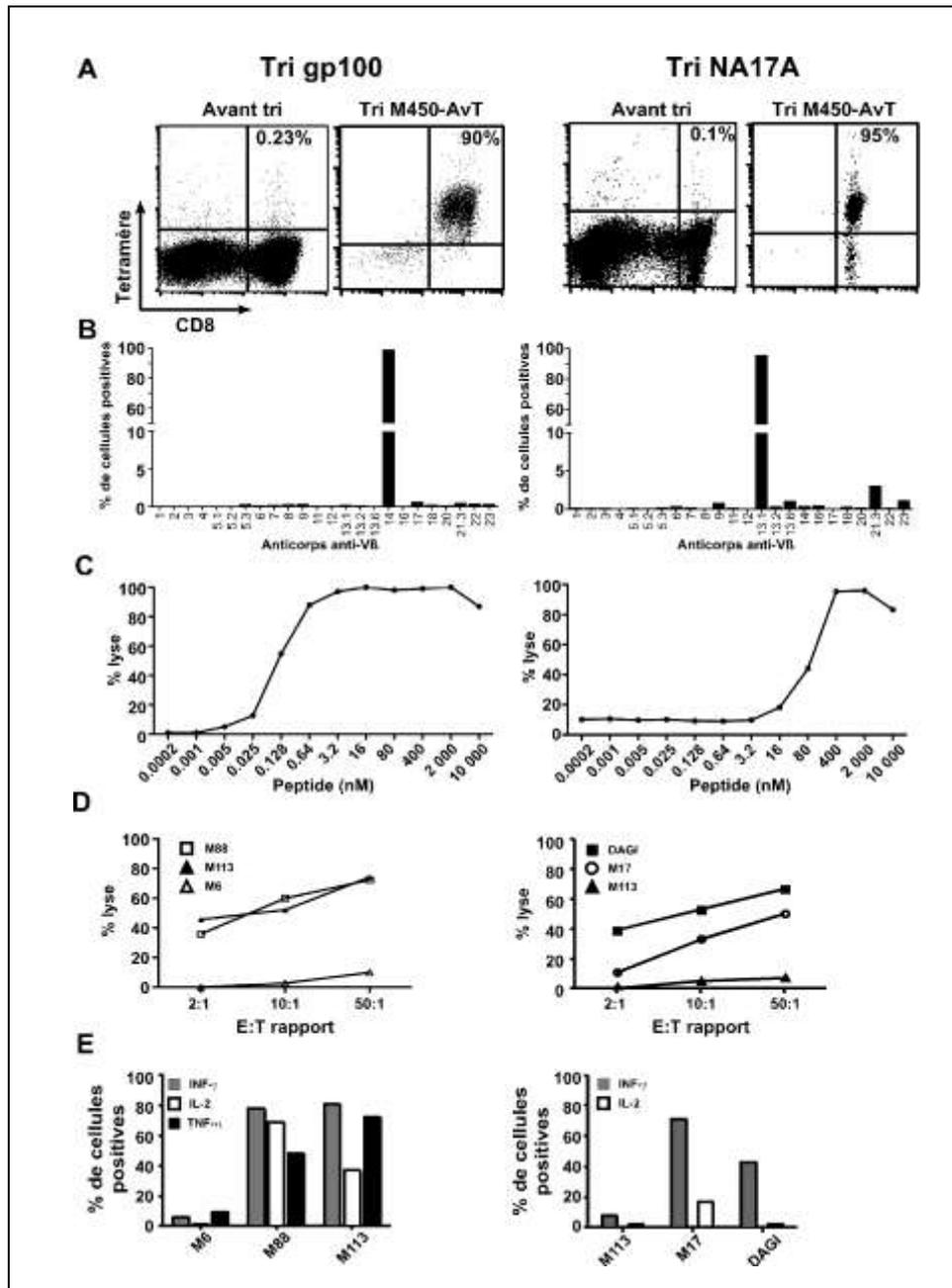


Figure 25 : Tris NA17-A et gp100

Tris des lymphocytes T CD8 spécifiques de gp100 et NA17-A avec les billes M450-AvT. **A** : Les PBMC de patients atteints de mélanome ont été stimulées par le peptide correspondant. La fréquence des cellules spécifiques après 14 jours de stimulation et la pureté des populations spécifiques triées puis amplifiées ont été évaluées par double marquage CD8-FITC/tétramère-PE. **B** : diversité du répertoire des lymphocytes T CD8 spécifiques de gp100 ou NA17-A triés avec les billes M450-AvT. Les cellules ont été marquées par un panel de 24 anticorps anti-V $\beta$  puis analysées en cytométrie de flux. **C** : Avidité des populations triées par les billes M450-AvT. L'activité lytique est évaluée par mesure du  $^{51}\text{Cr}$  libéré sur 4h lors de la lyse de la lignée T2 chargée avec des concentrations croissantes de peptide gp100 ou NA17-A, par les lymphocytes spécifiques au rapport effecteur:cible 10 :1. **D** : lyse de lignées de mélanome par les lymphocytes T CD8 spécifiques de gp100 et NA17-A triés avec les billes M450-AvT évaluées par mesure du  $^{51}\text{Cr}$  libéré sur 4h par les cellules tumorales à 3

*rapports effecteur :cible différents (2 :1, 10 :1 et 50 :1). E : production de cytokine des lymphocytes T CD8 spécifiques de gp100 ou NA17-A triés avec les billes M450-AVT en réponse à des lignées de mélanomes. Les lymphocytes et les cellules tumorales sont co-incubés au rapport 1 :2 pendant 6h à 37°C en présence de bréfeldine A, puis marqués en intra-cellulaire avec un anticorps anti INF $\gamma$ , TNF $\alpha$  et IL2. Le pourcentage de cellules positives pour chaque cytokine est déterminé par cytométrie de flux. Les lignées de mélanomes M88 et M113 expriment gp100 dans le contexte HLA-A\*0201, les lignées DAGI, M17 expriment NA17-A dans le contexte HLA-A\*0201, la lignée M6 exprime gp100 mais n'exprime pas le HLA-A\*0201 et la lignée M113 n'exprime pas NA17-A.*

### **Etude de l'apoptose induite par les multimères M450-AvT vs M280.**

#### **Mise en évidence**

Des publications précédentes ont rapporté que l'interaction de tétramères HLA/peptides avec le TCR induisait un fort niveau d'activation induisant la mort cellulaire ou AICD (Guillaume et coll. 2003; Cebecauer et coll. 2005). Nous avons voulu savoir si les multimères construits avec les billes M450-AvT induisaient des niveaux d'apoptose différents de ceux construits avec les billes M280. Dans un premier temps, nous avons voulu savoir quelle était l'influence de la quantité de complexe HLA/peptide à la surface des billes. Nous avons donc choisi de faire tester 3 quantités différentes à la surface des billes M280 (cf. Figure 26) :

- M280<sub>s</sub> qui sont saturées en complexe HLA/peptide (2 $\mu$ g/ml, MFI : 300)
- M280<sub>us1</sub> qui sont produites en incubant les billes avec 0,3 $\mu$ g/ml de monomère, afin d'obtenir une moyenne de fluorescence, et donc une quantité, identique aux billes M450-AvT (MFI=30).
- M280<sub>us2</sub>, produite en incubant les billes avec 0,0075 $\mu$ g/ml de monomères, afin d'obtenir une moyenne de fluorescence 2,5 fois inférieure aux billes M280<sub>us1</sub> (MFI=12). Les billes M450 étant 2,5 fois plus grosses que les billes M280, la densité des billes M280<sub>us2</sub>, peut être considéré comme équivalente à celle des billes M450-AvT.

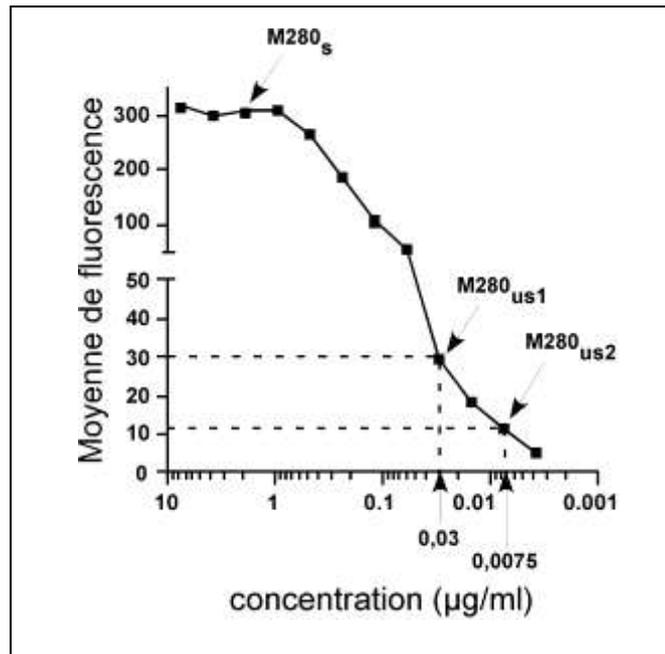


Figure 26 : Calibration des billes M280

Courbe de calibration des billes M280 streptavidine avec le monomère HLA\*A201/MelanA biotinylé. Les flèches indiquent les concentrations de monomère permettant l'obtention des billes M280<sub>us1</sub> et M280<sub>us2</sub>.

Nous avons testé l'effet de ces 4 types de billes, un contrôle sans billes et un contrôle avec un monomère non pertinent (NA17-A) sur des clones de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A (cf. Figure 27). Un nombre égal de cellules et de billes a été incubé à 37°C durant 6h avant d'être marqué par de l'annexine-V-FITC et de l'iodure de propidium. Les cellules vivantes ne sont marquées par aucun de ces réactifs. En effet, L'annexine-V met en évidence un signe précoce de l'apoptose : le passage du feuillet interne vers le feuillet externe des phosphatidylsérines membranaires. L'iodure de propidium nécessite la perméabilisation de la membrane plasmique pour pénétrer dans la cellule et s'intercaler entre les deux brins de l'ADN, il émet alors une fluorescence naturelle, c'est un marqueur tardif de l'apoptose. La Figure 27A montre un exemple représentatif de l'apoptose induite par les billes. Les billes M280<sub>s</sub> sont responsables de l'apoptose de 77% des cellules, alors que seuls 3% des cellules sont mortes avec les multimères non pertinents NA17-A. En revanche, les billes M450-AvT n'induisent que très peu d'apoptose (16%) en comparaison aux billes présentant la même quantité de monomères (M280<sub>us1</sub> : 69% d'apoptose) ou la même densité de monomère (M280<sub>us2</sub> : 46% de cellules mortes). La Figure 27B résume les résultats obtenus sur un panel de clones spécifiques de Melan-A. Le pourcentage moyen d'apoptose induit dans les

différentes conditions à été évalué par le marquage Annexin-V. Pour les billes M450-AvT, le pourcentage de cellules en apoptose est significativement inférieur à celui induit par les billes M280<sub>s</sub> ( $16,8 \pm 1,9\%$  vs  $63,7 \pm 7\%$ ,  $n=8$ ,  $p<0,01$ ), ainsi que par les billes M280<sub>us1</sub> ( $49,9 \pm 6,6\%$ ,  $n=6$ ,  $p<0,05$ ), mais il ne diffère pas du témoin sans billes ou avec les billes non pertinentes (respectivement  $5,3 \pm 1,7\%$  et  $2,9 \pm 0,3\%$ ,  $n=6$ ,  $p>0,05$ ). Comme nous l'attendions, les billes M280<sub>us2</sub> induisent moins d'apoptose que les billes M280<sub>us1</sub> ( $26,9 \pm 5,7\%$ ,  $n=6$  vs  $49,9 \pm 6,6\%$ ,  $n=8$ ,  $p<0,05$ ), mais plus que celle induite par les billes M450-AvT, bien que la différence n'atteigne pas le seuil de significativité.

Étant donné que l'apoptose induite par les billes couplées au monomère non pertinent ne diffère pas de celle observée dans les puits sans billes, cette dernière condition sera, par la suite, utilisée comme témoin négatif.

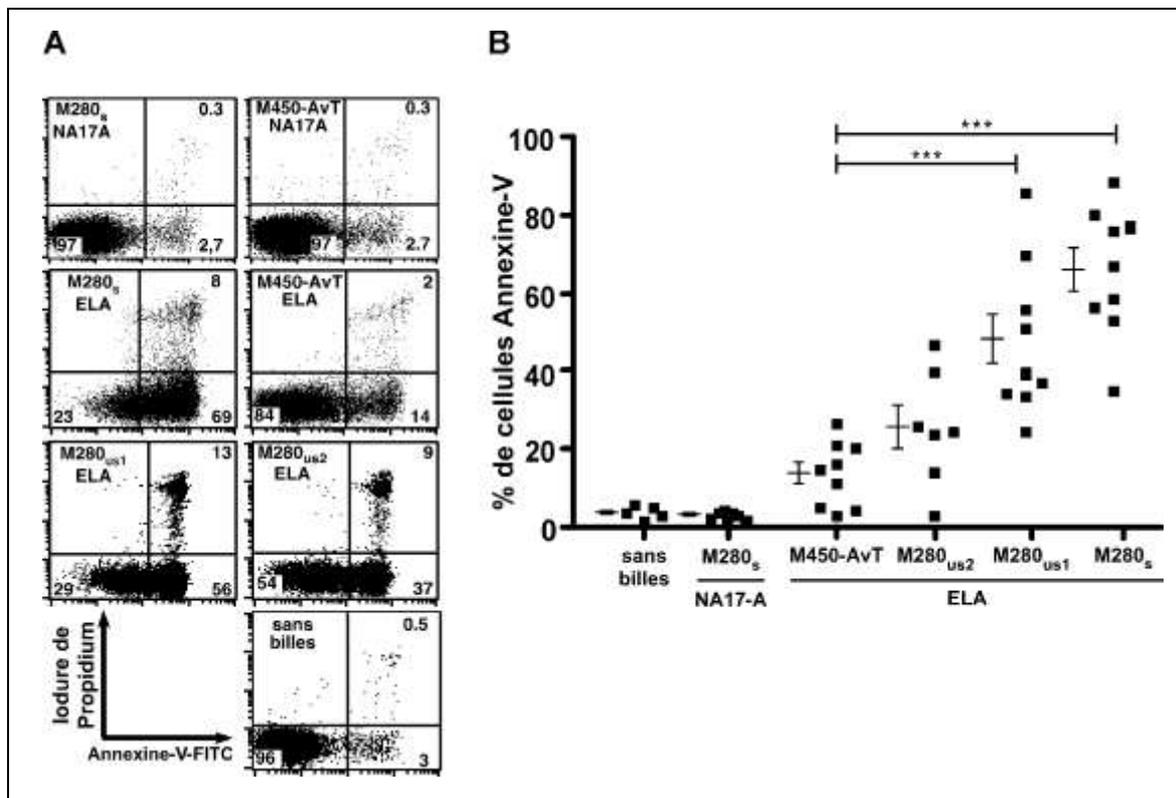


Figure 27 : Apoptose induite par les billes

**A** : Exemple représentatif de l'apoptose observée sur des clones spécifiques de Melan-A après 6h d'incubation sans billes ou au rapport 1:1 avec les billes M450-AvT, M280<sub>s</sub>, M280<sub>us1</sub>, M280<sub>us2</sub> couplées au monomère Melan-A ou NA17-A. L'apoptose est évaluée par double marquage Annexine-V-FITC/Iodure de Propidium. **B** : Bilan des marquages Annexine-V obtenus dans les différentes conditions. Test Anova suivi d'un post test de Bonferroni □□□ :  $p<0,001$ , □ :  $p<0,05$ .

### Activation de la voie des caspases

Nous avons ensuite voulu savoir si cette apoptose passait par la voie des caspases. Nous avons donc analysé l'activation de cette voie par les différents multimères, sur des clones ou des lignées polyclonales spécifiques de Melan-A. La Figure 28 montre que les billes M280<sub>s</sub> sont responsables d'une forte augmentation des taux de caspase 3/7 et 9 activées à la fois pour les clones et pour les lignées. Bien que les billes M280<sub>us1</sub> soient responsables d'une moindre induction de l'activité des caspases, elle reste supérieure à celle induite par les billes M450-AvT. Les billes M450-AvT n'induisent que très peu d'activation des caspases par rapport au contrôle.

Ces résultats confirment que les multimères M450-AvT n'induisent que faiblement l'activation des phénomènes d'apoptose en comparaison au multimères M280<sub>s</sub>, et ce, même lorsque les quantités de monomères sont comparable (M280<sub>us1</sub>).

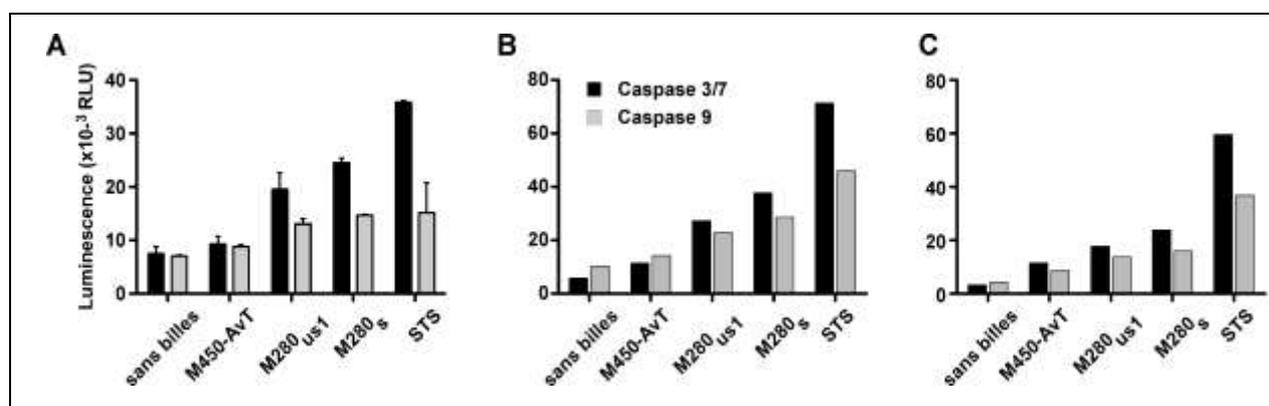


Figure 28 : Mesure de l'activité des caspases

Activation de la voie des caspases 3/7 et 9 après 4h d'incubation à 37°C de clones de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A (A, n=3), ou de lignées de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A (B et C). Les cellules ont été incubées au rapport 1:1 avec les billes M450-AvT, M280<sub>s</sub>, M280<sub>us1</sub>, M280<sub>us2</sub> une condition sans bille a été utilisée comme témoin négatif et la staurosporine (STS) a été utilisée comme témoin positif. Après incubation, les cellules sont lysées et les taux de caspases 3/7 et 9 actives sont évalués par mesure de la luminescence (Caspase-Glo, cf matériel et méthode) à l'aide d'un compteur betaplate.

### Activation de la production de cytokines par les différents multimères

Après avoir montré que les multimères M450-AvT n'induisaient qu'un faible taux d'apoptose, nous avons voulu savoir si ce phénomène se limitait à l'AICD ou s'il pouvait être étendu à d'autres processus induits suite à l'interaction du TCR avec le CMH/peptide. Nous avons donc testé la production de TNF $\alpha$  et d'INF $\gamma$  suite à une incubation avec les 3 types de billes : M450-AvT, M280<sub>s</sub> et M280<sub>us1</sub>. La Figure 29A

montre un exemple représentatif de sécrétion cytokinique induite par les différentes billes. Les multimères M280<sub>s</sub> induisent respectivement la production de TNF $\alpha$  et d'INF $\gamma$  par 97% et 52% des cellules, alors que les billes M450-AvT n'induisent que 17% des cellules à produire du TNF $\alpha$  et 6% de l'INF $\gamma$ . Nous montrons également que la quantité de monomère fixé à la surface des billes ne peut expliquer à elle seule les différences de sécrétion puisque 81% des cellules stimulées par les billes M280<sub>us1</sub> secrètent du TNF $\alpha$  et 33% de l'INF $\gamma$ .

Les Figure 29B et C résument les résultats obtenus sur 3 lignées de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A. Les billes M450-AvT induisent significativement moins la sécrétion de TNF $\alpha$  ou d'INF $\gamma$  que les billes M280<sub>s</sub> (respectivement 26,3%  $\pm$  6,8 vs. 76,7%  $\pm$  7,6 pour le TNF $\alpha$ ,  $p < 0,001$  ; et 13,3%  $\pm$  5,4 vs. 54,8%  $\pm$  4,3 pour l'INF $\gamma$ ,  $p < 0,001$ ) ou que les billes M280<sub>us1</sub> (66,7%  $\pm$  4,1 pour le TNF $\alpha$ ,  $p < 0,001$  ; et 39,8%  $\pm$  4,8 pour l'INF $\gamma$ ,  $p < 0,01$ ). Par rapport au contrôle sans billes, les multimères M450-AvT n'induisent qu'une légère augmentation, non significative de sécrétion de TNF $\alpha$  (26,2%  $\pm$  6,8 vs. 2%  $\pm$  1,4) et d'INF $\gamma$  (13,3%  $\pm$  5,4 vs. 0,9%  $\pm$  0,8).

Ainsi bien que l'induction de la production de cytokine par les billes M450-Avt ne soit pas totalement nulle, elle reste tout de même significativement minimale par rapport à celle induite par les billes M280 saturées ou non.

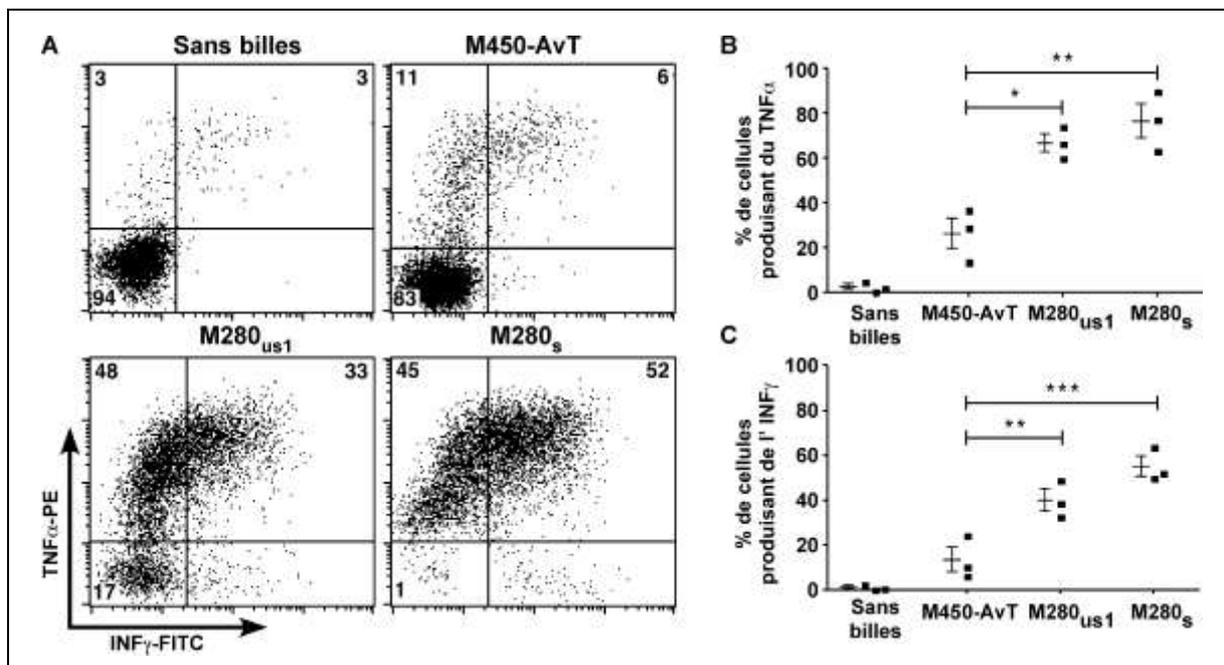


Figure 29 : Mesure de la sécrétion de cytokines

Activation des lignées spécifiques de Melan-A par les billes M450-AvT, M280<sub>s</sub> ou M280<sub>us1</sub>. La sécrétion de TNF $\alpha$  et d'INF $\gamma$  a été évaluée par marquage intracellulaire après 6h

d'incubation, en présence de bréfeldine A, avec les billes au rapport 1 : 1. A : exemple représentatif de double marquage, les pourcentages de cellules positives sont indiqués dans le quadrant correspondant. B et C : bilan des 3 lignées testées, en pourcentage de cellules sécrétant du TNF $\alpha$  (B) et de l'INF $\gamma$  (C). Test Anova suivi d'un post-test de Bonferroni ; □□ :  $p < 0,01$ , □ :  $p < 0,05$

### **Analyse de l'avidité de sous-familles V $\beta$ triées par les différents multimères**

Certains travaux ont montré que les monomères mutés au niveau de leur chaîne  $\alpha 3$ , afin de diminuer leur dépendance au récepteur CD8, interagissaient préférentiellement avec les TCR de haute affinité (Daniels et coll. 2000; Pittet et coll. 2003). En parallèle, d'autres équipes ont montré que des doses excessives d'antigène induisaient l'apoptose des CD8 proportionnellement à leur avidité (Derby et coll. 2001). Les monomères que nous avons utilisés présentent également une mutation qui diminue l'interaction entre le CMH et CD8 (mutation V245 (Bodinier et coll. 2000)), néanmoins, les populations que nous obtenons présentent des avidités très variées, allant de 1 $\mu$ M à 7pM.

Si, pour un même patient, quelle que soit la technique de tri utilisée, les avidités sont généralement du même ordre de grandeur et le répertoire globalement aussi diversifié, quelques différences en termes de fréquences sont à noter. Nous avons voulu savoir si ces variations pouvaient être liées à une différence de sensibilité vis-à-vis de mécanismes induisant la mort cellulaire. Nous avons choisi d'étudier les tris obtenus à partir des patients n°1#2 et n°3, populations présentant des variations de fréquences de V $\beta$  non négligeables entre les deux conditions de tri (cf. Figure 30).

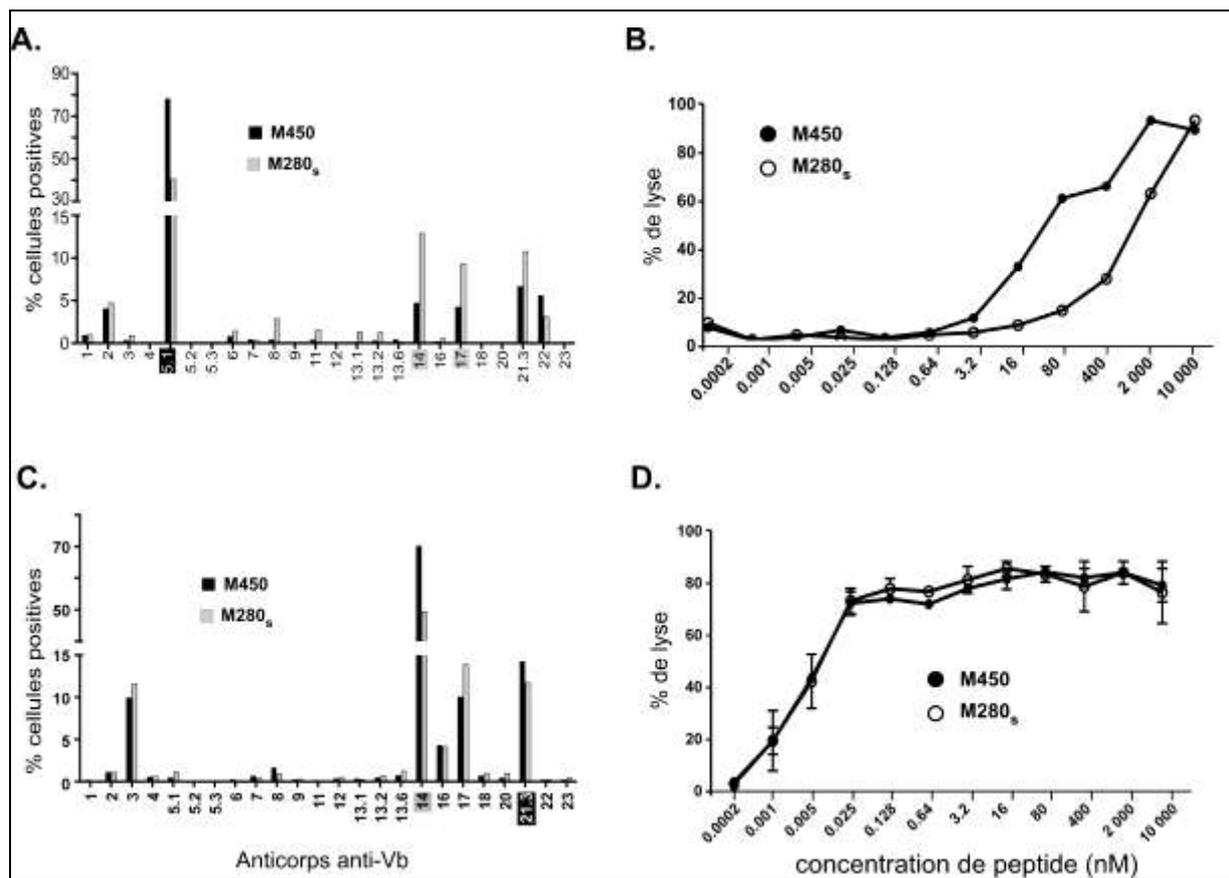


Figure 30 : caractéristiques des populations des patients 1#2 et 3  
 Caractéristiques des populations spécifiques de Melan-A du patient 1#2 (A. et B.) et du patient 3 (C. et D.) après tris. A. et C. : répertoire des populations triées par les billes M450-AvT (barres noires) et M280<sub>s</sub> (barres blanches) par marquage avec 24 anticorps anti-Vβ. B. et D. : Avidité des populations triées par les billes M450-AvT (cercles noirs) ou M280<sub>s</sub> (cercles blancs). L'activité lytique est évaluée par mesure du <sup>51</sup>Cr libéré sur 4h lors de la lyse de la lignée T2, chargée avec des concentrations croissantes de peptide Melan-A<sub>26-35</sub> A27L, par les lymphocytes spécifiques. Le rapport effecteur:cible utilisé est de 10 :1 (n=2 sauf pour le patient 2).

Nous avons trié les Vβ prédominants issus de chacun des tris de ces patients (cf. Figure 31 A et C) :

- Patient n°1#2 : Vβ 5.1 (80%) issu du tri M450-AvT et les Vβ 14 (13%) et Vβ 17 (11%) issu du tri M280<sub>s</sub>
- Patient n°3 : Vβ 21.3 (15%) issu du tri M450-AvT et le Vβ 14 (70%) issu du tri M280<sub>s</sub>.

À l'issue des tris, nous avons mesuré la capacité lytique de ces populations (pureté > 85%) vis à vis de la lignée T2 chargées par le décapeptide modifié A27L (cf. Figure 31B et D).

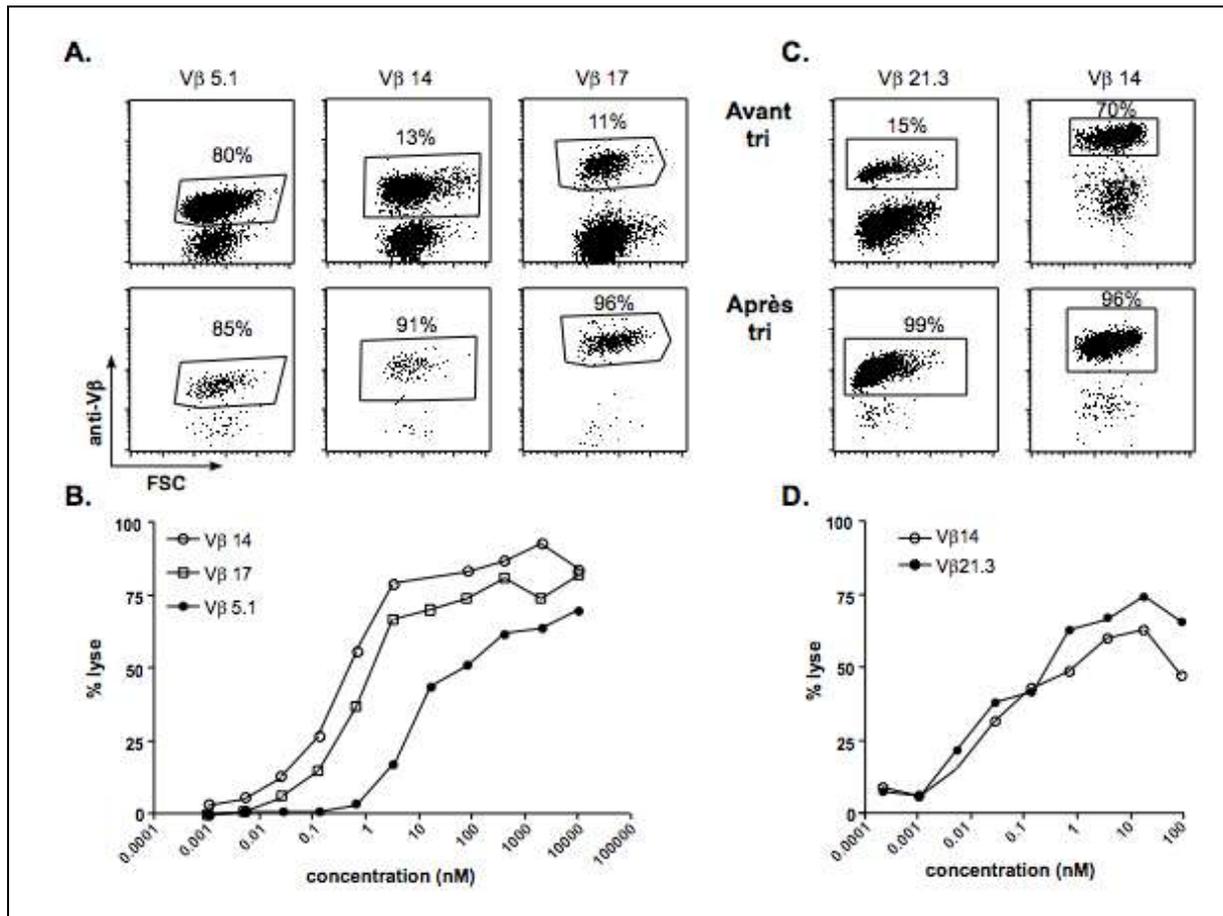


Figure 31 Résultats des tris Vβ

A. et C. Analyse en cytométrie de flux de la fréquence des populations Vβ 5.1 (M450-AvT) et Vβ 14 et Vβ 17 (M280<sub>s</sub>) du patient 1#2 (A.) et Vβ 21.3 (M450-AvT) et Vβ 14 (M280<sub>s</sub>) du patient n°3 (C.) avant et après tri des populations Vβ correspondantes. B. et D. : Avidité des populations triées vis-à-vis de la lignée cellulaire T2 (TAP déficiente) chargées avec une gamme de concentration de décapeptide modifié A27L. L'activité lytique a été évaluée au ratio effecteur : cible 10 :1, par la méthode du relargage du <sup>51</sup>Cr pendant 4h. B. : Patient n°1#2 : Vβ 5.1 issu du tri M450-AvT (rond noir) et Vβ 14 (rond blanc) et Vβ 17 (carré blanc) issu du tri M280<sub>s</sub>. D. : Patient n°3 : Vβ 21.3 issus du tri M450-AvT (rond noir) et Vβ 14 (rond blanc) issu du tri M280<sub>s</sub>.

Pour le patient 1#2, nous observons des différences d'avidité entre les 3 populations triées. Les avidités des populations issues du tri M280<sub>s</sub> (Vβ14 et Vβ17) sont supérieures (EC50 respectives 0,4nM et 1,3nM) à celles du tri M450-AvT (Vβ 5.1, EC50 : 60nM), alors que pour les populations totales, l'EC50 du tri M450-AvT est supérieure à celle du tri M280<sub>s</sub>. Pour le patient #3, nous n'observons pas de différences d'avidité entre les 2 populations Vβ triées. Bien que les populations triées obtiennent de grandes disparités d'avidité (EC50 de 0,007nM à 500nM), cette analyse faite sur seulement deux donneurs ne nous permet pas de conclure. Cependant, dans l'ensemble,

nos données ne semblent pas mettre en évidence de liens entre avidité et sensibilité accrues aux mécanismes de mort cellulaire.

Les cellules étudiées non pas été seulement en contact avec les différents monomères, elles ont également subi, simultanément aux tris, une amplification polyclonale. Il est fort probable que les cellules nourricières aient exercé un effet propre dans la balance des signaux pro- ou anti-apoptotiques. De fait, afin de conforter nos résultats, il nous paraissait important d'entreprendre une étude plus formelle, en évaluant directement l'effet des multimères sur certaines sous-familles de V $\beta$ .

### **Analyse de l'apoptose induite par les multimères sur les sous-familles de V $\beta$**

Nous avons donc voulu savoir si certaines sous-familles de V $\beta$  étaient plus sensibles à l'apoptose ou à l'activation induite par les multimères. Pour cela, nous avons incubé deux lignées de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A durant 40h avec les différents multimères. Avant la co-incubation, nous avons analysé le répertoire de ces lignées avec un panel de 24 anticorps anti-V $\beta$ , seuls les V $\beta$  majoritaires seront analysés par la suite. Les cellules ont été incubées avec les multimères M450-AvT ou les multimères M280s, versus sans billes. Après 40h d'incubation à 37°C, les cellules ont été numérées puis analysées en cytométrie de flux pour réévaluer la fréquence des sous-familles V $\beta$  majoritaires. Le facteur d'amplification global est supérieur à 1, lorsque les 2 lignées ont été incubées avec les billes M450-AvT (1,46 pour la Figure 32A et 1,6 pour la Figure 32B); alors que la co-incubation avec les billes M280s conduit à un facteur d'amplification global inférieur à 1 (respectivement 0,6 et 0,36 pour les populations A et B). La Figure 32 rapporte les index de stimulation obtenus pour chaque sous-famille de V $\beta$  pour les 2 lignées testées. Pour chaque V $\beta$ , l'index de stimulation a été calculé de la manière suivante :

$$\text{Index de stimulation } Vb_x = \frac{\text{nb de cellules } Vb_x \text{ après incubation avec les billes}}{\text{nb de cellules } Vb_x \text{ après incubation avec du milieu seul}}$$

Cet index reflète la balance entre prolifération et apoptose pour chaque sous-famille V $\beta$  :

- Lorsque les cellules se sont amplifiées, l'index de stimulation est supérieur à 1,
- Lorsque les cellules sont mortes, l'index de stimulation est inférieur à 1.

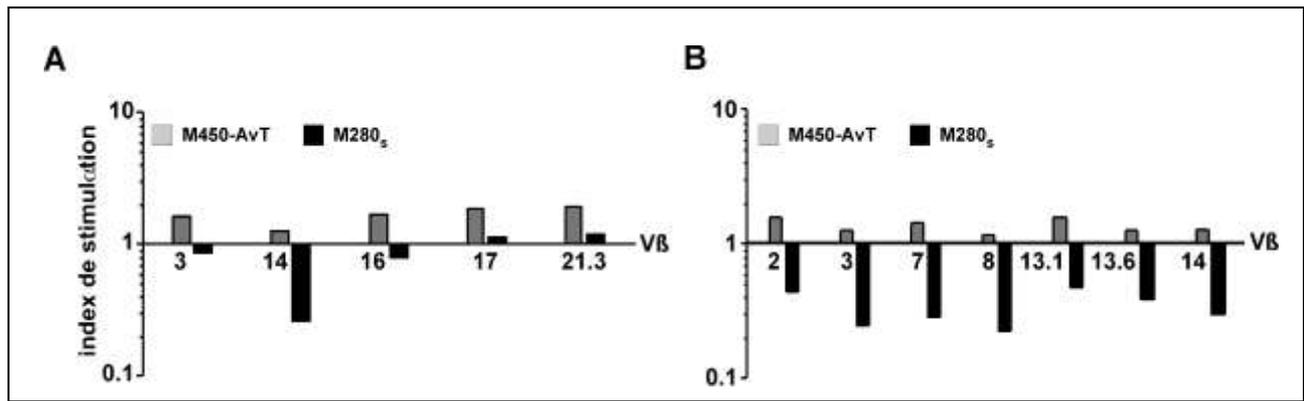


Figure 32 : Index de stimulation des sous-familles V $\beta$

Deux lignées différentes de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A (A et B) ont été incubées avec les billes M450-AvT ou M280<sub>s</sub> pendant 40h à 37°C au rapport 1:1. Les pourcentages des principales sous-familles V $\beta$  ont été mesurés par cytométrie en flux et pour chacune le nombre absolu de cellules a été calculé pour chaque condition expérimentale. Les résultats sont exprimés en index de stimulation.

Les multimères M450-AvT induisent, avec quelques variations, une expansion de toutes les sous-familles V $\beta$  testées, alors que pour les billes M280<sub>s</sub>, les phénomènes d'apoptose prédominent sur la prolifération de la majorité des sous-familles V $\beta$ . Pour la lignée représentée par Figure 32A, par exemple, la sous-famille V $\beta$ 14 est la plus sensible à l'apoptose induite par les billes M280<sub>s</sub> et elle ne prolifère que très peu avec les billes M450-AvT alors que les sous-familles V $\beta$ 17 et 21.3 prolifèrent avec les billes M450-AvT et restent pratiquement stables avec les billes M280<sub>s</sub>. Des résultats similaires sont observés avec la lignée représentée sur la Figure 32B : certaines sous-familles comme le V $\beta$ 3 et 8 sont très sensibles à l'apoptose alors que les V $\beta$ 2 et 13.1 le sont beaucoup moins.

Par ailleurs, cette sensibilité à l'AICD ne semble pas être liée à des sous-familles particulières puisque, à titre d'exemple, le V $\beta$ 3 de la lignée B est très sensible à l'apoptose induite par les billes M280<sub>s</sub> alors que dans la lignée A, il l'est beaucoup moins. Ces résultats suggèrent donc que parmi le répertoire anti-Melan-A d'un patient donné, certaines familles de V $\beta$  sont plus sensibles que d'autres à l'apoptose induite par les multimères, et il ne semble pas possible de prédire la sensibilité à l'apoptose d'une sous-famille particulière de V $\beta$  sur ce seul critère.

# **Stimulation de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A à l'aide de protéines recombinantes**

Le second projet sur lequel j'ai travaillé au cours de ma thèse concerne l'étude de l'importance relative de la co-stimulation 4-1BBL et CD28 dans un modèle de lymphocytes T CD8 anti-tumoraux. Notre laboratoire et d'autres développent de nombreux protocoles d'immunothérapie passive reposant sur l'injection de lymphocytes T CD8+ humains. Notre équipe s'intéresse plus particulièrement à l'injection de lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre des antigènes exprimés par des cellules tumorales. Dans l'état actuel des connaissances, aucune donnée solide n'indiquent de corrélation entre le nombre de cellules injectées et l'efficacité de la thérapie, cependant la faible toxicité des produits de thérapie cellulaire permet l'injection d'un nombre conséquent de cellules sans effets indésirables notoires. Pour ces raisons, notre groupe a mis au point une technique d'amplification polyclonale de lymphocytes T par des cellules nourricières irradiées composées de PBMC allogéniques et lignées B immortalisées par le virus de l'EBV afin d'amplifier les lymphocytes d'intérêt (Pandolfino et coll. 2001).

Nous avons montré précédemment que la stimulation de clones T par le HLA-peptide seul induisait une apoptose massive des cellules, il semblait donc nécessaire d'adjoindre un signal de co-stimulation pour amplifier efficacement les lymphocytes T. À mon arrivée dans le laboratoire nous disposions déjà d'une méthode basée sur l'utilisation de billes streptavidine servant de support pour l'immobilisation des ligands activateur biotinylés. Afin de fournir le signal le plus physiologique possible, la forme recombinante du 4-1BBL humain avait déjà été produite (Rabu et coll. 2005) et son efficacité, pour l'amplification de lymphocytes T CD8+ mémoires anti-EBV et anti-CMV, avait été prouvée. Cette étude a montré que la stimulation associant HLA et 4-1BBL amplifiait efficacement les cellules mémoires anti-EBV et anti-CMV sans qu'il y ait émergence d'une population CD28-, les cellules obtenues étant capable de lyser leur cible et de sécréter de l'INF $\gamma$ . Or le CD28 est fréquemment perdu au cours des cultures (Pawalec et coll. 2004), et les cellules CD28+ semblent avoir un avantage prolifératif supérieur aux cellules CD28- (Appay et coll. 2002). Par ailleurs, l'analyse du devenir des

lymphocytes T anti-melan-A/MART-1 injectés à des patients a permis à Powell et al de montrer que les cellules CD28+, qui étaient minoritaires dans la population de départ, ont rapidement représenté, in vivo, la population majoritaire (Powell et coll. 2005). Les lymphocytes T CD8 anti-Melan-A représentent un très bon modèle, puisque chez une proportion non négligeable d'individus sains (70% environ) le répertoire naïfs est important et chez les patients, la présence de ces lymphocytes a été documentée dans de nombreuses études (Lee et coll. 1998; Pittet et coll. 2001; Labarrière et coll. 2008). Ainsi disposant de formes recombinantes de HLA-peptide et de 4-1BBL ainsi que d'anticorps anti-CD28, nous avons mis en place des expériences de stimulation de lymphocytes T spécifiques de Melan-A. Nous avons testé différentes combinaisons de signaux : HLA-peptide seul et associé à l'anti-CD28 ou au 4-1BBL. Notre modèle d'étude a consisté à amplifier et à caractériser les lymphocytes T CD8+ spécifiques du décapeptide modifié 26-35<sub>A27L</sub> (ELAGIGILTV) chez des donneurs sains et chez des malades atteints de mélanome.

### **Calibration des billes**

Les différentes molécules que nous voulions fournir aux cellules ont été immobilisées sur des supports immuno-magnétiques. Notre choix s'est orienté sur des billes Dynal M280 recouvertes de streptavidine afin de pouvoir immobiliser des protéines biotinylées.

Ces billes ont une taille moyenne de 2,8µm, soit 3 à 4 fois plus petites qu'un lymphocyte, permettant l'interaction d'une cellule avec plusieurs billes en même temps. Elles ont cependant une taille suffisante pour être visibles au microscope optique et analysable en cytométrie de flux. Leur caractère magnétique permet de les isoler rapidement pour les laver, les éliminer des cultures cellulaires, trier des populations cellulaires.

Afin d'assurer la reproductibilité des expériences, nous avons entrepris une calibration.

#### **Billes HLA/CD28**

Lorsque nous avons débuté cette étude il n'y avait pas de donnée indiquant la proportion de signal CD28 à fournir par rapport au signal TCR pour une activation optimale des lymphocytes T CD8, il est cependant indispensable que la stimulation du

CD28 soit fournie conjointement à la stimulation du TCR (Ding et coll. 1994). De fait, nous avons opté pour les délivrer en quantité égale. La biotinylation enzymatique du complexe HLA A\*201-MelanA/MART-1 assure la fixation d'une seule biotine sur la séquence de biotinylation de chaque monomère, en revanche la biotinylation chimique de l'anticorps anti-CD28 (BD Biosciences) peut à priori fixer une biotine sur chaque lysine de l'anticorps. C'est pourquoi nous avons mis au point un procédé de calibration des billes par une technique de marquage immunofluorescent afin d'immobiliser une quantité identique de monomère et d'anti-CD28.

Un nombre fixe de billes ( $1,34 \times 10^5$ ) est incubé avec une gamme de concentration de chaque constituant séparément. Les fixations du monomère et de l'anti-CD28 sont révélées respectivement par un anticorps anti-HLA\*ABC et par un anticorps anti-souris. Les 3 points situés autour du point d'inflexion de chacune des courbes de saturation sont retenus pour les soumettre au compétiteur au cours de la double calibration. Lors de la compétition chaque point est fait en double, un servant à la détection du HLA, l'autre à la détection de l'anti-CD28. Les MFI relatives pour chaque constituant (HLA ou anti-CD28) en présence du compétiteur (anti-CD28 ou HLA) sont calculées selon les formules suivantes :

$$MFI\ HLA\ relative = \frac{MFI\ HLA\ à\ la\ concentration\ x\ en\ présence\ d'\ anti - CD28\ à\ la\ dilution\ y}{MFI\ HLA\ seul\ à\ la\ dilution\ x}$$

$$MFI\ anti - CD28\ relative = \frac{MFI\ anti - CD28\ à\ la\ concentration\ y\ en\ présence\ de\ HLA\ à\ la\ dilution\ x}{MFI\ anti - CD28\ seul\ à\ la\ dilution\ y}$$

Où :

- x représente une des trois concentrations de HLA testée (0,5; 0,25; 0,125 µg/ml).
- y représente une des trois dilutions d'anti-CD28 testées ( 1/20 ; 1/40 ; 1/80).

Pour la représentation graphique les MFI relatives sont en abscisse pour le HLA et en ordonnées pour l'anticorps anti-CD28 (cf. *Figure 33*).

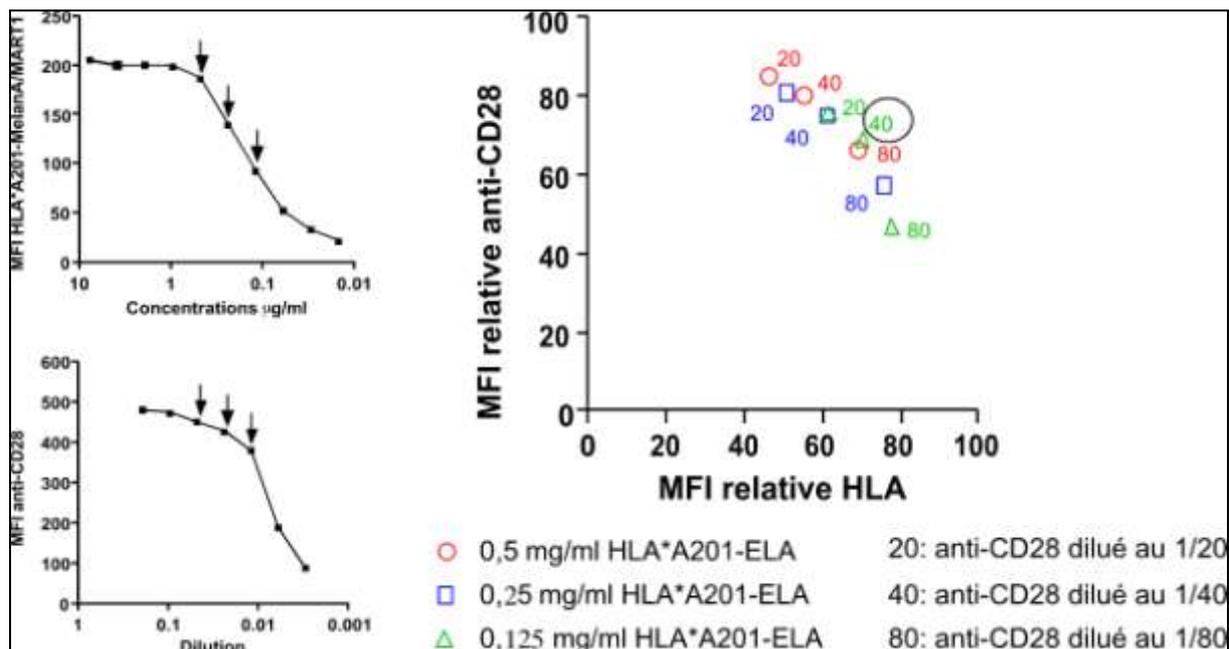


Figure 33 : Calibration HLA/CD28

calibration des billes M280 avec le monomère HLA A\*201-MelanA/MART-1 et l'anticorps anti-CD28. Les courbes de calibration de chacun des ligands sont représentées à gauche, elles nous permettent d'établir le 100% de marquage pour chaque concentration en l'absence de compétiteur. Les points indiqués par une flèche ont été testés en compétition avec l'autre ligand pour chacune des concentrations choisies (courbe de droite). La condition retenue est cerclée de noir.

Nous considérons que les concentrations nous permettant d'obtenir un marquage équivalent pour le HLA et l'anti-CD28 correspondent à quantité approximativement équivalente de chaque ligand. Les billes seront donc préparées en utilisant une concentration de 0,125µg/ml de monomère HLA A\*201-MelanA/MART-1 et une dilution au 1/40<sup>ème</sup> pour l'anti-CD28.

### **Billes HLA/4-1BBL**

Le monomère HLA A\*201-ELA et le trimère 4-1BBL sont tous deux biotinylés enzymatiquement par l'enzyme BirA. Cependant seule la chaîne lourde de la molécule HLA présente une séquence de biotinylation, alors que les 3 monomères du 4-1BBL sont susceptibles d'être biotinylés, mais il est difficile de déterminer si tel est le cas. De plus, il est probable que l'encombrement stérique de la forme trimérique puisse gêner l'accès de la séquence de biotinylation à l'enzyme.

Pour cette raison, nous avons utilisé la même méthode de calibration pour les billes HLA/4-1BBL que pour les billes HLA/CD28. L'analyse des billes par cytométrie est

réalisée avec un anticorps anti-HLA\*ABC et un anti-4-1BBL (Cf. Figure 34).

Les MFI relatives de chaque constituant sont calculées comme pour la double calibration HLA/CD28 .

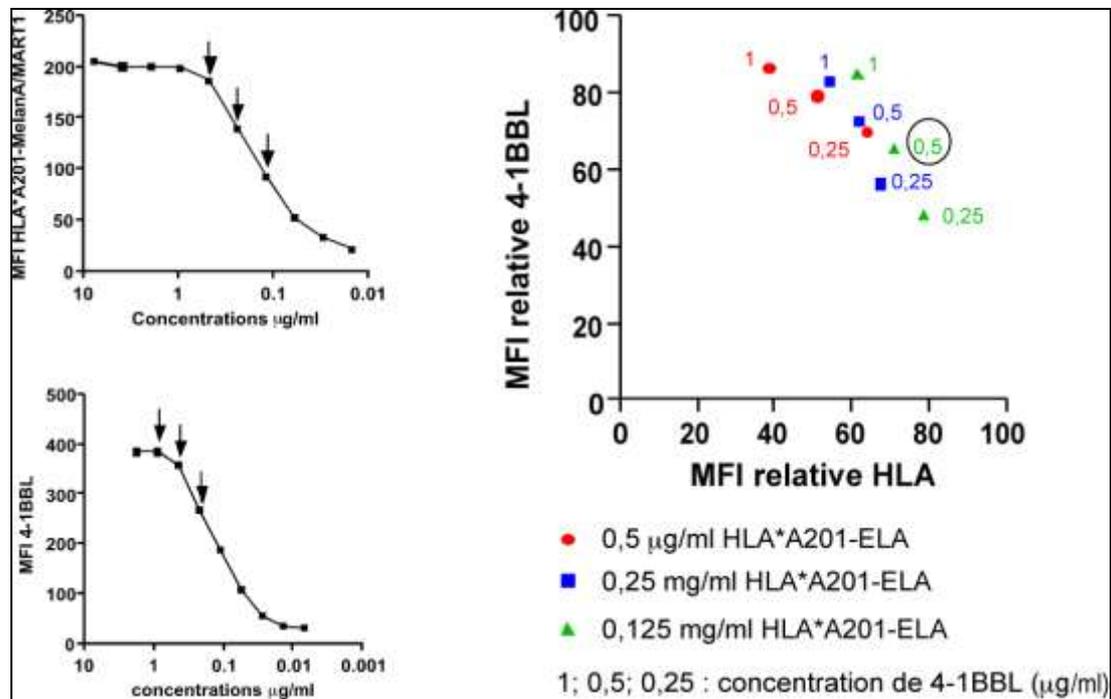


Figure 34: Calibration HLA/4-1BB ligand calibration des billes M280 avec le monomère HLA A\*0201-MelanA/MART-1 et le 4-1BBL. Les courbes de calibration de chacun des ligands sont représentées à gauche, elles nous permettent d'établir le 100% de marquage pour chaque concentration en l'absence de compétiteur. Les points indiqués par une flèche ont été testés en compétition avec l'autre ligand pour chacune des concentrations choisies (courbe de droite). La condition retenue est cerclée de noir

Dans ce cas, les concentrations nous permettant d'avoir des quantités équivalentes de HLA et de 4-1BBL sur les billes sont 0,125µg/ml de monomère HLA\*A201/ELA et 0,5µg/ml de 4-1BBL

### **Billes HLA**

Afin de fournir un signal TCR équivalent dans toutes les conditions, la dose de HLA\*A201/ELA utilisée est fixée à la concentration permettant d'obtenir un marquage de 50% du marquage obtenu à 0,125µg/ml soit 0,0625µg/ml.

## Les lymphocytes

### Obtention des cellules

Pour cette étude, nous nous sommes premièrement intéressés à des donneurs sains dont nous avons pu obtenir des échantillons de sang par l'intermédiaire de l'Etablissement Français du Sang de Nantes. Dès réception des échantillons, nous les avons analysés en cytométrie en flux, par un marquage avec l'anticorps anti-HLA-A\*0201 :BB7-2. Seuls les donneurs HLA-A\*0201 ont été retenus pour l'étude.

Les tris des lymphocytes T CD8 ont été effectués soit par tri négatif sur sang total par tri RosetteSep (Stemcell technology) selon les recommandations du fabricant, soit par tri positif sur des PBMC par un tri CD8 Miltenyi (Miltenyi Biotech).

Quelle que soit la méthode de tri utilisée les populations cellulaires obtenues étaient pures à : 95, 41%  $\pm$  0,71 (cf. *Tableau 5* et *Figure 35*).

### Caractérisation des cellules à J0

À J0, sur l'ensemble des donneurs sains, nous avons évalué, par un double marquage CD8/tétramère HLA-A\*0201/ELA, la fréquence initiale des précurseurs Melan-A. Près de 0,3% des lymphocytes T CD8 circulant sont marqués par le tétramère (moyenne : 0,29%  $\pm$  0,12) (cf. *Tableau 5* et *Figure 35*). Cette fréquence, chez le donneur sain, est supérieure à celle décrite dans la littérature. Pittet *et al* ont évalué la fréquence des lymphocytes T CD8+ spécifiques de Melan-A à 0,07% des lymphocytes T CD8+ circulant des donneurs sains HLA-A\*0201, ils ont également estimé la limite basse de détection par tétramère à 0,04% (Pittet et coll. 1999). Du fait d'un nombre restreint de cellules à J0 il est probable que les fréquences que nous mesurons soient surestimées par rapport au nombre de cellules spécifiques réellement présentes. Néanmoins l'erreur étant la même partout, ces résultats nous serviront de valeur de base.

Il serait pertinent de mieux caractériser les cellules spécifiques à J0, cependant une analyse phénotypique plus développée est, à ce stade, impossible de par le faible nombre de cellules spécifiques. Nous nous intéresserons dès la fin de la première stimulation, au statut CD28 des cellules spécifiques afin de mieux caractériser les populations que nous allons cibler dans ces expériences.

Donneurs	Pureté CD8 (%)	% CD8 <sup>+</sup> /Tétramère <sup>+</sup>
2811	93,78	0,34
0408	95,6	0,12
0505	98,88	0,10
0607	95,56	0,04
1614	98,75	0,04
330	96,55	0,02
1605	94,06	0,03
0905	93,39	0,09
0107	97,77	0,47
0307	91,83	0,60
0307PL	93,36	1,31

Tableau 5 : caractérisation des cellules de donneurs sains à J0 en terme de % de pureté en lymphocytes T CD8, de fréquence en précurseurs spécifiques de Melan-A parmi les CD8<sup>+</sup>.

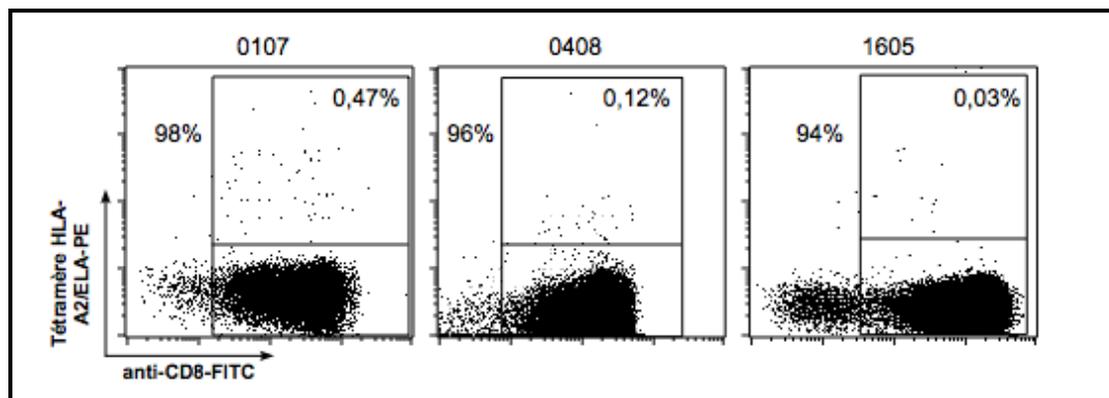


Figure 35 : Donneurs sains : analyse phénotypique à J0. Analyse en cytométrie de flux des population triées CD8. Pour chaque donneur sain, les pourcentages de droite indiquent la pureté des tris, ceux situés dans le cadran supérieur : le pourcentage de cellules spécifique de Melan-A parmi les CD8. Exemple de trois donneurs sains représentatifs.

## Principe de l'amplification

### Quand fournir le signal 4-1BB

#### Cinétique d'expression du 4-1BB

Le 4-1BB est une protéine inductible exprimée principalement par les lymphocytes T, en réponse à une activation du complexe TCR/CD3. Des données chez la souris indiquent que l'ARNm de 4-1BB est détecté 3 heures après une stimulation de splénocytes par de l'anti-CD3, l'expression à la surface cellulaire augmentant lentement

pour atteindre un niveau maximum au bout de 60 heures (Vinay et coll. 1998)

L'expression du 4-1BB sur des lymphocytes T CD8+ humain avait déjà été étudié dans le laboratoire par C. Rabu. Des lymphocytes T CD8 purifiés avaient été stimulés par différentes concentrations d'un anticorps anti-CD3 agoniste immobilisé au plastique (clone OKT3 orthoclone). Les résultats, en accord avec les données de la littérature, montraient qu'après 24h de stimulation, plus de 70% des cellules stimulées par 1µg/ml d'OKT3 expriment le 4-1BB, alors que seulement 20% et 40% des cellules l'expriment avec des concentrations de 0,5 et 0,25µg/ml (Rabu C. 2005). Par ailleurs, une étude plus récente a montré que suite à une stimulation spécifique, l'expression du 4-1BBL par des lymphocytes T CD8 anti-Melan-A débutait dès 5h pour atteindre un maximum à 24h avant de décroître (Wolfl et coll. 2007). Dans ce contexte, nous avons choisi de co-stimuler les cellules spécifiques par le 4-1BBL dès le premier jour.

#### Rôle de l'IL-2 et l'IL-15

L'interleukine 2 est la cytokine la plus fréquemment utilisée dans les laboratoires pour cultiver les lymphocytes T. Cependant, son rôle dans l'AICD est aujourd'hui bien connu et afin d'éviter cet effet délétère dans notre modèle nous avons cherché à la substituer. Nous avons évalué l'effet de l'IL-15 sur l'expression du 4-1BB pour plusieurs raisons. Une étude de Kim et al a montré que l'IL-15 associée à IL-12 permet l'expression du 4-1BB à la surface de lymphocytes T naïfs issus de sang de cordon (Kim et coll. 2002). Un article concernant des souris transgéniques surproduisant de l'IL15 a montré chez ces souris, que L'IL-15 était responsable de l'abrogation de l'AICD induite par l'IL-2 (Marks-Konczalik et coll. 2000). Une étude plus récente à montré que des lymphocytes humains surproduisant de l'IL-15 pouvaient survivre plusieurs mois sans autres apport de cytokine (Hsu et coll. 2005).

Nous avons donc testé l'expression du 4-1BB par les lymphocytes T CD8 sur une population purifiée de lymphocytes T issus de 3 donneurs sains en présence IL-15 associé ou non à une stimulation CD3 (cf. Tableau 6). Sur les cellules non stimulées, l'IL-15 n'a que très peu d'effet sur l'induction de l'expression du 4-1BB. Associé à la stimulation CD3, l'IL-15 induit l'expression du 4-1BB par plus de 75% des cellules (contre 60% avec l'anti-CD3 seul) et avec des niveaux d'expression supérieurs à ceux obtenus avec l'IL-15 seule ou le CD3 seul à la dose de 1µg/ml.

Donneurs	NS	NS+IL15	CD3	CD3+IL15
DO 1 %	0,1%	26,7% (54)	89,7% (390)	95,2% (462)
DO 2 %	0%	-	76% (256)	81% (427)
DO 3 %	0,3%	20% (58)	17% (39)	52% (167)
<b>Moyenne(%)<math>\pm</math>SEM</b>	<b>0,13 <math>\pm</math></b>	<b>23,50 <math>\pm</math></b>	<b>60,90 <math>\pm</math> 22,30%</b>	<b>76 <math>\pm</math> 12,66%</b>

*Tableau 6 : IL-15 et expression du 4-1BB*

*Effet de l'IL-15 sur l'expression du 4-1BB par les lymphocytes T CD8+. Pourcentage de cellules exprimant le 4-1BBL ainsi que les intensités de fluorescence associées (MFI). NS : cellules non stimulées*

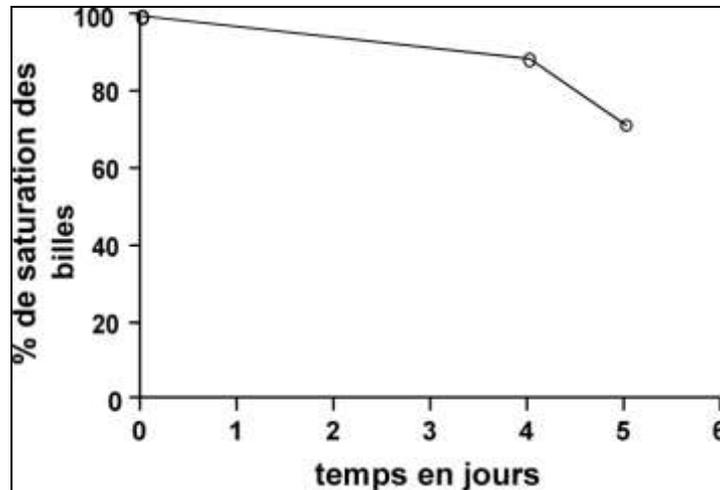
Concernant l'IL-2, l'amplification de lymphocytes T spécifiques d'antigène viraux en présence ou en l'absence d'IL-2 avait déjà été évaluée dans notre laboratoire (Rabu 2005). Des doses de 50UI/ml, plus faibles que celles utilisées habituellement (150UI/ml) mais proches de celles utilisées dans d'autres modèles (Maus et coll. 2002), ont permis une très forte expansion, alors que sans IL-2 il n'y avait aucune expansion.

Dans notre modèle de stimulation de lymphocytes T CD8+ spécifiques de Melan-A, nous avons décidé d'utiliser l'IL-15 (20ng/ml), durant les trois premiers jours de stimulation, afin de garantir une expression correcte du 4-1BB et de réduire l'AICD suite à la stimulation TCR. L'IL-2 étant ensuite rajoutée à J3 (50UI/ml), puis régulièrement au cours de la culture.

#### *Stabilité du 4-1BBL recombinant à la surface des billes*

Les billes que nous utilisons portent à la fois le complexe CMH/peptide et les signaux de co-stimulation : CD28 ou 4-1BBL. Les interactions du complexe CMH-peptide avec le TCR et de l'anticorps anti-CD28 avec le CD28 peuvent être considérées comme quasi immédiates lors de l'initiation de la co-culture, alors que pour exercer son action le 4-1BBL doit attendre l'expression, induite par la stimulation du TCR, du 4-1BB à la surface des lymphocytes T CD8. Nous avons voulu savoir si, dans nos conditions de culture, le 4-1BBL recombinant était toujours présent sur les billes lorsque son récepteur était exprimé. Nous avons montré que l'expression du 4-1BBL à la surface des lymphocytes T CD8 débute dès les premières 24h et atteint son maximum en 24-72H suivant la puissance de la stimulation. Nous avons donc réalisé une étude de stabilité de cinq jours du 4-1BBL fixé à la surface des billes dans le milieu de culture que nous utilisons (RPMI 8%SH + L-glutamine et antibiotique, à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Régulièrement

une partie des billes était prélevée, lavée et la persistance du 4-1BBL à leur surface était évaluée par cytométrie de flux à l'aide d'un anticorps anti-4-1BBL-PE. La Figure 36 représente l'évolution du pourcentage de saturation des billes au cours du temps.



*Figure 36 : stabilité du 4-1BBL recombinant à la surface des billes.*

*Les billes recouvertes de 4-1BBL conservées dans le milieu de culture à 37°C, ont été marquées à différents temps (abscisses) avec un anticorps anti-4-1BBL-PE. En ordonnées: pourcentages de moyenne de fluorescence calculés par rapport à J0.*

Cette étude montre que dans nos conditions de culture, 4 jours après son immobilisation sur les billes, plus de 90% du 4-1BBL recombinant est encore fixé. Cette stabilité permet au 4-1BBL d'interagir avec son récepteur dès son expression, pour cette raison nous avons décidé d'utiliser un même support pour fournir les deux signaux au lymphocyte T CD8.

### **Co-stimulation par le 4-1BBL : 1<sup>ère</sup> ou 2<sup>ème</sup> stimulation**

Nous avons montré que l'expression du 4-1BB à la surface des lymphocytes T CD8 était induite dès les premières heures de stimulation et que cette expression était augmentée à la fois en termes de nombre de cellules et de niveau d'expression grâce à l'addition d'IL-15. Par conséquent nous avons choisi de stimuler les lymphocytes T CD8 en présence d'IL-15 seule à 20ng/ml les 3 premiers jours, puis en supplémentant le milieu avec 50 UI/ml d'IL-2 à partir du 3<sup>ème</sup> jour puis régulièrement au cours de la culture. Afin d'évaluer l'efficacité de nos conditions d'amplification nous avons réalisé des expériences préliminaires d'amplification avec les trois types de billes dans les

conditions définies ci-dessus. Nous avons co-cultivé les lymphocytes T CD8 purifiés de 4 donneurs avec des billes HLA, des billes HLA/CD28 ou des billes HLA/4-1BBL. Les monomères HLA A\*0201 sont chargés en peptide ELA issus de la protéine Melan-A. Les billes et les cellules sont co-cultivés au ratio 1 :1

À J14, les cellules sont numérotées puis marquées par un anticorps anti-CD8 et le tétramère ELA pour une analyse en cytométrie de flux.

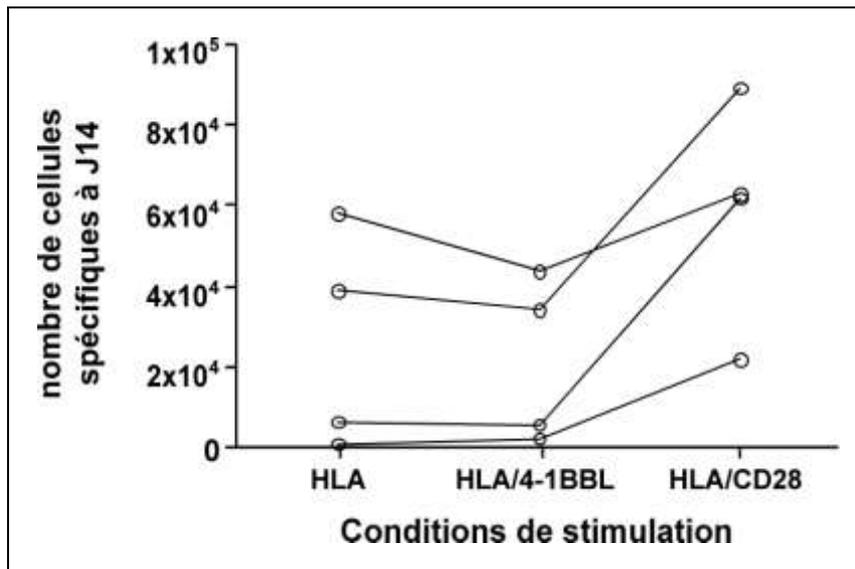


Figure 37 :co-stimulation par le 4-1BB ligand : 1<sup>ère</sup> ou 2<sup>de</sup> stimulation

Amplification de lymphocytes T CD8+ spécifiques de Melan-A. Les lymphocytes T CD8 sont purifiés (>90%) par rosette sep à partir de sang de quatre donneurs sains puis stimulés par des billes HLA, HLA/CD28 et HLA/4-1BBL pendant 14 jours en présence de cytokine. Le nombre de cellules spécifiques est évalué par numération associé à un marquage tétramère.

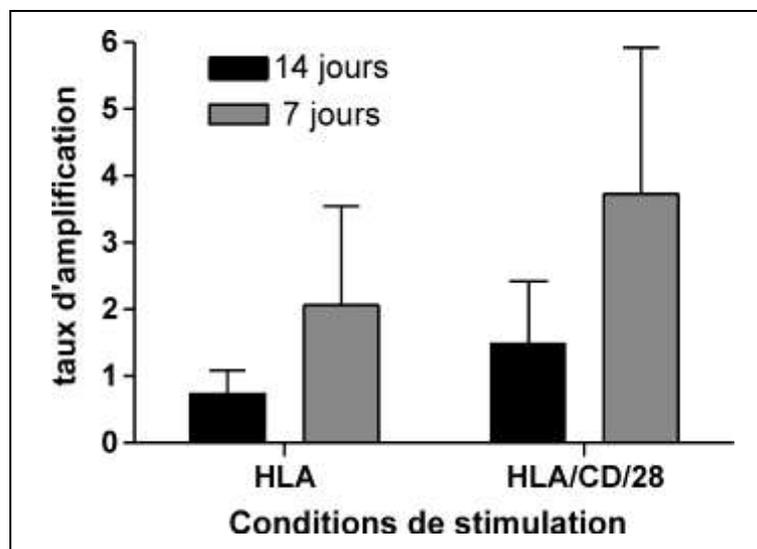
Nous montrons que la stimulation HLA/CD28 permet une amplification des lymphocytes spécifiques supérieure à la condition HLA+4-1BBL (moyenne respective :  $60 \times 10^3$  vs  $22 \times 10^3$ ) et que les stimulations HLA seul et HLA/4-1BBL sont similaires en terme de nombre de cellules spécifiques obtenues (respectivement  $27 \times 10^3$  vs  $22 \times 10^3$ ) (cf. Figure 37). Par la suite, afin de disposer d'un nombre suffisant de cellules spécifiques, nous stimulerons une première fois les lymphocytes T CD8 avec les billes HLA+CD28, puis lors d'un second cycle de stimulation, nous étudierons l'effet co-stimulant du 4-1BBL.

### **Durée de stimulation par les billes**

Dans les conditions de stimulation que nous avons définies, le rapport

bille :cellules que nous utilisons est de 1:1 ; cependant le faible nombre de cellules spécifiques présentes à J0 (entre 200 et 15 000 cellules spécifiques) fait que le nombre de billes par cellule spécifique est compris entre 65 et 5000 selon les donneurs. Il n'est pas exclus que cette quantité de billes gêne certain contact cellulaire ou stimule trop fortement les cellules spécifiques. De fait nous avons voulu vérifier que cet excès de billes n'avait aucune répercussion sur l'amplification des cellules spécifiques tout au long de la culture. À partir des lymphocytes T CD8 d'un donneur sain, nous avons testé l'influence du retrait des billes à 7 jours par rapport à un retrait 14 jours après le début de la stimulation.

Les lymphocytes T CD8 d'un donneur sain contenant 1% de cellules spécifique de Melan-A après une stimulation HLA/CD28 de 14j sont stimulés une seconde fois pendant pendant 7 ou 14 jours avec les 3 types de billes (HLA, HLA/CD28 et HLA/4-1BBL). 14 jours après le début de la seconde stimulation, les taux d'amplification des lymphocytes spécifiques sont supérieurs dans les puits où les billes ont été retirées à 7 jours par rapport à 14 jours. Ceci est vrai quelles que soient les conditions de stimulation (cf. Figure 38).



*Figure 38 : durée de stimulation par les billes*

*Taux d'amplification à J14 de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A stimulé 7 ou 14 jours. Les lymphocytes T CD8 sont purifiés par la technique de Rosette Sep (Stem Cell Technology) selon les recommandations du fabricant (pureté de 96%). Après une première stimulation HLA/CD28 les cellules sont stimulées une seconde fois dans 3 les conditions (billes HLA, HLA/CD28 ou HLA/4-1BBL) pendant 7 ou 14j. A J14 les cellules sont numérotées puis analysées par double marquage CD8 et tétramère Melan-A. Les taux d'amplification des cellules spécifiques sont calculés par rapport à la population de départ.*

Dans notre modèle d'amplification, les billes seront donc retirées 7 jours après le début de la stimulation afin qu'elles ne gênent pas l'amplification des cellules spécifiques.

### **Schémas final d'amplification**

Nos expériences préliminaires nous ont conduit à utiliser le protocole d'amplification suivant (cf. Figure 39):

- Une première stimulation de 14 jours associant la co-culture pendant 7 jours des cellules avec les billes HLA-A\*0201/ELA + anticorps anti-CD28 en présence de 20ng/ml d'IL-15 seule les 3 premiers jours puis de 50UI/ml d'IL2. Le bilan de la stimulation étant effectué à J14
- Une seconde stimulation de 14 jours associant une co-culture de 7j des cellules précédemment stimulées en présence de billes HLA-A\*0201/ELA + anticorps anti-CD28 ou HLA-A\*0201/ELA + 4-1BBL dans un milieu supplémenté en IL-2 (50UI/ml).

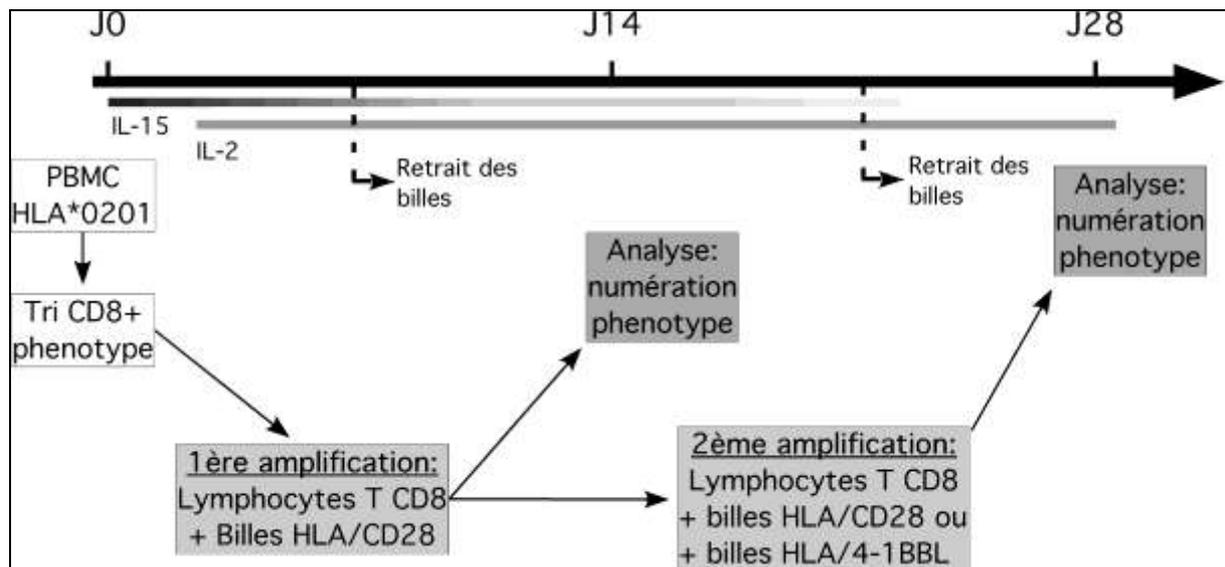


Figure 39 : Principe de l'amplification des lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A.

## **Analyse des amplifications obtenues chez le donneur sain**

Afin de tenir compte de la variabilité inter-individuelle, nous avons étudié 9 donneurs différents. Pour chacun, nous avons comparé le nombre de cellules spécifiques obtenues en stimulant les lymphocytes T triés CD8 avec des billes HLA, HLA/CD28 ou HLA/4-1BBL.

### **1<sup>ère</sup> stimulation : HLA/CD28**

#### *Comparaisons des stimulations HLA et HLA/CD28*

Afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules spécifiques, nous avons donc choisi de stimuler une première fois les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> des 9 donneurs par les billes HLA seul ou HLA/CD28.  $1 \times 10^6$  lymphocyte T CD8<sup>+</sup> ont été co-cultivés avec  $1 \times 10^6$  billes HLA\*A0201/ELA associé ou non à une co-stimulation CD28 dans les conditions de culture définies précédemment.

À l'issue de la stimulation par les billes HLA/CD28, nous avons obtenu l'amplification des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques de Melan-A de tous les donneurs, avec des nombres de cellules spécifiques variables d'un individu à l'autre, les valeurs s'étalant de  $6,7 \times 10^3$  à  $2,48 \times 10^6$  (cf Tableau 7 et Figure 41). La stimulation HLA seul à quant à elle permis une amplification chez 8 donneurs sur 9 avec un maximum à  $7 \times 10^4$  et un minimum à  $5,6 \times 10^3$  cellules spécifiques. Nous confirmons donc que la co-stimulation du CD28 associé au HLA permet une amplification des cellules spécifiques supérieure à la stimulation par le HLA seul ( $p = 0,0025$ , test de Student apparié) (cf. Figure 40). Une première stimulation par des billes HLA/CD28 nous permet donc d'obtenir un nombre suffisant de cellules spécifiques afin d'étudier ensuite la co-stimulation par le 4-1BBL recombinant sur ces cellules.

Donneurs	J0	HLA	HLA/CD28
0408	1 200	70 560	248 992
0505	1 000	6 688	6 720
0607	400	5 676	29 100
330	400	18 287	108 000
1605	300	12 602	91 728
0905	900	25 728	123 888
0107	4 700	39 591	89 712
0307	6 000	6 930	62 510
0307PL	13 100	5 083	94 484
Moyenne $\pm$ SEM	<b>3 089 <math>\pm</math> 1 431</b>	<b>21 238 <math>\pm</math> 7 258</b>	<b>95 015 <math>\pm</math> 22 958</b>

Tableau 7 : donneurs sains : première stimulation

Nombre absolu de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A à J0 puis après 14 jours d'amplification par les billes HLA ou HLA/CD28.

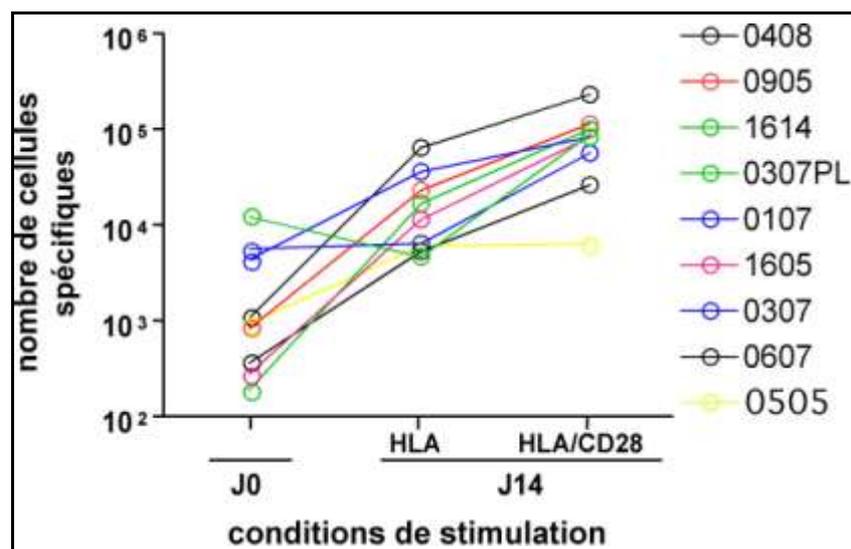


Figure 40 : Nombre de cellules spécifiques, donneurs sains, 1<sup>ère</sup> stimulation

Nombre de cellules spécifiques dans les populations de départ et après 14 jours de culture des lymphocyte T CD8 avec les billes HLA\*A0201 seule ou associé à l'anticorps anti-CD28.

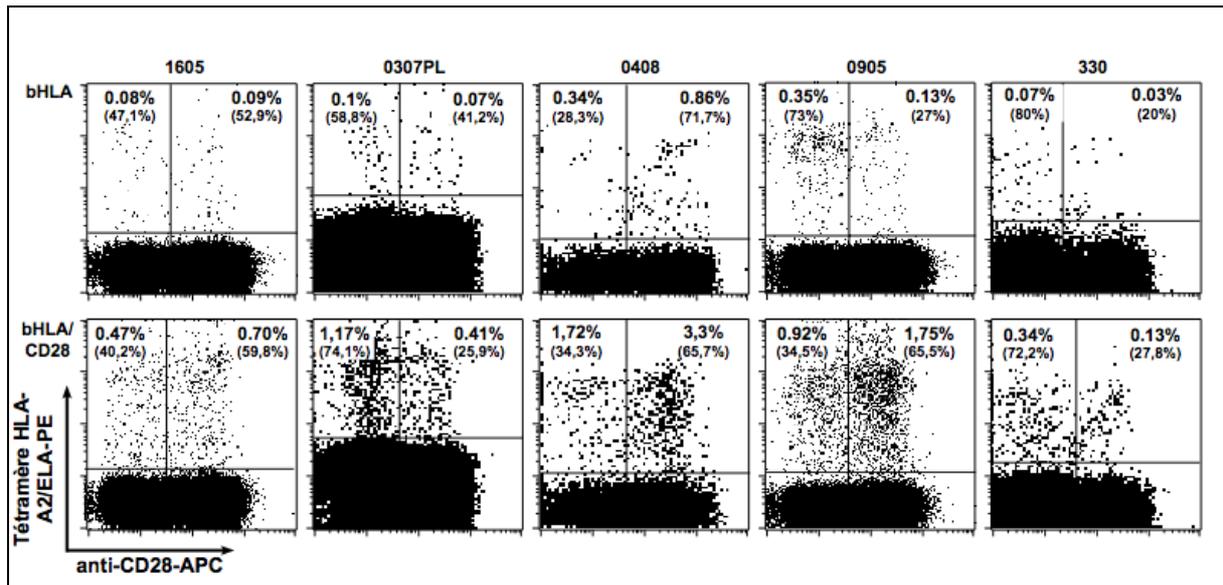


Figure 41 : 1<sup>ère</sup> stimulation des donneurs sains : % spécifiques  
 Analyse, en cytométrie de flux, du marqueur CD28 des cellules spécifiques à J14 après une première stimulation par les billes HLA ou HLA/CD28. Les pourcentages indiquent la fréquence des cellules spécifiques de Melan-A parmi les lymphocytes T CD8 totaux. Les pourcentages entre parenthèse correspondent à la répartition des cellules spécifiques en fonction de leur phénotype CD28. Exemple de cinq donneurs sains représentatifs.

#### Analyse du phénotype CD28 des cellules générées

Au cours du temps, différentes classifications des sous-populations lymphocytaires et différents marqueurs ont été utilisés pour les décrire. Les cellules naïves expriment à la fois le CD27 et le CD28, les cellules ayant déjà eu un contact antigénique perdent l'expression du CD28, mais conservent celle du CD27, les cellules très différenciées sont finalement CD27- CD28- (Appay et coll. 2002). Ainsi, le premier marqueur dont nous avons suivi l'évolution est le CD28. En effet, en culture, au cours des stimulations successives, ce marqueur est fréquemment perdu par les lymphocytes T CD8+ spécifiques de Melan-A. Bien que nous n'ayons pas testé le statut CD28 des cellules spécifiques à J0, chez les donneurs sains, elles devaient être majoritairement CD28+, car elles n'ont jamais rencontré l'antigène (Pittet et coll. 1999).

À J14, 5 donneurs sur 8 présentent une proportion de cellules spécifiques CD28+, supérieur dans la condition HLA/CD28 (*cf.* Tableau 8 *et* Figure 41), néanmoins nous ne mettons pas en évidence de différence statistiquement significative de statut CD28 entre les cellules ayant reçu la co-stimulation CD28 et celle ayant reçu la stimulation HLA seule : respectivement 47,5% ± 4,6 vs 44,6% ± 5,9. (p=0,65, Test de Student apparié) (*cf.*

Figure 42).

Nous avons émis l'hypothèse que la stimulation par l'anti-CD28 devait amplifier préférentiellement les cellules CD28+, la seconde stimulation devrait nous permettre de documenter cette évolution.

Donneurs	HLA	HLA/CD28
0408	71,7	65,7
0505	50,0	50,0
0607	37,5	43,2
330	20,0	27,8
1605	52,9	59,8
0905	27,0	65,5
0107	nd	48,3
0307	56,4	41,5
0307PL	41,2	25,9
<b>Moyenne ± SEM</b>	<b>44,6 ± 5,9</b>	<b>47,5 ± 4,6</b>

Tableau 8 : 1<sup>ère</sup> stimulation des donneurs sains : %CD28  
Pourcentages de cellules CD28+ parmi des cellules spécifiques, après une première amplification par les billes HLA ou HLA/CD28.

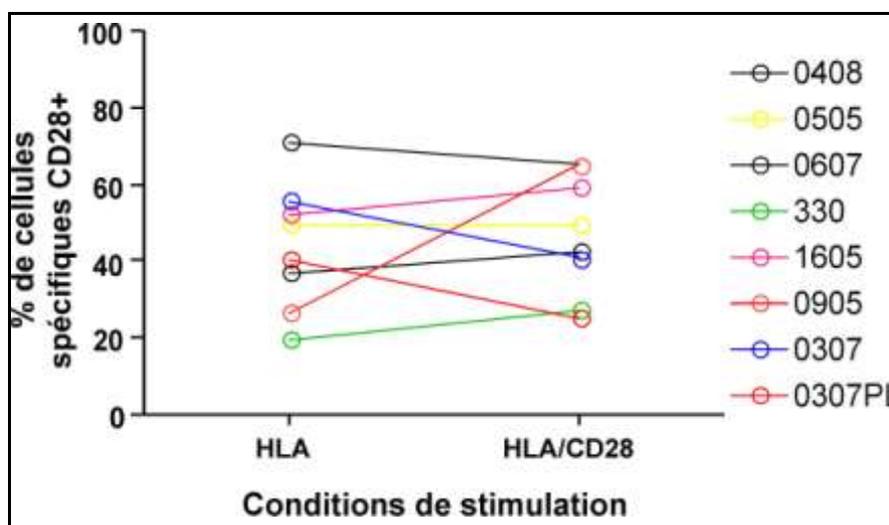


Figure 42 : 1<sup>ère</sup> stimulation des donneurs sains : %CD28  
Pourcentage de lymphocytes T CD8+ spécifiques exprimant le CD28 après la première stimulation par le HLA ou la HLA/CD28. Analyse effectuée à J14.

### 2<sup>ème</sup> stimulation

#### Comparaisons des stimulations HLA, HLA/CD28 et HLA/4-1BBL

La première stimulation nous a permis d'obtenir une proportion suffisante de

cellules spécifiques, l'effet de la co-stimulation par le 4-1BBL recombinant ou l'anti-CD28 est étudié sur des cellules déjà stimulées une première fois.

Les lymphocytes T CD8 préalablement stimulé par le HLA et l'anti-CD28 ont été mis en co-culture, au ratio 1 :1 avec des billes HLA, HLA/CD28 ou HLA/4-1BBL. Au terme des 14 jours de culture en IL-2 (50UI /ml), les cellules ont été numérées puis marquées par le tétramère afin d'évaluer le nombre de cellules spécifiques (*cf.* Figure 43, Figure 44 *et* Tableau 9). Tout comme lors de la 1<sup>ère</sup> stimulation, la co-stimulation par le CD28 permet une forte amplification des lymphocytes spécifiques dans tous les cas. Dans la condition HLA seul, les cellules n'ont été que très peu amplifiées chez 5 donneurs sur 7, mais il semble que le nombre de cellules présentes au départ a été maintenu. En revanche lors de cette seconde amplification, la co-stimulation par le 4-1BBL augmente efficacement le nombre de cellules spécifiques dans 6 cas sur 7.

Donneurs	J14		J28	
	HLA/CD28	HLA	HLA/CD28	HLA/4-1BBL
0408	50 200	313 200	5 020 310	100 340
0505	1 000	1 020	2 560	3 510
0607	3 700	5 326	8 618	4 915
330	9 000	10 260	22 464	7 767
1605	11 700	14 106	43 516	30 910
0905	26 700	24 795	94 230	57 576
0307PL	18 800	10 034	59 994	127 305
Moyenne± SEM	<b>11 817 ± 3 920</b>	<b>10 924 ± 3 333</b>	<b>38 563 ± 14 183</b>	<b>38 664 ± 19 668</b>

Tableau 9 : : 2<sup>nde</sup> stimulation des donneurs sains : nombre de cellules spécifiques nombres absolus de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A à J14 (après une première stimulation HLA/CD28) puis après 14 jours d'une 2<sup>ème</sup> amplification par les billes HLA, HLA/CD28 ou HLA/4-1BBL. Donneur 0408 exclus de l'analyse statistique

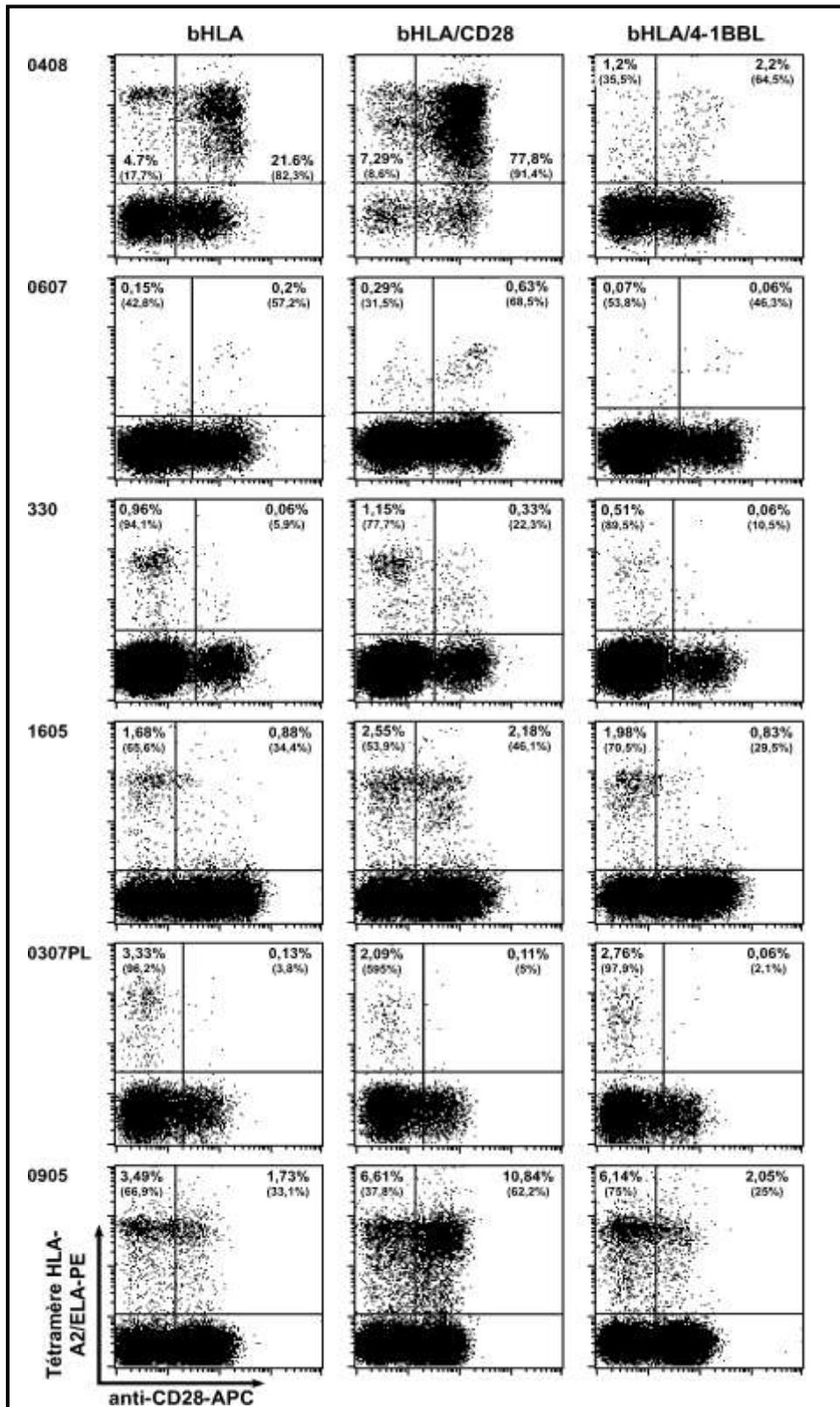


Figure 43 : 2<sup>de</sup> stimulation des donneurs sains : marquage CD28/T Aanalyse, en cytométrie de flux, du marqueur CD28 des cellules spécifiques 14 jours après re-stimulation des cellules par les billes HLA, HLA/CD28 ou HLA/4-1BBL. Les pourcentages indiquent la fréquence des cellules spécifiques de Melan-A parmi les lymphocytes T CD8 totaux. Les pourcentages entre parenthèse correspondent à répartition des cellules spécifiques en fonction de leur phénotype CD28. Exemple de six donneurs représentatifs.

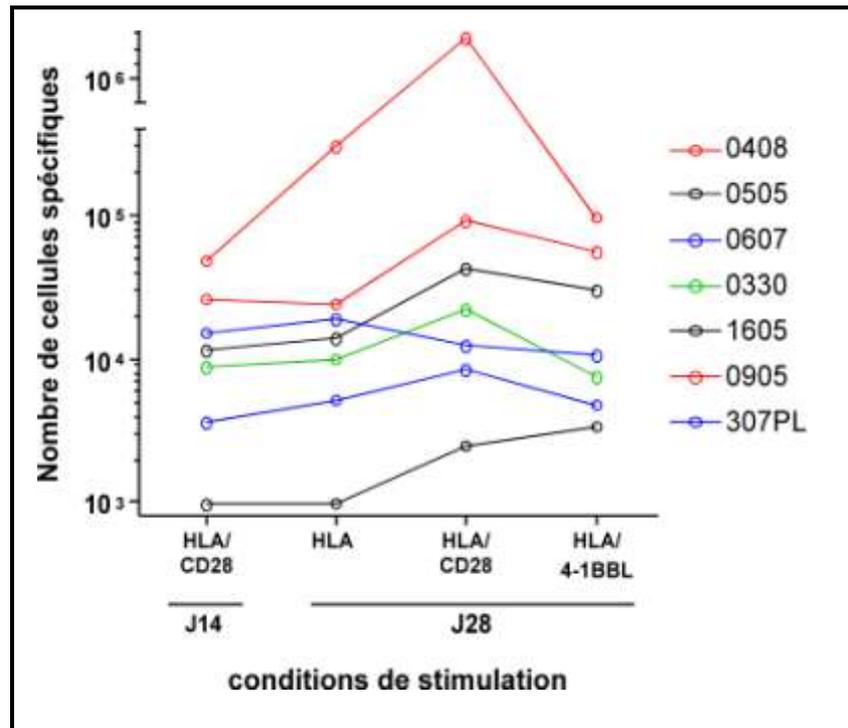


Figure 44 : donneurs sains : évolution du nombre de cellules spécifiques  
 nombre de cellules spécifiques dans la population de départ (stimulée HLA/CD28)  
 et après 14j jours de culture avec les billes HLA-A\*0201 seules ou associées à une co-  
 stimulation CD28 ou 4-1BBL.

#### Evolution du statut CD28 des cellules spécifiques

En étudiant l'évolution ce marqueur chez les donneurs sains nous avons émis l'hypothèse que les cellules CD28+ seraient amplifiées préférentiellement dans la condition HLA/CD28, alors que pour la condition HLA/4-1BBL les données de la littérature nous conduisaient à imaginer un relais de co-stimulation une fois le CD28 perdu en culture. Nous avons donc mené formellement cette analyse en étudiant l'évolution de ce marqueur, entre la première et la seconde stimulation, sur les cellules spécifiques (cf. Figure 45 et Figure 46). À l'issue de la première stimulation,  $51,7 \pm 4,5\%$  des cellules spécifiques stimulées par les billes HLA/CD28 exprimaient le CD28, 14 jours après une seconde stimulation par les billes HLA/CD28,  $50,3 \pm 8,8\%$  des cellules l'expriment encore. En revanche, avec la stimulation des cellules spécifiques par le HLA associé ou non à une co-stimulation par le 4-1BBL, l'expression du CD28 est fortement diminuée pour la majorité des donneurs ( $35,3 \pm 8,8\%$  à pour le HLA seul et  $30,4 \pm 7,3\%$  pour le HLA/4-1BBL;  $p < 0,01$ , post test de Dunnett). La différence d'expression entre les conditions CD28 et 4-1BBL est également confirmé statistiquement par un test ANOVA

suivi d'un post-test de Bonferroni;  $p < 0,01$ .

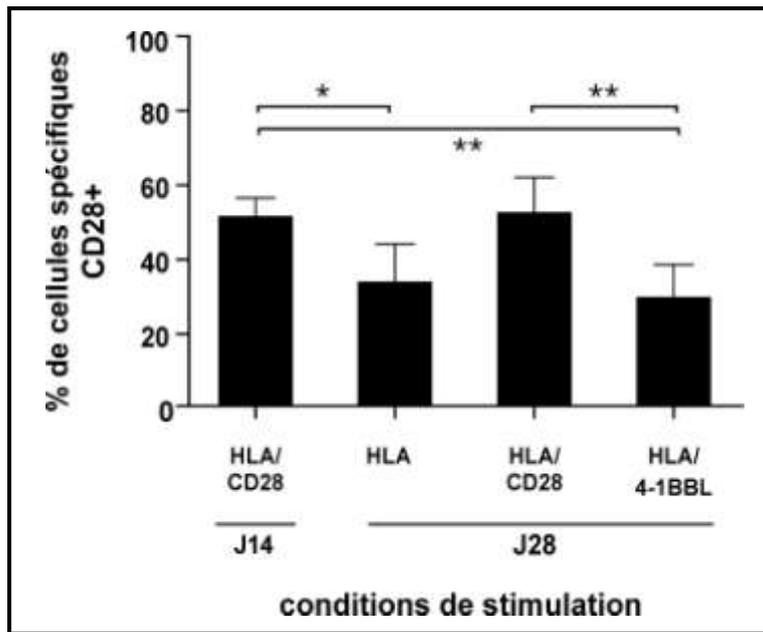


Figure 45 : Evolution du CD28 entre J14 et J28 chez les donneurs sains

Évolution du pourcentage de cellules CD28+ parmi les lymphocytes spécifiques entre J14 et J28 dans les trois conditions de stimulations. Chaque condition à J28 a été comparée à la condition J14 par un test Anova suivi d'un post-test de Dunnett ; les trois conditions à J28 ont été comparées par un test Anova suivi d'un post-test de Bonferroni. □ :  $p < 0,05$ , □□ :  $p < 0,01$ .

Nous avons émis l'hypothèse que le 4-1BBL pouvait prendre le relais à la co-stimulation CD28, une fois celui-ci perdu en culture, pour favoriser la prolifération des cellules CD28-. Nous montrons une forte diminution de l'expression du CD28 dans les populations stimulées par les billes HLA/4-1BBL, mais ce phénotype est aussi retrouvé lorsque le HLA seul est utilisé, ainsi nous ne pouvons pas exclure qu'il puisse s'agir d'un effet indirect dû à l'absence de co-stimulation des cellules CD28+ par le CD28. Cependant, la co-stimulation par le 4-1BBL, génère, à la différence de la seule stimulation HLA, une expansion du nombre de cellules spécifiques. Ainsi nous pourrions imaginer que le 4-1BBL pourrait avoir un effet direct différent dépendant du stade de différenciation des cellules : délétère sur les cellules CD28+ et bénéfique sur les cellules CD28-.

Afin d'étayer cette hypothèse, nous avons suivi l'évolution du nombre absolu de cellules spécifiques CD28+ entre J14 et J28 selon la co-stimulation utilisée. L'analyse des taux d'amplification des sous-populations CD28+ et CD28-, représentés par la Figure 46, nous montrent que l'amplification induite par les billes HLA/CD28 intéresse de manière

équivalente les cellules CD28- et CD28+. En revanche, si le nombre de cellules CD28+ demeure identique avant et après la co-stimulation 4-1BBL, cette stabilité est contrebalancé par une amplification préférentielle des cellules CD28- par rapport aux cellules CD28+ (confirmé statistiquement par un test Anova suivi d'un post-test de Bonferroni ;  $p < 0,01$ )

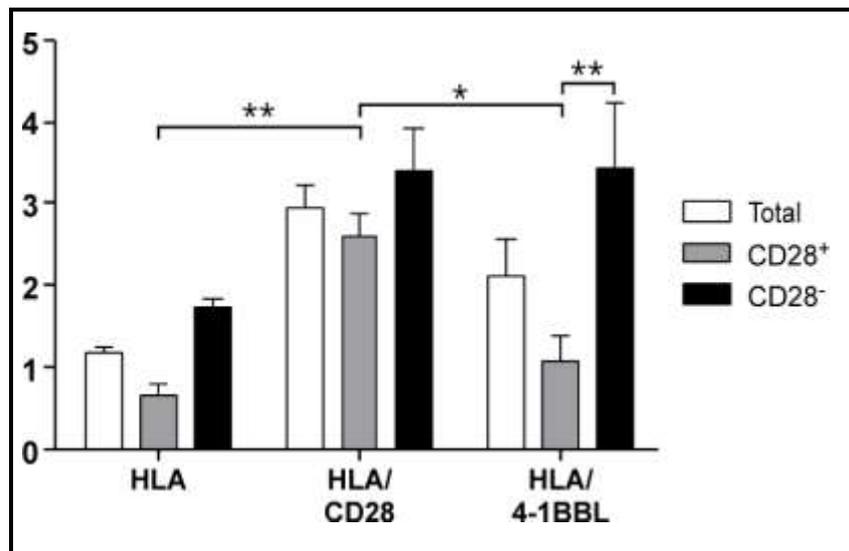


Figure 46 : taux d'amplification chez les donneurs sains  
 Bilan des taux d'amplification obtenu avant et après la seconde amplification. Pour chaque condition les taux d'amplification des cellules spécifiques totales, CD28+ et CD28- ont été calculés. Analyse statistique effectuée par Anova suivi d'un post-test de Bonferroni. □ :  $p < 0,05$ , ■ :  $p < 0,01$ .

### **Commentaires - conclusion**

Les lymphocytes T CD28+ sont une population hétérogène constituée essentiellement de cellules naïves. En commençant cette étude, nous avons émis l'hypothèse que le 4-1BBL pouvait prendre le relais à la co-stimulation CD28, une fois celui-ci perdu en culture, pour favoriser la prolifération des cellules CD28-. Des travaux menés dans le laboratoire (Rabu C. 2005) avaient montrés qu'après stimulation, les lymphocytes CD28- exprimaient davantage de 4-1BB que les lymphocytes T CD28+. Les travaux de Bukczynski (Bukczynski et coll. 2003) ont, quant à eux, montré qu'une stimulation CD3 entraînait une expression du 4-1BB sur les CD28+ et CD28-, mais que cette expression était plus lente sur les CD28+. Ainsi nos résultats sont en accord avec la littérature puisque nous montrons que la co-stimulation par le 4-1BBL permet, sur des cellules ayant préalablement rencontré l'antigène, une amplification des cellules CD28- supérieure aux cellules CD28+. En outre nous montrons également que les cellules

CD28-, comme les cellules CD28+, sont amplifiées par les billes HLA/CD28. Aux vues de ces résultats, il est probable que lors de la seconde co-stimulation par le CD28, l'augmentation du nombre de cellules CD28- est due à l'amplification des CD28+ dont une partie perdrait au cours de la culture l'expression du CD28. En revanche, dans la condition HLA/4-1BBL, seule la proportion de cellules CD28- générées à l'issue de la première stimulation, pourrait être amplifiée.

Par la suite nous voulons savoir si cet effet du 4-1 BBL est aussi retrouvé lors de l'amplification de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A de malades atteints de mélanome.

## **Malades**

Chez le donneur sain, nous avons montré que lors de la première co-stimulation, le 4-1BBL, à la différence du CD28, ne permet pas l'amplification des lymphocytes spécifiques de Melan-A. En revanche lors de la seconde stimulation, le 4-1BBL favorise l'expansion des cellules CD28-, alors que la co-stimulation CD28 permet une amplification équivalente des CD28+ et CD28-. Dans le présent chapitre, nous nous intéressons à l'amplification de lymphocytes T CD8+ spécifiques de Melan-A de malades atteints de mélanome. Dans ce contexte, il nous a paru important d'étudier l'effet du 4-1BBL dès la première stimulation. En effet, chez les patients, nous nous attendons à rencontrer des cellules ayant déjà eu un contact antigénique, et par conséquent plus différenciées. De plus, la fréquence des cellules spécifiques de Melan-A devrait être supérieure au donneur sain, et faciliter ainsi l'étude phénotypique dès J0.

### **Description des cellules à J0**

Pour notre étude, nous avons recruté des malades présentant uniquement des mélanomes de stade IV, sans critères de réponses aux différents traitements conventionnels, mais n'ayant reçu ni produits de thérapie cellulaire, ni vaccination.

Les lymphocytes T CD8+ ont été isolés comme décrit précédemment puis analysé en cytométrie de flux à l'aide des anticorps anti-CD8, anti-CD28 et tétramère HLA-A\*0201-ELA. À l'issue du tri, les populations de lymphocytes T CD8+ étaient pures à 93,86%±2,44 (minimum : 77%, maximum : 99%) (cf. Tableau 10 et Figure 47).

La fréquence moyenne des lymphocytes T CD8+ anti-Melan-A sur les 7 donneurs testés est de 0,63 ± 0,15%. Cette valeur contraste avec les fréquences publiées, généralement

comprises suivant les études, entre 0,07% ± 0,06 et 0,26% ± 0,45 des CD8 totaux (Mackensen et coll. 2006 ; Pittet et coll. 1999). Néanmoins, certaines équipes ont mis en évidence des fréquences de cellules spécifiques supérieures, atteignant parfois plusieurs pourcents (Meidenbauer et coll. 2004 ; Maczek et coll. 2005).

En nous intéressant aux lymphocytes de malade nous avons émis l'hypothèse que les cellules étaient déjà entrées, in vivo, en contact avec l'antigène. Nous nous sommes donc intéressés au phénotype CD28 des cellules spécifiques dès J0. Nous montrons que 56% des cellules expriment le CD28, ce qui signifie que près de 50% des cellules spécifiques ont déjà rencontré l'antigène in vivo et sont devenues CD28-(cf. Tableau 10).

Patients	Pureté CD8 <sup>+</sup> (%)	%CD8 <sup>+</sup> /Tétramère <sup>+</sup>	% CD28 <sup>+</sup>
ALC	94	0,4	50
BEN	99	1,16	19,9
GUE	97	0,5	75
MET	99	0,2	75
LOU	77	1,12	48,2
VEQ	95	0,44	45,5
JAF	99	1,1	73,4
Moyenne ± SEM	<b>93,86 ± 3%</b>	<b>0,63 ± 0,15%</b>	<b>56,31 ± 9,21%</b>

Tableau 10 : Caractérisations des cellules de patients à J0  
 Caractérisations des cellules de patients à J0 après un triple marquage CD8-FITC/Tétramère-ELA-PE/CD28-APC. Evaluation du pourcentage de pureté en lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, de la fréquence en précurseurs spécifiques de Melan-A parmi les CD8<sup>+</sup>, ainsi que du pourcentage de CD28<sup>+</sup> parmi les cellules spécifiques.

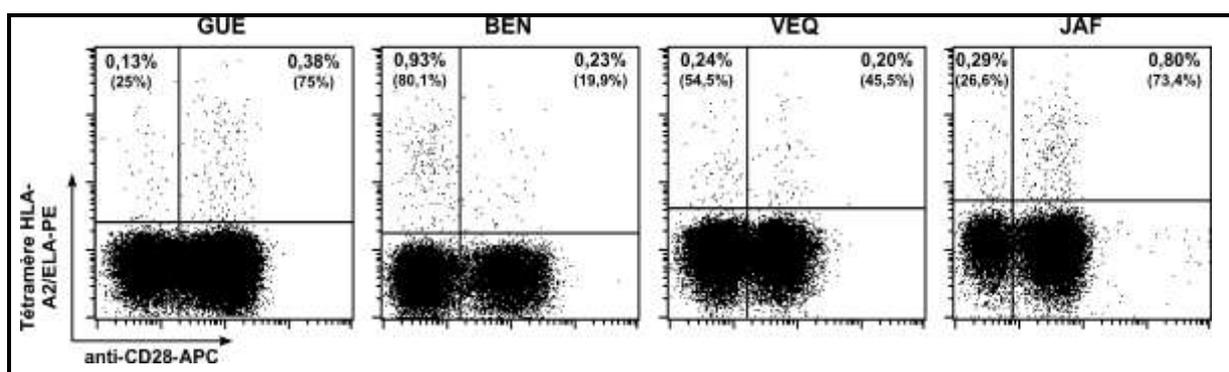


Figure 47 : Caractérisations des cellules de patients à J0  
 Analyse en cytométrie de flux des populations triées CD8 à partir de PBMC de malades. Les pourcentages indiquent la fréquence des cellules spécifiques de Melan-A parmi les lymphocytes T CD8 totaux. Les pourcentages entre parenthèse correspondent à répartition des cellules spécifiques en fonction de leur phénotype CD28. Exemple de quatre malades représentatifs.

## Comparaison des stimulations HLA, HLA/CD28, HLA/4-1BBL

### Amplifications obtenues

La forte proportion de cellules spécifiques ayant perdu l'expression du CD28 indique un état de différenciation avancée, nous avons voulu savoir si ces cellules étaient capables de répondre, dès la première stimulation, au 4-1BBL. Nous avons donc voulu étudier dès J0, leurs réponses aux trois types de stimuli: HLA, HLA/CD28 et HLA/4-1BBL.

Pour amplifier les cellules spécifiques la stimulation HLA/CD28 reste la plus efficace (HLA/CD28 vs J0,  $p < 0,01$ , ANOVA suivi d'un post test de Friedman)(Cf. *Tableau 11 et Figure 48*). En revanche, à la différence des donneurs sains, la co-stimulation 4-1BBL permet, chez tous les patients, une amplification plus importante que la stimulation HLA seule, cependant du fait de la grande variabilité inter-individuelle et du faible nombre de malades étudiés, cette différence n'est pas statistiquement significative.

Donneurs	J0	HLA	HLA/28	HLA/4-1BBL
ALC	150	220	5457	1665
BEN	11600	29700	308360	48109,6
GUE	5000	31256	433000	82000
MET	1400	9196	65116	14124
LOU	1012	3360	6258	5612
VEQ	4400	4362	79032	4352
JAF	10900	17947	146523	45084
Moyenne± SEM	<b>5 259 ± 1 672</b>	<b>13 385±4 956</b>	<b>149 106± 61 522</b>	<b>28 707 ± 11 501</b>

*Tableau 11 : nombre de cellules spécifiques obtenues chez les malades*

*Nombres absolus de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A à J0 puis après 14 jours d'amplification par les billes HLA, HLA/CD28 ou HLA/4-1BBL.*

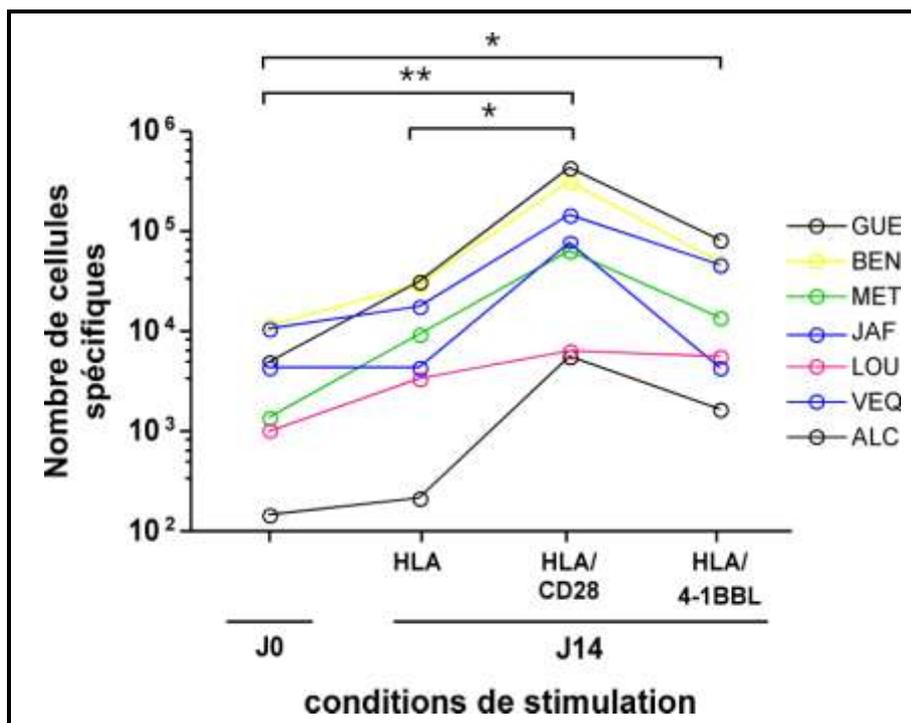


Figure 48 : Evolution du nombre de cellules spécifiques chez les malades nombre de cellules spécifiques dans la population de départ à J0 puis après 14j jours de culture avec les billes HLA-A\*0201 seules ou associées à une co-stimulation CD28 ou 4-1BBL. Analyse statistique par Anova suivi d'un post-test de Friedman; □ :  $p < 0,05$ ; □□ :  $p < 0,01$ .

#### Evolution du statut CD28 à J14

Comme pour les donneurs sains, nous nous sommes intéressés au statut CD28 des cellules générées. Les lymphocytes spécifiques générés par les billes HLA/CD28 sont majoritairement CD28<sup>+</sup> pour les 4 malades testées (moyenne  $69,7 \pm 7,3\%$ ) (cf. Figure 49 et Figure 50), alors que dans les conditions HLA et HLA/4-1BBL, les cellules CD28<sup>+</sup> représentent respectivement  $52,9 \pm 8,3\%$  et  $48,5 \pm 7,2\%$  des lymphocytes spécifiques.

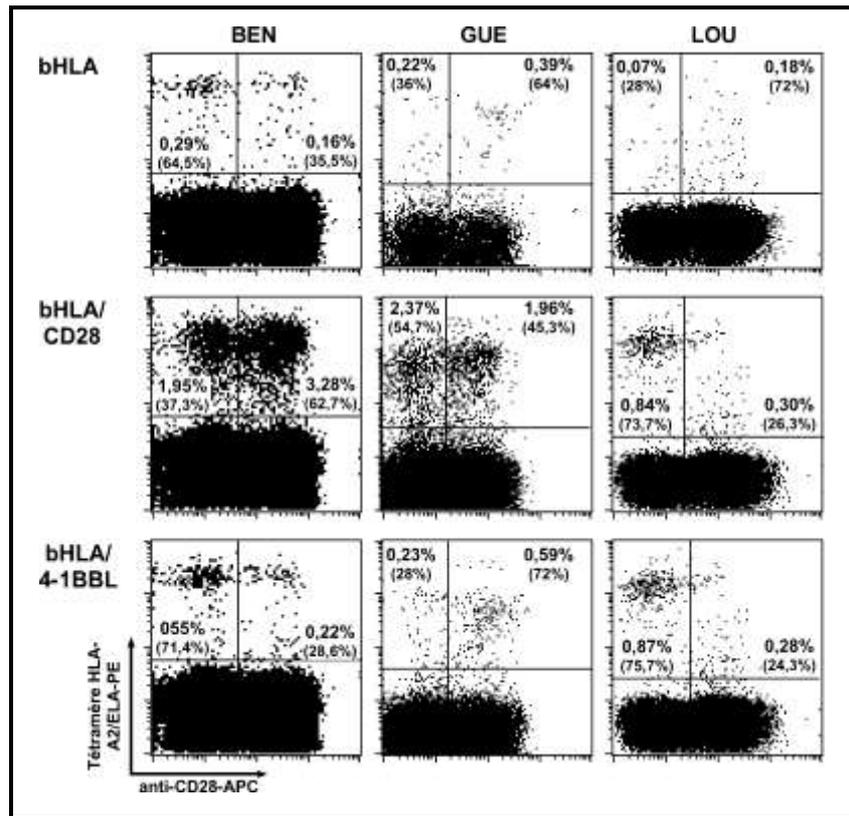


Figure 49 : Evolution du CD28 chez les patients

Analyse, en cytométrie de flux, du marqueur CD28 des cellules spécifiques 14 jours après une première stimulation des cellules par les billes HLA, HLA/CD28 ou HLA/4-1BBL. Les pourcentages indiquent la fréquence des cellules spécifiques de Melan-A parmi les lymphocytes T CD8 totaux. Les pourcentages entre parenthèse correspondent à répartition des cellules spécifiques en fonction de leur phénotype CD28. Exemple de trois malades représentatifs.

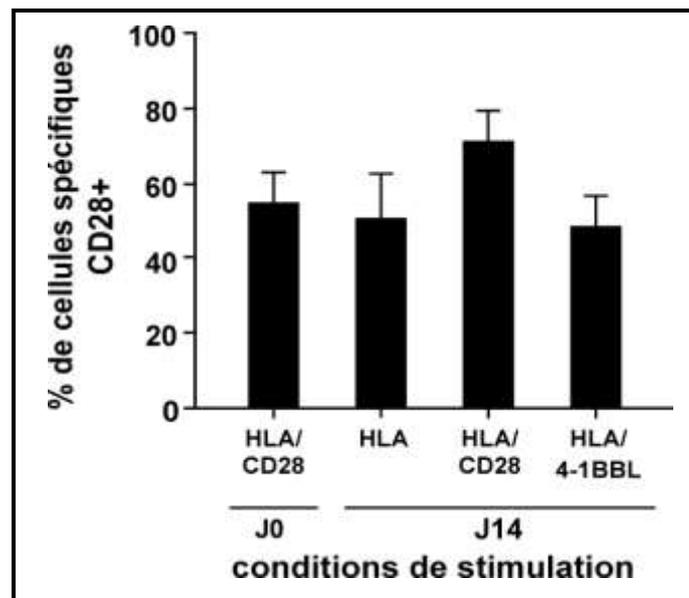


Figure 50 : Evolution du CD28 chez les malades

Pourcentage de lymphocytes T CD8+ spécifiques exprimant le CD28 à J0 puis après stimulation par les billes HLA, HLA/CD28 et HLA/4-1BBL. (n=5).

La co-stimulation 4-1BBL générant un nombre de cellules plus important que la seule stimulation HLA, nous avons suivi l'évolution du nombre de cellules selon leur phénotype. La Figure 51 représente les taux d'amplification des cellules spécifiques en fonction de l'expression du CD28. Nous observons que la co-stimulation 4-1BBL entraîne une amplification plus importante des cellules CD28- (8,5) alors que la co-stimulation par l'anticorps anti-CD28 amplifie davantage les CD28+ (45,3 vs 13), nous notons également une amplification non négligeable des lymphocytes spécifiques CD28+ avec le 4-1BBL (6,5). Cependant, le faible nombre de patients analysés ne nous permet pas de valider statistiquement ces résultats.

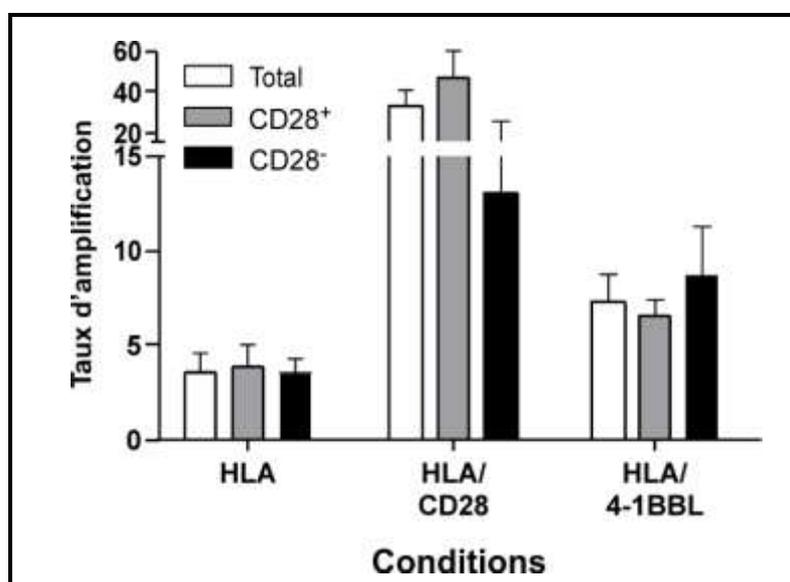


Figure 51 : taux d'amplification obtenus chez les patients  
Bilan des taux d'amplification obtenu après la première stimulation. Pour chaque condition les taux d'amplification des cellules spécifiques totales, CD28+ et CD28- ont été calculées (n=5).

Ainsi lors de cette première stimulation chez les malades, la condition HLA/CD28 reste la plus efficace pour amplifier les cellules spécifiques, la majorité des cellules étant CD28+, ces résultats sont cohérents avec les capacités prolifératives supérieures des CD28+ décrites dans la littérature (Appay et coll. 2002). Cependant, chez les malades, à la différence des donneurs sains, la co-stimulation par le 4-1BBL permet une amplification importante des lymphocytes dès la première stimulation, qui intéresse les cellules CD28- et à un moindre niveau les cellules CD28+.

### Autres marqueurs phénotypiques

L'expression différentielle des récepteurs membranaires CD27 et CD28 permet de distinguer les lymphocytes naïfs (CD27+CD28+), les mémoires centraux (CD27+CD28-) et les effecteurs mémoires (CD27-CD28-) (Appay et coll. 2002). Afin de mieux caractériser les populations que nous obtenons, nous avons effectué, sur les cellules générées par nos trois conditions de stimulation, un triple marquage tétramère-HLA, CD28 et CD27. Prise isolément, l'expression du CD27 semble être influencée différemment selon les signaux de co-stimulation. Sur les 3 patients testés après la première amplification, les cellules spécifiques amplifiées par la co-stimulation CD28 sont à plus de 81% CD27+ alors qu'avec la co-stimulation 4-1BBL seul 61% des cellules spécifiques sont CD27+ (cf Tableau 12). Cette perte d'expression du CD27 indique un état de différenciation plus avancé, cette différence est statistiquement significative ( $p < 0,05$ ). (Cf. Figure 52).

Patients	HLA	HLA/28	HLA/4-1BBL
GUE	85.4	95.6	64.1
MET	86.6	94.8	78.2
LOU S	45.3	54.1	43.2
Moyenne $\pm$ SEM	<b>72,4 <math>\pm</math> 13,6</b>	<b>81,5 <math>\pm</math> 13,7</b>	<b>61,8 <math>\pm</math> 10,2</b>

Tableau 12 : Expression du CD27 chez les patients

Pourcentage d'expression du CD27 par les lymphocytes T CD8+ spécifiques de Melan-A 14 jours après stimulation.

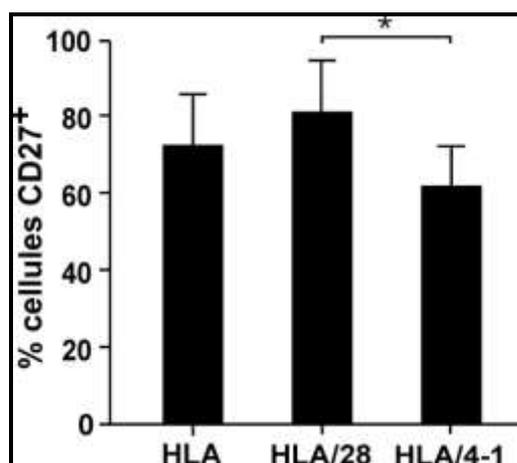


Figure 52 : Expression du CD27 chez les patients

Pourcentage de cellules spécifiques exprimant le marqueur CD27 à l'issue d'une stimulation avec les trois types de billes. Analyse effectuée à J14. Test Anova suivi d'un post-test de Friedman,  $n=3$ ,  $\square$  :  $p < 0,05$

L'analyse des populations spécifiques en double marquage CD27/CD28, révèle 14,6% des cellules issues de la condition HLA/4-1BBL sont CD27-CD28-, alors que seulement 2,5% de ces cellules sont retrouvées dans la condition HLA/CD28. Nous confirmons donc qu'un pourcentage plus élevé de cellules présentant un phénotype mémoire apparaissent suite à une co-stimulation 4-1BBL (Cf. Figure 53 et Figure 54).

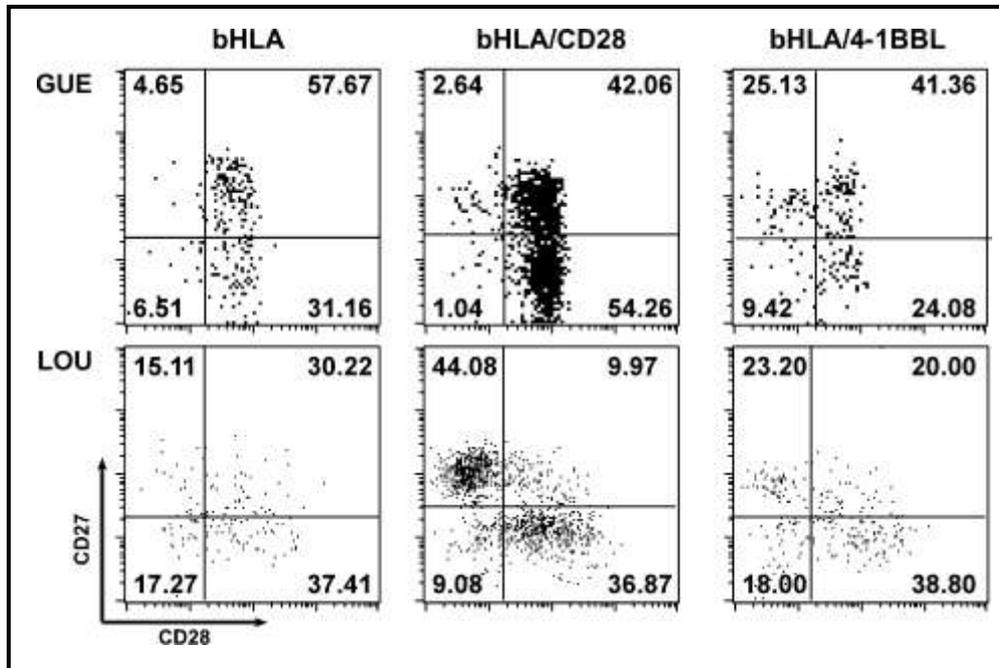


Figure 53 : expression du CD27 et du CD28 chez les patients

Analyse en cytométrie de flux de l'expression des marqueurs CD27 et CD28 sur les cellules spécifiques de Melan-A 14 jours après une première stimulation par des billes HLA, HLA/CD28 ou HLA/4-1BBL. Triple marquage tétramère-PE/CD27-FITC-CD28-APC. . Exemple de marquage sur les lymphocytes T CD8 de deux malades représentatifs après sélection des cellules marquées par tétramère Melan-A. Les pourcentages sont indiqués dans le cadran correspondant.

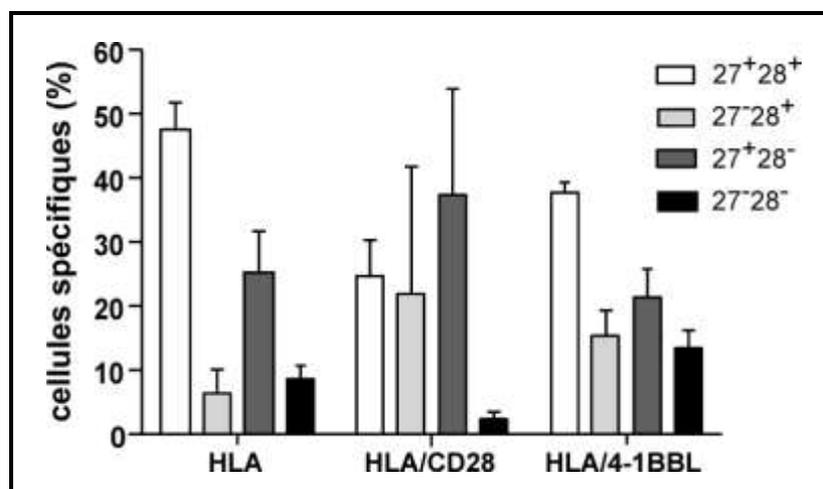


Figure 54 : analyse phénotypiques des cellules spécifiques

*Pourcentage des différentes population de lymphocytes T CD8+ spécifiques CD27+CD28+, CD27-CD28+, CD27+CD28-, CD27-CD28-. Analyses effectuées 14 jours après stimulation. n=3.*

Les cellules CD27-CD28+ sont une population assez peu décrite, 2 hypothèses peuvent expliquer leur présence. Ces cellules pourraient être issues de cellules CD27+CD28+ qui perdraient transitoirement le CD27 pendant leur expansion clonale (Romero et coll. 2007).

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## Tri immunomagnétique

Chez les patients atteints de mélanomes métastatiques, les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'antigènes de tumeurs sont présents *in vivo* et sont potentiellement fonctionnels puisqu'ils peuvent être activés *in vitro*. Or, si des régressions partielles sont fréquemment décrites, ces lymphocytes n'induisent que très exceptionnellement des régressions tumorales complètes (Emanuel et coll. 2008). On peut donc supposer que l'absence de réponse adaptative anti-tumorale peut être due à un défaut d'activation *in vivo* ou à un contexte tumoral supprimeur. De fait, les immunothérapies active et passive sont basées sur l'activation de lymphocytes T spécifiques d'antigènes de tumeurs.

Les essais dans lesquels l'immunothérapie active s'est montrée efficace concernent certains cancers lymphoïdes traités par cellules dendritiques (Timmerman et coll. 2002). Pour ces cancers hématologiques, ce succès est probablement dû à l'accès facilité aux cellules tumorales ainsi qu'à l'expression, par ces cellules, de molécules de co-stimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes, ce qui n'est pas le cas dans les tumeurs solides. Un des avantages du transfert adoptif est qu'il permet l'injection de cellules correctement activées *ex vivo*, présentant les caractéristiques fonctionnelles optimales nécessaires à l'éradication de la tumeur.

En outre, des recherches récentes ont montré l'importance des mécanismes supprimeurs, émanant à la fois des cellules tumorales mais également du système immunitaire. L'effet le plus important semble être médié par les lymphocytes T CD4+CD25+ qui ont la capacité de supprimer la prolifération et la cytotoxicité (sécrétion INF- $\gamma$ ,) des cellules anti-tumorales (Shimizu et coll. 1999; Mempel et coll. 2006; Chaput et coll. 2007)(Chaput et coll. 2007). Ainsi, une étude récente a mis en évidence, chez des patients atteints de mélanome, la présence de lymphocytes T régulateurs spécifiques de l'antigène NY-ESO-1 (Vence et coll. 2007). Un avantage majeur du transfert adoptif repose sur la possibilité d'éliminer ces cellules. Il est en effet possible de les supprimer des cultures cellulaires mais également chez le patient, en induisant une lymphodéplétion non ablative par chimio- ou radiothérapie avant le transfert adoptif. Or, dans le cadre des vaccinations thérapeutiques, ces traitements ne peuvent être utilisés, au

risque d'éliminer aussi toutes les cellules effectrices.

Ces raisons peuvent expliquer qu'à l'heure actuelle, les approches de vaccination thérapeutique donnent des taux de réponse très faibles (<5%), bien que certaines études aient mis en évidence des taux de lymphocytes T CD8 spécifiques très fortement augmentés.

L'immunothérapie adoptive est, quant à elle, plus lourde à mettre en œuvre, et les équipes développant ces approches sont par conséquent moins nombreuses. Cependant, progressivement, les améliorations apportées ont permis d'obtenir des taux de réponse très encourageants. Si les premiers essais basés sur l'injection de LAK n'ont donné aucun résultat, l'injection de TIL a permis d'obtenir des réponses chez près de 50% de patients. Ces résultats ont depuis été confirmés par plusieurs autres études. A contrario, l'injection de clones spécifiques n'a pas, pour le moment, fait la preuve de son efficacité, alors que les cellules générées *ex vivo* sécrétaient de l'INF- $\gamma$  et étaient cytotoxiques vis-à-vis de la lignée tumorale autologue (Dudley et coll. 2001).

On arrive ainsi au paradoxe suivant : l'incapacité des protocoles de vaccination à induire des régressions thérapeutiques alors qu'ils augmentent fortement la fréquence des précurseurs spécifiques de tumeur et la difficulté de certaines approches d'immunothérapie adoptive à entraîner des régressions tumorales alors que les cellules générées *ex vivo* sont très cytotoxiques.

L'efficacité clinique de l'immunothérapie par transfert de lymphocytes T dépend de la présence de cellules spécifiques d'antigènes parmi les populations injectées. De nombreux systèmes d'amplification des lymphocytes T à usage thérapeutique sont développés : certaines méthodes amplifient l'ensemble des cellules, d'autres n'amplifient que les lymphocytes T spécifiques d'un antigène donné.

Partant du postulat que tous les antigènes reconnus ne sont pas caractérisés, une stratégie consiste à amplifier l'ensemble de la population contenant vraisemblablement des cellules d'intérêt. Ainsi, les méthodes qui utilisent l'anticorps anti-CD3 ou des lectines (comme la PHA) fournissent un signal d'activation et de prolifération à l'ensemble des cellules. En réalité, il s'avère que ces méthodes aboutissent parfois à la perte des lymphocytes d'intérêt. Ce point a été documenté dans le contexte viral, par Sauce *et al.* qui montrent que la stimulation de PBMC par de l'anti-CD3 aboutit à une perte préférentielle des cellules anti-EBV, qui sont plus sensibles à l'apoptose (Sauce et

coll. 2002). Une étude dans le contexte tumoral a montré que la reconnaissance de la lignée autologue par des TIL amplifiés par de la PHA (lectine) était maintenue, bien que la fréquence des cellules répondeuses ait été diminuée (Pandolfino et coll. 2001). Ainsi, les stratégies d'enrichissement des populations en effecteurs d'intérêt semblent préférables. Une approche séduisante consiste à trier les populations sur la base de leur réactivité avant de les amplifier, sans préjuger des épitopes antigéniques concernés. Par exemple Wolfl et coll ont montré qu'il était possible de trier les lymphocytes T qui expriment le 4-1BB à leur surface en réponse à une stimulation par une lignée tumorale (Wolfl et coll. 2007). Une autre approche consiste à sélectionner les lymphocytes sécrétant de l'interféron en réponse à une stimulation par une lignée tumorale (Bissinger et coll. 2002). Néanmoins, quelle que soit la méthode d'amplification envisagée, l'identification des spécificités antigéniques contenues dans les populations, même si elle n'est pas obligatoire pour la thérapie, répond à des exigences rationnelles (Labarriere et coll. 1998; Labarrière et coll. 2002). De plus, indépendamment de la perte des cellules spécifiques mentionnées plus haut, ces méthodes non spécifiques biaisent le répertoire en amplifiant préférentiellement les lymphocytes T dirigés contre les épitopes immuno-dominants (c'est-à-dire la détection préférentielle d'un ou plusieurs épitopes parmi de nombreux exprimés sur une cible donnée). Il semble en effet, que les réponses immuno-dominantes détournent le système immunitaire des cellules tumorales variantes. En effet, les cellules ayant perdu l'expression de l'épitope immuno-dominant, permettent à la tumeur d'échapper au système immunitaire (Schreiber et coll. 2002).

Une autre démarche consiste à cibler un épitope antigénique donné, et à amplifier uniquement les lymphocytes dirigés contre ce complexe HLA/peptide. C'est dans cette optique que nous avons choisi d'optimiser une technique de tri de lymphocytes spécifiques. Dans ce cas, la question cruciale est de déterminer quel antigène choisir. Jusqu'à présent, dans le contexte anti-tumoral, les antigènes choisis sont d'une part ceux qui sont exprimés par la plus grande proportion d'individus à traiter et d'autre part ceux pour lesquels une fréquence élevée de lymphocytes spécifiques est observée parmi les lymphocytes T infiltrant la tumeur. Des éléments suggèrent que les lymphocytes anti-Melan-A/MART-1 ou anti-gp100 présentent un intérêt clinique, car ils sont retrouvés préférentiellement parmi les TIL injectés à des patients qui répondent au traitement (Benlalam et coll. 2007).

Dans notre étude, nous avons évalué l'efficacité d'une nouvelle technique de tri permettant de sélectionner les lymphocytes T spécifiques d'un complexe CMH/peptide donnée. Chaque élément pouvant être produit selon les bonnes pratiques de fabrication, cette technique est utilisable en médecine humaine. Nous avons modifié une technique de tri faisant intervenir des billes magnétiques M280 recouvertes d'une molécule potentiellement très immunogène : la streptavidine. La streptavidine, fixée de manière covalente sur les billes, permettait d'immobiliser des monomères CMH/peptide biotinylés. Nous avons remplacé cet intermédiaire par un anticorps monoclonal dirigé contre la séquence de biotinylation AviTag. Cet anticorps, fixé de manière covalente sur des billes magnétiques M450-epoxy, est capable d'immobiliser fortement des complexes CMH /peptide portant l'épitope.

Nous avons montré que les billes ainsi produites ne permettaient pas de fixer une quantité de complexe CMH/peptide aussi importante que les billes à base de streptavidine. Trois raisons peuvent expliquer cette différence. Premièrement, bien que l'affinité de l'anticorps AvT-6A8 pour la séquence AviTag soit bonne ( $K_d=6 \times 10^{-9}M$ ), elle est nettement inférieure à celle de la streptavidine pour la biotine ( $K_d = 10^{-13}M$ ). Le second facteur est lié à la méthode de fixation de l'anticorps sur les billes. En effet la liaison covalente se fait entre les groupements époxy libres de la bille et les amines primaires de l'anticorps. Ce couplage se faisant au hasard il n'est possible ni de prédire ni d'influer la fixation de l'anticorps. Une troisième raison pourrait être due à la différence de valence entre la streptavidine et l'anticorps. En effet, la streptavidine possède 4 sites de liaison à la biotine et un anticorps ne possède que 2 paratopes capables d'interagir avec l'épitope. Il paraît évident que la streptavidine couplée sur les billes ne dispose pas de ses 4 sites libres, puisque au minimum 1, et vraisemblablement 2, sont rendus inaccessibles par la bille. Ainsi il resterait au minimum 2 sites de liaison libres à la streptavidine pour fixer les monomères. En ce qui concerne l'anticorps, la proportion capable de fixer 2 monomères est certainement très réduite. Ainsi à cause de la configuration de la liaison aux billes, de la moindre affinité de l'anticorps et du nombre de valences disponibles, la quantité de monomères à la surface des billes M450-AvT est environ 10 fois inférieure à celle des billes M280 (cf. Figure 55).

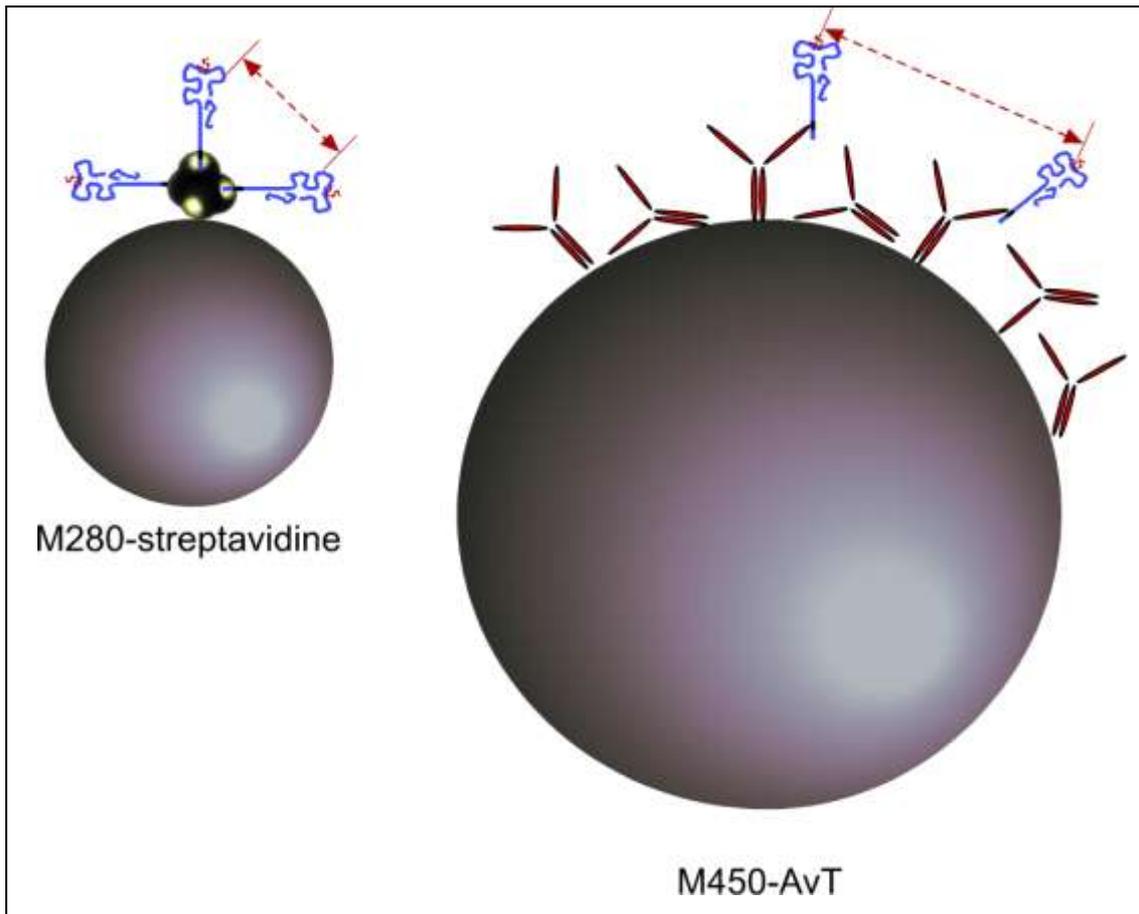


Figure 55 : Fixation des monomères sur les billes M450-AvT et M280

De fait des questions concernant l'efficacité de ces nouveaux multimères et les caractéristiques de cellules éventuellement triées se posaient.

Malgré ce handicap, les billes M450-AvT sont au moins aussi efficaces que les billes M280s. Nous montrons que des populations de départ, même très pauvres en cellules spécifiques de Melan-A (0,24% pour le patient 2), nous permettent d'obtenir après un cycle de tri/amplification des puretés supérieures à 95%. Par ailleurs nous ne notons aucune différence en termes de répertoire, quelle que soit la technique de tri.

L'autre question que nous nous posions concernait les caractéristiques fonctionnelles des cellules triées. En effet, certaines publications ont décrit que les complexes CMH peptide recombinants mutés sur la chaîne  $\alpha 3$  (mutation diminuant la dépendance du CMH peptide recombinant pour le CD8, ce qui est le cas du CMH que nous utilisons) sélectionnaient préférentiellement des lymphocytes ayant une forte avidité (Pittet et coll. 2003). Or, nous montrons que les populations obtenues présentent de grandes disparités d'avidité (EC50 allant 0,007 à 400nM), et de fait, ce paramètre ne

semble pas conditionner la sélection des cellules.

Un autre élément majeur de ce travail concerne l'apoptose induite par les multimères. Plusieurs équipes ont documenté une augmentation de la mortalité cellulaire due à l'interaction entre multimères de classe I et lymphocytes T CD8 (Bodinier 2001; Guillaume et coll. 2003; Cebecauer et coll. 2005).

Nous montrons que les billes M280<sub>s</sub>, contrairement billes M450-AvT, induisent une apoptose massive pouvant entraîner la mort de plus de 60% des cellules en 6h, atteignant plus de 80% en 24h. Les mécanismes impliqués sont encore discutés. En effet, un premier article mettait en évidence l'implication de la voie Fas/FasL dans les mécanismes de mort cellulaire induits par des multimères CMH/peptide (Guillaume et coll. 2003). Ces résultats confirmaient certains travaux effectués dans le laboratoire (Bodinier 2001). Or dans un second article, la même équipe concluait à la mort par nécrose, en décrivant un mécanisme ne faisant intervenir ni les récepteurs de mort, ni les caspases (Cebecauer et coll. 2005). Dans notre modèle, les marquages annexine-V/iodure de propidium sont en accord avec l'hypothèse de la mort par apoptose. En effet, les cellules qui meurent sont dans un premier temps marquées par l'annexine-V, le marquage intracellulaire par l'iodure de propidium étant plus tardif. La chronologie de ces événements différencie l'apoptose de la nécrose, la nécrose étant caractérisée, entre autres, par la simultanéité de ces 2 marquages (Darzynkiewicz et coll. 1997). Par ailleurs, nous confirmons cette hypothèse en mettant en évidence une augmentation des taux de caspases activatrice 3/7 et de la caspase initiatrice 9. Cependant, l'activation des caspases 9, 3 et 7 peut être initiée par plusieurs mécanismes suite à l'interaction du CMH/peptide avec le TCR. Parmi ces mécanismes, la mort des cellules activées peut être due soit aux récepteurs de mort (AICD), soit aux membres de la famille Bcl-2 (ACAD). Concernant l'AICD, deux voies ont été décrites, dans la première, la caspase 8 joue un rôle majeur, alors que dans la seconde, le rôle prépondérant est tenu par un membre de la famille bcl-2 : Bid. Afin de les différencier, nous avons mesuré les taux de caspase 8 activées, mais n'avons pas pu mettre en évidence de variations significatives, ni avec les différentes billes, ni en utilisant une forme recombinante de TRAIL (données non présentées).

Un élément confortant l'hypothèse de l'AICD est objectivé par les taux d'activation induits par les différents types de billes. En effet, les billes M280<sub>s</sub>, responsables d'un fort taux d'apoptose, sont également à l'origine d'une forte production de cytokines par les

cellules. Inversement les billes M450-AvT induisent très peu d'apoptose et d'activation (cf. Figure 56). Ainsi nous confirmons les résultats de l'équipe de Luescher montrant que l'apoptose induite par les complexes CMH/peptide recombinants corrélait avec l'activation cellulaire (Cebecauer et coll. 2005).

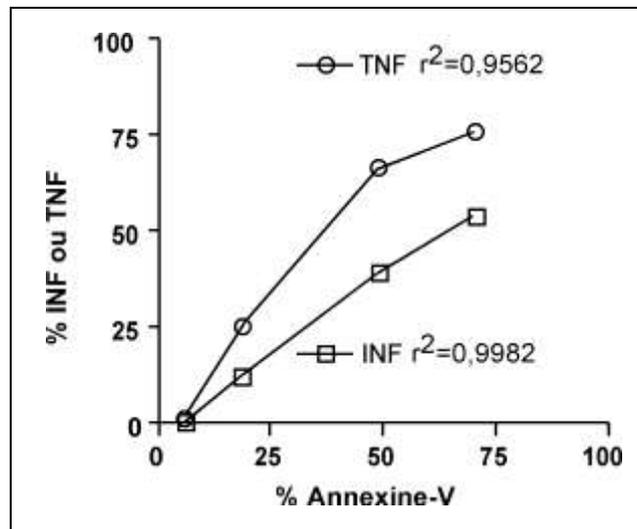


Figure 56 : Corrélation apoptose / activation  
Corrélation entre les marquages annexine-V et la sécrétion de cytokines respectivement par les cellules seules, ou stimulées par les billes M450-AvT, M280<sub>us1</sub> et M280<sub>s</sub>.

Nos résultats suggèrent que 2 paramètres conditionnent les niveaux d'apoptose et d'activation : la quantité et la densité de monomères CMH/peptide à la surface des billes.

Lorsque nous avons commencé à faire varier les quantités de monomères à la surface des billes M280, nous nous attendions à obtenir des taux d'apoptose similaires pour les quantités de monomères identiques. Or les billes M280<sub>us1</sub>, induisent certes moins d'apoptose que les M280 saturées, mais significativement plus que les billes M450-AvT, qui disposent pourtant de la même quantité de monomères (cf. Figure 27). Ceci suggère que l'AICD ne dépend qu'en partie de la quantité de monomères disponibles sur les billes. L'autre paramètre que nous avons étudié concerne la densité de monomères à la surface des billes. En effet, les billes M450 étant 2,5 fois plus grosses que les billes M280 (surfaces respectives de 254,5µm<sup>2</sup> vs. 98,5µm<sup>2</sup>), des quantités égales ne correspondent pas à des densités identiques. Nous avons donc testé des billes M280<sub>us2</sub> pour lesquelles la densité de monomère correspond à celle des billes M450-AvT. Dans ce contexte l'AICD induite est globalement du même ordre de grandeur entre les 2 types de billes.

L'article de Cebecauer et al met en évidence que les phénomènes de mort cellulaire sont liés à la capacité des multimères à interagir avec deux TCR suffisamment proches, au sein d'une même synapse immunologique (Cebecauer et coll. 2005). Ainsi la transduction du signal sera suffisante pour engager une activation et induire en même temps l'AICD.

De fait les différences d'activation et donc d'apoptose obtenues entre les billes M450-AvT et M280 peuvent être expliquées par la distance séparant 2 monomères. Etant donné la quantité de monomères fixés sur les billes M450, il est en effet peu probable que les deux valences d'un même anticorps soient disponibles pour fixer chacune un monomère. En revanche, même pour des densités de monomères extrêmement faibles (M280<sub>us2</sub>), il est vraisemblable qu'une même molécule de streptavidine puisse fixer 2 monomères. Ceci explique que quelle que soit la densité de monomères fixés à leur surface, les billes à base de streptavidine sont capables de présenter 2 complexes CMH /peptide voisins et d'activer ainsi la machinerie cellulaire.

D'autres outils avaient été développés précédemment pour diminuer l'activation et l'apoptose induite. C'est le cas des multimères réversibles (Streptamers) qui peuvent être détachés des cellules, après tri en cytométrie de flux, par compétition avec la biotine (Neudorfer et coll. 2007). Cependant cette technologie implique l'utilisation de streptavidine, dont l'usage chez l'Homme selon la réglementation en vigueur est impossible. Pour ces mêmes raisons, d'autres multimères réversibles ne peuvent être utilisés en clinique (Knabel et coll. 2002). Ainsi, les multimères M450-AvT représentent actuellement la seule technique de tri de lymphocytes T CD8 sur la base de leur spécificité, utilisables en médecine humaine. Cet outil devrait stimuler le développement du transfert de lymphocytes T spécifiques d'antigènes exprimés par les tumeurs.

Un second élément important concerne les conditions de stimulation des PBMC. La plupart des équipes de recherche stimulent à de maintes reprises les lymphocytes en utilisant des cellules présentatrice d'antigènes chargées avec le peptide d'intérêt (Yang et coll. 2002; Labarrière et coll. 2008). Or, certains travaux montrent que des stimulations antigéniques répétées peuvent être à l'origine de la sélection de certains clonotypes (Alexander-Miller et coll. 1996; Zeh et coll. 1999). Dans une étude précédente, nous confirmions cette observation (Labarrière et coll. 2008), c'est pour cette raison que nous avons optimisé les conditions de stimulation des PBMC. En effet

nous montrons qu'une seule stimulation avec du peptide pendant 14 jours permet d'amplifier suffisamment les cellules ciblées afin qu'elles soient triables. C'est à la fois un avantage en termes de temps de culture, mais également un bénéfice pour le maintien de la diversité des cellules.

Dans l'optique de protocoles cliniques, nous montrons qu'il serait possible d'obtenir en un mois, un grand nombre de cellules spécifiques répondant à tous les critères de sécurité exigés pour pouvoir être re-injectées au patient. Ces cellules, obtenues à partir d'un simple prélèvement sanguin ou d'une cytophérèse, ne subiraient qu'un nombre restreint de stimulations *ex vivo* et présenteraient un répertoire étendu capable de lyser efficacement la cible tumorale.

Jusqu'à présent, c'est la protéine Melan-A/MART-1 qui est la plus souvent ciblée dans les protocoles cliniques contre le mélanome. Cet antigène est fréquemment exprimé par les cellules tumorales et un large répertoire T dirigé contre cet antigène existe chez les patients. L'antigène MELOE-1 décrit récemment par notre équipe pourrait être, au même titre que Melan-A, un excellent candidat pour de futurs protocoles d'immunothérapie (Godet et coll. 2008). En effet, l'analyse à posteriori des produits de thérapie cellulaire injectés aux patients inclus dans le protocole TIL (Dréno et coll. 2002), a montré une corrélation entre l'injection de TIL spécifiques de MELOE-1 et les patients en rémission. Une étude précédente avait montré la même corrélation avec la présence de lymphocyte T CD8 spécifiques de Melan-A (Benlalam et coll. 2007). Cependant, les TIL étant par définition des populations poly-spécifiques, les bénéfices attribués à la présence de tel ou tel antigène connu sont par nature relatifs puisqu'un grand nombre de cellules injectées sont dirigées ont des spécificités encore inconnues.

De plus, un risque potentiel des stratégies injectant des populations dirigées contre un seul antigène est de voir la tumeur échapper en perdant son expression, comme cela a déjà été montré suite à certains protocoles de vaccination peptidique (Lee et coll. 1998; Hislop et coll. 2001). C'est entre autres pour cette raison que les seuls essais de transfert adoptif ayant prouvé leur efficacité concernaient l'injection de TIL. Dans cette optique, il sera possible d'amplifier et de trier séparément des lymphocytes dirigés contre des antigènes différents, avant de les ré-injecter aux patients.

Une autre raison importante de l'efficacité des TIL est dûe à la forte proportion de lymphocytes T CD4, la présence de ces cellules étant nécessaire au déroulement optimal

d'une réponse immunitaire anti-tumorale (Knutson et coll. 2005). L'adaptation de notre technique de tri aux monomères de classe II, rend possible, à terme, le tri de population de lymphocytes T CD4 spécifiques de tumeur.

En nous basant sur ces constats, les futures approches d'immunothérapie adoptive devraient permettre l'amplification et la sélection *ex vivo* de populations de spécificités anti-tumorales différentes. Les patients bénéficieront ainsi de l'injection de populations poly-spécifiques, contenant 100% de lymphocytes T CD4 et CD8 anti-tumoraux.

## **Molécules de co-stimulation**

Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes intéressés aux signaux de co-stimulation. Les molécules de co-stimulations représentent le second signal indispensable à l'activation correcte des lymphocytes. Si certaines de leurs fonctions restent à élucider, le 4-1BB et le CD28 jouent un rôle essentiel dans la génération et la maintenance d'un pool de lymphocytes T CD8 mémoires (Bertram et coll. 2002c) ; Pulle et coll. 2006 ; Borowski et coll. 2007). Nous avons plus particulièrement étudié l'importance relative de la co-stimulation 4-1BBL et CD28 dans un modèle de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A.

## **Immobilisation des ligands**

Pour immobiliser les ligands, deux grandes stratégies sont développées : ils peuvent être enchâssés dans une membrane cellulaire (Latouche et coll. 2000) ou artificielle – liposome (Prakken et coll. 2000)) ou immobilisés sur des supports inertes (billes). La fluidité des membranes autorise un mouvement relatif des protéines, ce qui peut représenter un certain intérêt en permettant l'organisation physiologique des ligands en SMAC (*SupraMolecular Activation Cluster*), observée au cours de la formation de la synapse immunologique (Giannoni et coll. 2005). Ce point peut représenter un avantage non négligeable au cours de l'activation primaire des lymphocytes T naïfs, mais les récepteurs d'activation étant déjà organisés à la surface des lymphocytes T mémoires (Watson et coll. 2004) il est vraisemblable qu'il ne soit pas crucial dans ce cadre. L'utilisation de lignées transfectées avec les ligands d'activation permet de ne pas se heurter aux techniques empiriques de renaturation des protéines recombinantes, qui peuvent être longues à aboutir. Néanmoins, elle impose d'établir des lignées stables pour chaque nouveau ligand que l'on veut utiliser, ce qui peut être long et fastidieux, en

particulier si l'on souhaite s'intéresser à différents complexes CMH-peptide. En cela, la stratégie adoptée par Maus *et al.* qui a consisté à transfecter une lignée par le CD32 (récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines) est intéressante, puisqu'elle permet « d'habiller » la lignée présentatrice à façon (Maus et coll. 2002). Nous avons choisi d'immobiliser nos supports sur des billes magnétiques, qui présentent l'avantage d'être simples d'utilisation. Elles fournissent les signaux d'activation de manière reproductible et nous avons montré que la calibration de ces billes permet ensuite de choisir avec précision la stoechiométrie signal1/signal2 désirée. Elles sont isolables sur un aimant, de par leur caractère magnétique. Ainsi, il est possible de les enlever des cultures à n'importe quel moment, permettant par exemple de limiter la durée de la stimulation antigénique. Ce support d'immobilisation est également utilisé par d'autres équipes (Oelke et coll. 2003), mais il en existe d'autres, comme les billes en latex (Tham et coll. 2001) ou en polystyrène (Rudolf et coll. 2008). Dans notre modèle nous avons choisi le rapport signal 1/signal 2 à 50/50. Lorsque nous avons commencé cette étude nous n'avions pas d'éléments nous permettant de préjuger du rapport stoechiométrique idéal et le but de notre étude était d'évaluer l'importance relative des co-stimulations CD28 et 4-1BB ligand séparément.

### **Cytokines utilisées**

Lors de la première stimulation, nous avons ajouté de l'IL-15, car nous avons montré que cette cytokine favorise l'expression du 4-1BB par les lymphocytes T CD8 purifiés stimulés. Néanmoins, l'IL-2 que nous ajoutons après trois jours de culture semble être un facteur indispensable pour la prolifération spécifique. Une étude précédente réalisée dans le laboratoire a montré que les cellules cultivées pendant les 14 jours en présence d'IL-15 proliféraient moins bien qu'avec de l'IL-2. Cependant, il est clairement établi que l'IL2 a un rôle pro-apoptotique favorisant l'AICD durant la phase de contraction (Refaeli et coll. 1998). De fait, nous avons constaté qu'au-delà de 20 jours, le pourcentage de cellules spécifiques diminue (non présenté). Ainsi, il serait intéressant d'étudier si la substitution progressive de l'IL-2 par de l'IL-7 au cours des 14 jours, favorise la survie à plus long terme des cellules spécifiques (Kaech et coll. 2003; Bengsch et coll. 2007).

## **Modèle étudié lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A**

De nombreux éléments suggèrent que les lymphocytes anti-Melan-A présentent un intérêt clinique, puisqu'ils sont retrouvés préférentiellement parmi les TIL injectés aux patients qui répondent au traitement (Dréno et coll. 2002; Labarrière et coll. 2002).

Pour notre étude, de par leur fréquence relativement élevée dans le sang, les lymphocytes T CD8 anti-Melan-A représentent un très bon modèle. En effet, chez une proportion non négligeable d'individus sains (70% environ), des lymphocytes T CD8 dirigés contre Melan-A/MART-1 sont présents dans le sang périphérique de façon spontanée. Chez les individus atteints de mélanome, la présence de lymphocytes T spécifiques d'antigène de tumeurs a été documentée dans de nombreuses études (Lee et coll. 1998; Pittet et coll. 2001; Labarrière et coll. 2008).

### Fréquence

Dans cette étude, nous avons étudié l'effet de la stimulation CD28 ou 4-1BB ligand sur des lymphocytes T spécifiques l'épitope Melan-A<sub>26-35</sub> (ELAGIGILTV) Melan-A/Mart-1 dans le contexte HLA A\*0201. Nous sommes partis de lymphocytes T CD8 d'individus sains et malades. Notre méthode de stimulation s'est donc adressée à la fois à des populations naïves et des populations ayant vraisemblablement rencontré l'antigène.

Chez les donneurs sains, les populations de départ variaient entre 0,02% et 1,31% de cellules spécifiques parmi les CD8 purifiés (moyenne : 0,29% ± 0,12).

Chez les malades, la fréquence moyenne à J0 est de 0,63 ± 0,15%.

Nous avons analysé les populations spécifiques après une seule stimulation de 7 jours pour les lymphocytes T CD8 issus de patients et de deux stimulations pour ceux issus de donneurs sains. L'analyse des populations obtenues a été effectuée 14 jours après le début de chaque stimulation. Nous avons montré dans une étude préliminaire, que la faible fréquence des lymphocytes anti-Melan-A chez les donneurs sains, rendait nécessaire une amplification préalable à l'aide de billes HLA/CD28 afin de disposer d'un nombre de cellules spécifiques suffisant.

### Phénotype

#### *Donneurs sains*

Les analyses phénotypiques et fonctionnelles des cellules spécifiques de Melan-A révèle qu'elles présentent toutes de façon homogènes un phénotype naïf : CD45RA+, CCR7+, CD28+, CD27+ (Pittet et coll. 1999; Zippelius et coll. 2002; Romero et coll. 2007).

Dans nos travaux, cette analyse à J0 est rendue difficile à cause du faible nombre de

cellules spécifiques de Melan-A. Néanmoins, la concordance des données de la littérature nous conforte dans l'hypothèse que ces cellules n'ont jamais rencontré l'antigène et qu'elles peuvent donc être considérées comme naïves.

### *Patients*

En dehors de tout traitement, les données de la littérature indiquent que les lymphocytes T spécifiques trouvés dans le sang périphérique ou dans les ganglions ne semblent pas toujours effecteurs. Dans le sang périphérique, seule une partie des patients est capable de générer des lymphocytes T effecteurs anti-Melan-A cytotoxiques (Danila Valmori et coll. 2002). Une étude de Maczek et al. montre que chez deux des trois patients analysés, moins de 15% des lymphocytes anti-Melan-A circulants dans le sang périphérique sont naïfs :CD27+/CD45RA+/CCR7+ (Maczek et coll. 2005).

Notre étude des lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A circulant chez des patients atteints de mélanome, montre que près de 50% présentent un phénotype CD28-. Ce seul marqueur n'est certes pas suffisant pour décrire précisément les populations avec lesquelles nous travaillons, néanmoins la perte d'expression du CD28 est le signe que ces cellules ont commencé leur programme de différenciation. À la différence des donneurs sains, l'expression du seul marqueur CD28 n'est pas suffisant pour décrire les cellules naïves. Une étude phénotypique plus complète (CCR7 et CD45RA) nous aurait permis de les différencier, des lymphocytes T mémoires centraux ou effecteurs, qui expriment également le CD28 (Romero et coll. 2007). Or, le faible nombre de cellules disponibles à J0 ne nous a pas permis cette analyse phénotypique. Ainsi, nous avons considéré que ce répertoire est constitué d'une population mixte de cellules dont au moins 50% ont vraisemblablement déjà rencontré l'antigène *in vivo* (moyenne à 44%, valeurs s'étalant de 25% à 80%).

Ces premières études justifient de s'intéresser dès maintenant à l'impact des conditions de stimulation *ex vivo* sur les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules générées.

### **effet de la co-stimulation 4-1BB ligand**

#### *Moment propice*

Actuellement le phénotype des lymphocytes T anti-tumoraux circulants *in vivo* est moins bien connu que le phénotype des lymphocytes T anti-viraux, principalement

parce que les études sont rendues difficiles par la faible fréquence de ces cellules. Au fur et à mesure de leur analyse, les résultats des protocoles en cours commencent à apporter des connaissances sur cet aspect. En effet, si des corrélations entre la spécificité des lymphocytes anti-tumoraux et l'efficacité clinique du transfert adoptif ont été établies par plusieurs groupes (Benlalam et coll. 2007; Godet et coll. 2008; Robbins et coll. 2004; Meidenbauer et coll. 2003). Seules quelques études commencent à établir des corrélations entre l'efficacité et le phénotype des cellules injectées. Les conditions de stimulation, la durée de stimulation, l'environnement cytokinique sont autant de paramètres à prendre en compte lors de la stimulation *ex vivo* de lymphocytes T CD8 anti-tumoraux, afin qu'ils soient le plus fonctionnels possible et capables de survivre à long terme.

Les conditions de stimulation utilisées aboutissent fréquemment à la perte du CD28, et une étude de Powel *et al* montre que si les TIL générés *ex vivo* sont majoritairement CD28-/IL-7R $\alpha$ -, quelques semaines après le transfert adoptif, la majorité des cellules anti-Melan-A circulantes sont CD28+/IL-7R $\alpha$ + (Powell et coll. 2005). Ces éléments constituent une première indication sur le fait que les lymphocytes anti-Melan-A/MART-1 CD28+ ont un avantage de survie ou de prolifération *in vivo* par rapport aux lymphocytes de même spécificité CD28-, et confirme que l'IL-7 joue un rôle important dans la survie à long terme. Une étude de Huang et al. a montré que les TIL générés *ex vivo* en présence d'IL-2 exprimaient peu ou pas le marqueur CD27 et qu'une carence en IL-2 permettait la réexpression de ce marqueur. Cette étude, qui doit être confirmée, met en corrélation la persistance des TIL injectés *in vivo* et leur capacité à ré-exprimer le CD27 après une carence en IL-2 (Huang et coll. 2006).

Une des questions qui reste en suspens concerne l'origine des cellules analysées après immunothérapie. En effet, dans l'étude de Powel *et al*, chez les patients testés, les cellules spécifiques expriment majoritairement le CD28 après transfert adoptif.

Deux hypothèses peuvent être à l'origine de ces cellules: la réexpression du CD28 par ces cellules CD28-, soit l'expansion préférentielle des cellules CD28+ minoritaires dans les populations injectées. La première hypothèse est soumise à caution étant donné qu'une seule équipe a décrit la réexpression du CD28 (Kim et coll. 2002), de plus la majorité des travaux tendent à confirmer que la perte du CD28 est définitive. De fait la seconde hypothèse semble plus réaliste, et ce d'autant plus que les cellules CD28+ présentent des capacités prolifératives supérieures au CD28-.

Ainsi, selon le modèle de différenciation linéaire des lymphocytes, la différenciation des effecteurs mémoires CD28<sup>-</sup> serait issue des centraux mémoires CD28<sup>+</sup>. Des différences quantitatives et qualitatives de signaux associées à un contexte cellulaire, cytokinique et chémokinique différent expliqueraient que seules certaines cellules peuvent se différencier en TCM puis en TEM (Romero et coll. 2007). Dans ce modèle, il est actuellement bien établi que le couple 4-1BB/4-1BB ligand intervient tardivement lors de la première rencontre antigénique (Bertram et coll. 2002, 2004); si elle n'est pas nécessaire à la réponse primaire, cette co-stimulation est indispensable au développement du répertoire mémoire. Par ailleurs, il semble bien établi que selon le « moment » de la co-stimulation 4-1BB ligand, son effet est soit nul ou délétère soit positif.

Ces éléments laissent supposer que la co-stimulation par le 4-1BBL, pour être bénéfique, ne doit intervenir que postérieurement à une série de signaux qui semblent diriger la réponse au 4-1BB ligand dans un sens ou dans l'autre. Le passage de ce « check point » semble être un pré-requis indispensable.

Dans notre modèle, les lymphocytes T naïfs, par définition n'ont pas passé ce « check point ». En effet, dès la première stimulation, le 4-1BB ligand présente un effet nul ou délétère sur les cellules spécifiques, même si cela reste à confirmer. Lorsque ces mêmes lymphocytes reçoivent la co-stimulation CD28, ils s'amplifient et certains commencent leur programme de différenciation, visualisé dans notre étude par la perte du CD28. Des résultats similaires sont obtenus avec les lymphocytes de patients dès la première co-stimulation. Il semble alors que ces cellules deviennent aptes à bénéficier de l'effet co-stimulant du 4-1BB ligand. Nous montrons que les cellules CD28<sup>-</sup> sont plus sensibles à l'effet co-stimulant du 4-1BB ligand, cependant les cellules CD28<sup>+</sup> répondent également. Ainsi, la perte du CD28 ne semble donc pas être un marqueur phénotypique discriminant pour la visualisation du « checkpoint ». Une étude phénotypique plus poussée permettrait de déterminer l'ensemble de marqueurs indiquant le passage du checkpoint.

Une des questions restant à résoudre, concerne la voie toxique utilisée par le 4-1BB lorsqu'il est stimulé trop précocement.

### *Effet pro-apoptotique*

Les premières études suggéraient déjà le rôle régulateur du couple 4-1BB/4-1BB ligand sur la prolifération des lymphocytes T (Schwarz et coll. 1996). Depuis, la majorité des études se sont intéressées au rôle anti-apoptotique de la co-stimulation 4-1BB. Il est actuellement bien établi que le 4-1BB ligand induit une augmentation des taux des protéines anti-apoptotiques c-FLIP<sub>short</sub>, Bcl-X<sub>L</sub> et Bfl-1 (Lee et coll. 2002b; Stärck et coll. 2005c), et diminue l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim (Chao Wang et coll. 2007).

Néanmoins, des études plus récentes ont mis en évidence la dualité d'effet du 4-1BB ligand. Il a été montré, dans un modèle d'infection virale aigue, que l'injection d'anticorps anti-4-1BB était délétère lorsqu'elle intervenait trop tôt (Zhang et coll. 2007a). Par ailleurs, une étude a également montré, dans un modèle viral murin, que l'absence de « help » CD4 durant la première rencontre antigénique était à l'origine de l'AICD des lymphocytes T CD8 lors de la seconde réponse. Cette AICD passe entre autres par TRAIL et Fas, et notamment la forme soluble de TRAIL (Janssen et coll. 2005).

De fait, dans notre modèle de lymphocytes T CD8 purifiés, l'implication des récepteurs à domaine de mort comme TRAIL (soluble et membranaire) ou Fas doivent être étudiés. En effet, l'utilisation d'une population CD8 purifiée, associée à une co-stimulation trop précoce par le 4-1BB ligand pourraient expliquer, même s'il doit être confirmé, l'effet délétère observé lors de la première stimulation chez le donneur sain.

Néanmoins, d'autres voies méritent d'être étudiées. En effet, les membres de la superfamille des récepteurs au TNF sont impliqués dans le contrôle de la différenciation et de la survie des lymphocytes. Certains comme Fas et TRAIL disposent de domaines de mort responsables de l'activation des caspases. D'autres, comme le 4-1BB, CD27, OX40, GITR, etc... possèdent des sites de liaison à TRAF2, impliqués dans la transduction d'un signal de survie via NF- $\kappa$ B. Cependant, l'analyse des séquences codantes pour la partie intra-cytoplasmique de certains de ces membres met en évidence que GITR, CD27, OX40 et 4-1BB peuvent également interagir avec Siva (Spinicelli et coll. 2002). Siva est une protéine pro-apoptotique impliquée dans l'activation de la voie des caspases et la modulation de l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> et Bcl-2 (Py et coll. 2004). Deux formes de Siva ont été identifiées : Siva-1 et Siva-2. Siva-2 paraît moins toxique que Siva-1. Siva-1 inhiberait Bcl-X<sub>L</sub> et Siva-2 pourrait réguler négativement les signaux pro-apoptotiques délivrés par Siva-1 (Yoon et coll. 1999; Xue et coll. 2002). Ainsi, la modulation de Bcl-X<sub>L</sub> par le signal

4-1BB pourrait impliquer deux voies de transduction aux rôles opposés. D'une part la voie NF-KB impliquée dans la survie et d'autre part la possible activation de Siva impliquée dans l'apoptose. Il serait séduisant d'imaginer que le passage du « checkpoint » permette de passer d'un signal pro à un signal anti-apoptotique prépondérant. Cette « théorie » pourrait expliquer la dualité d'effet observée lors de l'injection précoce ou tardive d'anticorps agonistes du 4-1BB ligand, ainsi que l'effet différent sur les cellules naïves ou ayant déjà rencontré l'antigène (Miller et coll. 2002; Zhang et coll. 2007).

Dans une expérience récente, effectuée par Anne Rogel dans le laboratoire, nous montrons un effet différentiel du 4-1BB ligand sur les cellules mémoires ou naïves. Les lymphocytes T CD8 purifiés de donneurs sains ont été triés CD45RA+CD25RO- (naïves) et CD45RA-CD25RO+ (mémoires) puis stimulés 16h par des billes CD3/CD28 (au rapport 1 bille pour 5 cellules). Les billes ont été retirées et des billes saturées en 4-1BB ligand ont été ajoutées au rapport 1 pour 1. A l'issue de 6h de stimulation les cellules ont été marquées en intracellulaire par un anticorps anti-Bcl-XL. Nous montrons que la stimulation 4-1BB ligand sur les cellules naïves induit une diminution du niveau d'expression de Bcl-XL par rapport aux cellules mémoires (cf. Figure 57). Ces premiers résultats confirment la dualité d'effet du 4-1BB ligand selon l'état de différenciation des cellules.

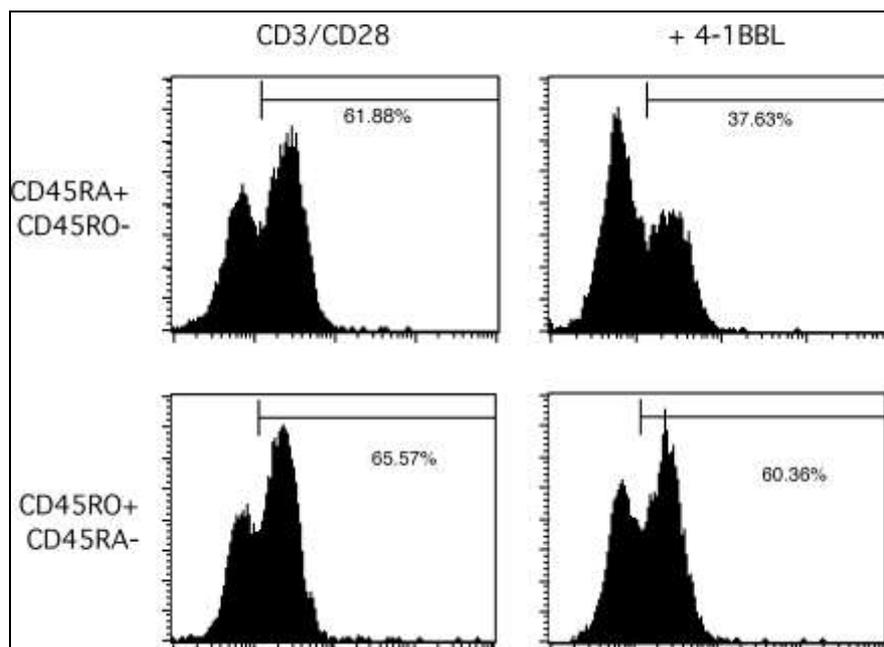


Figure 57 : analyse de l'expression de Bcl-XL sur des population pures naïves ou mémoires stimulées 16h CD3/CD28 puis 4-1BB ligand

Une étude de l'implication des protéines SIVA lors de la co-stimulation 4-1BB ligand devrait permettre d'éclaircir le rôle du couple 4-1BB/4-1BB ligand dans l'homéostasie lymphocytaire

### Différenciation phénotypique et modèle de différenciation

Dans le modèle linéaire de différenciation, le 4-1BB ligand intervient tardivement dans la phase précoce de différenciation. Nous confirmons, qu'il semble nécessaire que les cellules aient déjà été programmées pour être co-stimulées par le 4-1BB ligand. Ce signal permettant la différenciation en effecteurs mémoires très différenciés ayant perdu l'expression du CD27 (15% de CD27-CD28-). À la différence de la co-stimulation par l'anti-CD28 qui ne permet l'engagement que de 2,5% des lymphocytes spécifiques en effecteurs tardifs.

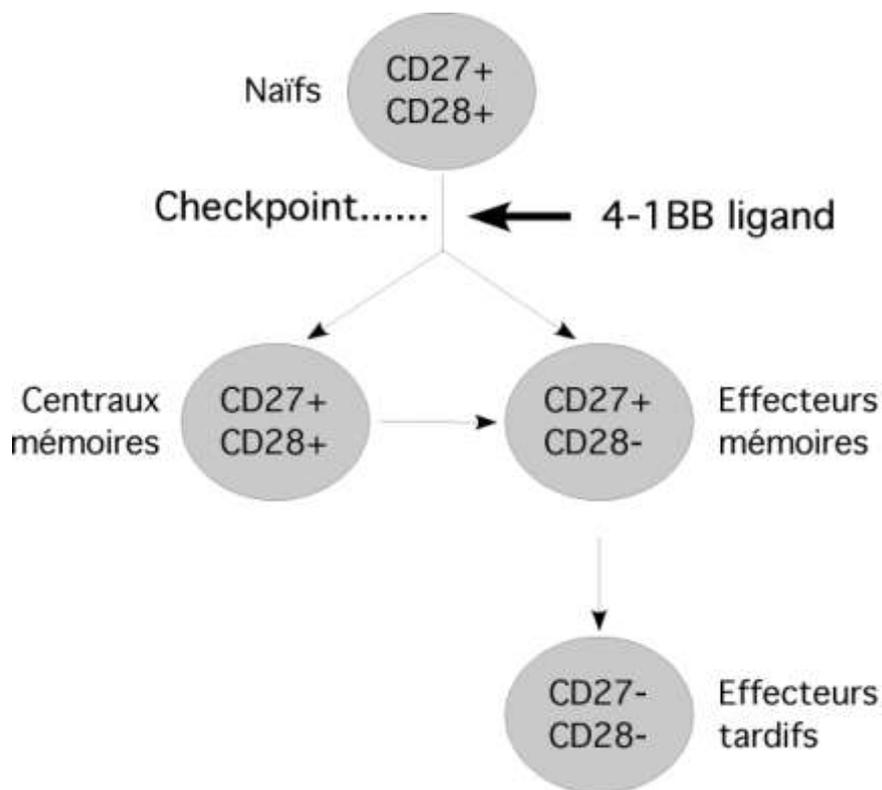


Figure 58 : schéma de différenciation linéaire et intervention du 4-1BB ligand

Dans une publication récente, l'équipe de Chang *et al.* a montré qu'une cellule mère naïve peut donner naissance à deux cellules filles ayant des niveaux de différenciation différents, suite à l'asymétrie de la division cellulaire (Chang et coll. 2007). Cette étude montre qu'une cellule naïve peut donner naissance à :

- une cellule fille présentant un phénotype effecteur : ayant reçu davantage de CD8, CD69, CD25, CD43, CD44 et sécrétant plus d'INF- $\gamma$  et de granzyme B,
- la seconde cellule fille recevant davantage de CD62L et exprimant de forts taux d'ARNm d'IL-7R $\alpha$ , présentant ainsi un phénotype mémoire.

Il serait intéressant d'effectuer une étude similaire en considérant les molécules de co-stimulation afin de déterminer si le CD28, le 4-1BB, le CD27... ont des destinées différentes lors des divisions cellulaires successives.

Ainsi, les cellules mémoires sont-elles générées avant ou après l'acquisition des fonctions effectrices ou cette différenciation est-elle simultanée ? Dans ce modèle à quel moment intervient la co-stimulation 4-1BB ? Existe-t-il une répartition différente du 4-1BB entre les 2 cellules filles ?

De nombreuses inconnues demeurent sur la génération du répertoire mémoire anti-tumoral. Même si beaucoup d'hypothèses restent à valider, l'importance du couple 4-1BB/4-1BB ligand dans l'immunité anti-tumorale n'est plus à démontrer et les résultats obtenus chez le souris et chez l'homme sont très prometteurs en termes de thérapeutique.

# **MATERIELS ET METHODES**

## Culture cellulaire

Les échantillons sanguins de volontaire sains ont été obtenus par l'intermédiaire de l'Etablissement Français du Sang de Nantes. Ces donneurs, atteints d'hémochromatose, sont considérés comme sains car exempts de mélanome.

L'étude sur échantillons de sang de patients atteints de mélanome a reçu un avis favorable par le comité de protection des personnes. Chaque patient a signé un consentement éclairé nous autorisant à utiliser les échantillons de sang prélevés à des fins de recherche biomédicale. Les prélèvements sanguins étaient effectués au sein du service d'Onco-dermatologie du Pr, Dréno au CHU de Nantes.

### Développement du tri M450

#### i. Purification des PBMC

Le sang est dilué au 1/3 dans du RPMI 1640 (Sigma) et le mélange est déposé sur un coussin de Ficoll (Eurobio). L'ensemble est centrifugé et les PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) sont récupérés à l'anneau formé entre le Ficoll et le sérum. Ils sont ensuite lavés 3 fois et numérisés sur cellule de Malassez.

#### ii. Purification des lymphocytes T CD8

La purification de lymphocytes T CD8+ à partir des PBMC est réalisée par un dispositif utilisant les microbeads CD8 Miltenyi selon les recommandations du fabricant.

Pour la purification de lymphocytes CD8+ à partir de sang total, 50 µl de cocktail d'anticorps Rosette Sep (Stem Cell Technology) sont ajoutés à 1 ml de sang. Après incubation et séparation par gradient de Ficoll, les lymphocytes T CD8 purifiés sont récupérés à l'interface Ficoll/Sérum, lavés 3 fois et numérisés sur cellules de Malassez.

#### iii. Stimulation des PBMC

Les PBMC ont été stimulées pendant 14 jours en présence de 10µg/ml de peptide Melan-A 26-35 muté A27L (ELAGIGILTV), ou de peptide gp100<sub>280-288</sub> (YLEPGPVTA) ou de peptide NA17-A (VLPDVFIRC) dans un milieu composé de RPMI 8% SH supplémenté en IL-2 (50UI/ml), L-glutamine (2nM, Invitrogen Life Technologies), pénicilline (100UI/ml) et streptomycine (100g/ml). Les cellules étaient cultivées à 1x10<sup>6</sup>/ml, en plaque 24 puits pour les stimulations Melan-A et en plaque 96 puits à fond rond pour les stimulations gp100 et NA17-A.

#### iv. Tris des lymphocytes spécifiques

Les PBMC, ou les TIL, sont co-incubés 4h à 4°C sous agitation avec les billes M450-AvT ou M280<sub>s</sub>, au rapport bille : cellule 1 :1 en PBS/0,1% BSA. Les billes sont ensuite aimantées une minute avec l'aimant Dynal, le surnageant est enlevé et les billes sont remises en suspension dans 1 ml de PBS/0,1% BSA. Cette opération est effectuée 10 fois. À la fin des lavages, les billes et les cellules fixées sont stimulées non spécifiquement.

#### v. Amplification non spécifique des lymphocytes T CD8

Les lignées ou les clones de lymphocytes T spécifiques triés ou non sont amplifiés durant 14 jours à l'aide de cellules nourricières irradiées. Brièvement, les cellules sont distribuées dans des plaques 96 puits à fond rond contenant  $10^6$  LAZ (lymphocytes B transformés par le virus de l'EBV) et  $10^7$  PBMC allogéniques irradiées dans un milieu composé RPMI 8% SH, L-glutamine (2nM, Invitrogen Life Technologies), pénicilline (100UI/ml), streptomycine (100g/ml), et supplémenté par 150UI/ml d'IL-2 et 15 µg/ml de PHA.

### Étude des molécules de co-stimulation

#### i. Les protéines recombinantes

Les complexes HLA A\*201-Melan-A/MART-1 ont été produits par la plateforme de protéines recombinantes de Nantes (IFR 26) selon un protocole préalablement décrit (Bodinier et coll. 2000). Le peptide issu de la protéine Melan-A/MART-1 a été synthétisé par eurogentec, Les monomères biotinylés sont soit immobilisés sur des billes immuno-magnétiques soit tétramérisés avec de la streptavidine couplée PE ou APC à un ration 4/0, 8 pendant 1h à température ambiante à l'obscurité,

Le 4-1BBL recombinant est produit selon le protocole préalablement décrit (Rabu et coll. 2005), puis biotinylé enzymatiquement afin de pouvoir l'immobiliser sur des billes immuno-magnétiques.

#### ii. Les billes

Les billes permettant l'immobilisation des signaux activateurs sont les billes M280 couplées de manière covalente à la streptavidine (Dynal).

L'immobilisation des ligands biotinylés (HLA A\*201-Melan-A/MART-1, anticorps anti-CD28 et 4-1BBL) se fait à température ambiante pendant une heure.

La détermination des quantité saturante de ligands biotinylés à utiliser s'effectue en incubant une quantité fixe (137 000) de bille avec une gamme de concentration de protéines, Les billes sont ensuite marquées avec un anticorps adéquat puis analysées en cytométrie de flux, La fixation, sur les billes ,du complexe HLA A\*201-Melan-A/MART-1 est révélé par un anticorps anti-HLA-ABC-FITC, celle de l'anticorps anti-CD28 par un anticorps de chèvre anti-souris-PE, enfin celle du 4-1BBL par un anticorps anti-4-1BBL-PE.

Pour amplifier les lymphocytes T CD8 purifiés,  $1,10^6$  billes sont préparées, lavées puis incubées avec autant de lymphocytes (ratio billes/cellules : 1:1), Après 7 jours de stimulation les billes sont retirées, le Chaque cycle de stimulation dure 14 jours.

### iii. Cytokines

Durant les 3 premiers jours du premier cycle de stimulation, le milieu est supplémenté en IL-15 (20ng/ml, Abcys), A partir du 3<sup>ème</sup> jour et jusqu'au terme de la stimulation le milieu utilisé est supplémenté en IL-2 (50UI/ml).

### iv. Nombre de stimulation et entretien durant la culture

Les cellules peuvent être stimulé 2 ou 3 cycles de 14j consécutifs, Au 7<sup>ème</sup> jour du cycle les billes sont retirées et les cellules sont conservées dans leur milieu jusqu'à J14.

Durant toute la stimulation, l'entretien des cultures est fait avec du milieu supplémenté en IL-2 (50UI/ml).

## **Cytométrie de flux**

### Marquages tétramères

Les complexes CMH/peptide biotinylés et la streptavidine PE ou APC sont incubés 1h à température ambiante, à l'abri de la lumière au rapport 1 mole de streptavidine pour 4 moles de complexe CMH/peptide. Les marquages tétramères sont effectués ainsi : les cellules sont incubées 1h à 4°C dans l'obscurité avec 40µg/ml de tétramère PE ou APC dans du PBS/0,1% BSA. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avant d'être analysées en cytométrie de flux.

### Marquages intracellulaires : Détection de cytokines

La capacité des lymphocytes à sécréter les cytokines IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$  et IL2 a été évaluée par marquage intra-cytoplasmique suite à une stimulation de 6 h par la lignée T2 chargée en peptide (10mM) en présence de bréfeldine A (Sigma), une molécule inhibant la sécrétion des protéines. À l'issue de la stimulation, les cellules sont fixées par une solution à 10% de paraformaldéhyde pendant 10 min à température ambiante, puis perméabilisées par une solution à 0,1% de saponine (Sigma). Les cellules sont ensuite incubées avec 30 $\mu$ l d'une solution saturante d'anticorps dilué en PBS-0,1% BSA-0,1% saponine.

### Marquages extracellulaires

10<sup>5</sup> cellules ou billes sont prélevées, lavées puis analysées par cytométrie de flux à l'aide de différents anticorps. Les cellules ou les billes sont incubées 45min à 4°C avec d'intérêt dilué en PBS-0,1%BSA. L'acquisition a été effectuée sur un cytomètre LSR ou FACS Calibur (BD Biosciences) pour les cellules et un cytomètre FacScan (BD Biosciences) pour les billes. L'analyse a été menée avec le logiciel CellQuest Pro pour Mac OSX (BD Biosciences). Le panel de 24 anticorps anti-V $\beta$  ainsi que l'anticorps anti-HLA-ABC (clone B9.12.1, IgG2a,  $\kappa$  utilisés, proviennent d'Immunotech (Beckman-Coulter, Marseille, France). Les autres anticorps proviennent de chez BD Biosciences.

Molécule ciblée	Clone et isotype	Fluorochrome
HLA*A0201	BB7-2, IgG2b	FITC
CD8	RPA-T8 IgG1, $\kappa$	FITC ou APC
CD28	CD28.2 IgG1, $\kappa$	FITC ou APC
CD27	M-T 271 IgG1, $\kappa$	FITC
HLA-ABC	B9.12.1, IgG2a	FITC
TNF- $\alpha$	6401.1111, IgG1, $\kappa$	FITC ou PE
IFN- $\gamma$	45.B3 IgG1	FITC ou PE
IL2	MQ1-17H12 IgG2a, $\kappa$	FITC ou PE
Anti-V $\beta$	1, 2, 3, 4, 5.1, 5.2, 5.3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13.1, 13.2, 13.6, 14, 16, 17, 18, 20, 21.3, 22 et 23	FITC ou PE
Anticorps de chèvre	Chèvre anti-souris F(ab') <sub>2</sub>	FITC ou PE

*Tableau 13 : Liste des anticorps utilisés.*

*PE : phycoerythrine, FITC : fluoréscéine, APC : allophycocyanine*

## **Cytotoxicité**

Les lymphocytes T sont co-cultivés 4h avec des cellules cibles marquées au  $^{51}\text{Cr}$  :  
Soit des cellules T2 chargées par une gamme de concentration de peptide,  
Soit des cellules tumorales non chargées.

Le rapport effecteurs :cibles est de 10 :1 avec les cellules T2, et varie de 2 :1, 10 :1 et 50 :1 avec les cellules tumorales. La cytotoxicité des lymphocytes T est évaluée par un test standard de libération du  $^{51}\text{Cr}$ . Le pourcentage de lyse est calculée par la formule

suivante : 
$$\% \text{ de lyse} = \frac{\text{cpm spécifique} - \text{SR}}{\text{MR} - \text{SR}} \times 100$$

Où :

- SR : Spontaneous Release : activité libérée spontanément par les cellules cibles,
- MR : Maximum Release, activité libérée par les cibles lysées par du Triton X100.

## **Mise en évidence de l'apoptose**

### **Marquage Annexine-V Iodure de Propidium**

Après 6h d'incubation, les lignées ou les clones de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A sont lavés et les billes retirées par aimantation. Après 3 lavages en PBS/0,1% BSA,  $10^5$  cellules sont reprises dans 190 $\mu\text{l}$  de tampon contenant 5 $\mu\text{l}$  d'annexine-V-FITC et 5 $\mu\text{l}$  d'iodure de propidium. Les cellules sont marquées 15 min à température ambiante avant d'être analysée en cytométrie de flux.

### **Mesure de l'activité caspase 3/7 et 9**

Cette seconde technique d'évaluation de l'apoptose utilise le test Caspase-Glo 3/7 et 9 de chez Proméga. Les substrats luminescents des caspases 3/7 et 9, respectivement DEVD- et LEHD-aminoluciferine, sont dissouts dans le tampon de lyse fourni. Un inhibiteur du protéasome, le MG132, est ajouté au test caspase 9 afin de réduire le bruit de fond. Après 4h d'incubation dans les différentes conditions, les cellules sont lavées et les billes retirées par aimantation. Les cellules sont mises en suspension à la concentration de 720 000/ml, 25 $\mu\text{l}$  (soit 18 000) et un volume égal de réactif Caspase-Glo sont incubés 45 minutes à l'obscurité. Les cellules sont lysées, et les caspases activées pendant l'incubation avec les billes transforment le substrat du kit en produit luminescent. La luminescence est quantifiée avec un compteur betaplate (Perkin Elmer), elle est proportionnelle à la quantité de caspases activées.

### **Analyse Statistique**

L'analyse statistique a été effectuée pour les séries comprenant plus de 5 valeurs. Afin de s'assurer que les variables considérées suivent une loi normale un test de Kolmogorov Smirnov (Lilliefors ) a été effectué avant de comparer les groupes. Pour la comparaison de 2 variables distribuées normalement nous avons utilisé un test de Student, pour un nombre de variable supérieur à 2 un test ANOVA suivi lorsque la différence entre les groupe est significative ( $p < 0,05$ ) d'un post-test de Bonferroni. Enfin, pour la comparaison de variables ne suivant pas une loi normale, nous avons utilisé un test de Mann-Whitney.

Les analyses ont été effectuées à l'aide des logiciels InStat 3,0 (Graphpad Software, San diego).

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Aalto, Y., Eriksson, L., Seregard, S., Larsson, O., et Knuutila, S. (2001). Concomitant loss of chromosome 3 and whole arm losses and gains of chromosome 1, 6, or 8 in metastasizing primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 313-7.
- al-Ramadi, B. K., Jelonek, M. T., Boyd, L. F., Margulies, D. H., et Bothwell, A. L. (1995). Lack of strict correlation of functional sensitization with the apparent affinity of MHC/peptide complexes for the TCR. *J Immunol* 155, 662-73.
- Alderson, M. R. et coll. (1994). Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand. *Eur J Immunol* 24, 2219-27.
- Alderson, M. R. et coll. (1995). Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* 181, 71-7.
- Alexander-Miller, M. A., Leggatt, G. R., et Berzofsky, J. A. (1996). Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4102-7.
- Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J., et Davis, M. M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-6.
- von Andrian, U. H., et Mackay, C. R. (2000). T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 343, 1020-34.
- Anichini, A., Mortarini, R., Sensi, M., et Zanon, M. (2006). APAF-1 signaling in human melanoma. *Cancer Lett* 238, 168-79.
- Antony, P. A. et coll. (2005). CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4 T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol.* 174, 2591-2601.
- Appay, V. et coll. (2002). Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 8, 379-385.
- Arcaro, A., Grégoire, C., Boucheron, N., Stotz, S., Palmer, E., Malissen, B., et Luescher, I. F. (2000). Essential role of CD8 palmitoylation in CD8 coreceptor function. *J Immunol* 165, 2068-76.
- Arens, R. et coll. (2001). Constitutive CD27/CD70 interaction induces expansion of effector-type T cells and results in IFN $\gamma$ -mediated B cell depletion. *Immunity* 15, 801-12.
- Babbitt, B. P., Allen, P. M., Matsueda, G., Haber, E., et Unanue, E. R. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 317, 359-61.
- Badovinac, V. P., Messingham, K. A. N., Griffith, T. S., et Harty, J. T. (2006). TRAIL deficiency delays, but does not prevent, erosion in the quality of "helpless" memory CD8 T cells. *J Immunol* 177, 999-1006.

- Balch, C. M., Soong, S. J., Gershenwald, J. E., et coll. (2001). Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 19, 3622-34.
- Balch, C. M., Soong, S. J., Smith, T., et coll. (2001). Long-term results of a prospective surgical trial comparing 2 cm vs. 4 cm excision margins for 740 patients with 1-4 mm melanomas. *Ann Surg Oncol* 8, 101-8.
- van Baren, N. et coll. (2005). Tumoral and immunologic response after vaccination of melanoma patients with an ALVAC virus encoding MAGE antigens recognized by T cells. *J Clin Oncol* 23, 9008-21.
- Bataille, V. (2006). [Genetic and epidemiological aspects of melanoma]. *Ann Dermatol Venereol* 133, 56-62.
- Bauer, J., Curtin, J. A., Pinkel, D., et Bastian, B. C. (2007). Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations. *J Invest Dermatol* 127, 179-82.
- Belli, F. et coll. (2002). Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings. *J Clin Oncol* 20, 4169-80.
- Bensch, B., Spangenberg, H. C., Kersting, N., Neumann-Haefelin, C., Panther, E., Weizsäcker, F. V., Blum, H. E., Pircher, H., et Thimme, R. (2007). Analysis of CD127 and KLRG1 Expression on Hepatitis C Virus-Specific CD8+ T Cells Reveals the Existence of Different Memory T-Cell Subsets in the Peripheral Blood and Liver . *J Virol.* 81, 945-953.
- Benlalam, H., Vignard, V., Khammari, A., Bonnin, A., Godet, Y., Pandolfino, M., Jotereau, F., Dreno, B., et Labarrière, N. (2007). Infusion of Melan-A/Mart-1 specific tumor-infiltrating lymphocytes enhanced relapse-free survival of melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 56, 515-26.
- Berd, D., Sato, T., Cohn, H., Maguire, H. C., et Mastrangelo, M. J. (2001). Treatment of metastatic melanoma with autologous, hapten-modified melanoma vaccine: regression of pulmonary metastases. *Int J Cancer* 94, 531-9.
- Bertram, E. M., Dawicki, W., Sedgmen, B., Bramson, J. L., Lynch, D. H., et Watts, T. H. (2004a). A switch in costimulation from CD28 to 4-1BB during primary versus secondary CD8 T cell response to influenza in vivo. *J Immunol* 172, 981-8.
- Bertram, E. M., Dawicki, W., Sedgmen, B., Bramson, J. L., Lynch, D. H., et Watts, T. H. (2004b). A switch in costimulation from CD28 to 4-1BB during primary versus secondary CD8 T cell response to influenza in vivo. *J. Immunol* 172, 981-8.
- Bertram, E. M., Lau, P., et Watts, T. H. (2002a). Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the

- primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection. *J Immunol* 168, 3777-85.
- Bertram, E. M., Lau, P., et Watts, T. H. (2002b). Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection. *J Immunol* 168, 3777-85.
- Bertram, E. M., Lau, P., et Watts, T. H. (2002c). Temporal Segregation of 4-1BB Versus CD28-Mediated Costimulation: 4-1BB Ligand Influences T Cell Numbers Late in the Primary Response and Regulates the Size of the T Cell Memory Response Following Influenza Infection. *J Immunol* 168, 3777-3785.
- Bevan, M. J. (1976). 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.* 143, 1283-1288.
- Bissinger, A. L., Rauser, G., Hebart, H., Frank, F., Jahn, G., et Einsele, H. (2002). Isolation and expansion of human cytomegalovirus- specific cytotoxic T lymphocytes using interferon-gamma secretion assay. *Exp Hematol* 30, 1178-84.
- Bjorkman, P. J. (1997). MHC Restriction in Three Dimensions: A View of T Cell Receptor/Ligand Interactions. *Cell* 89, 167-170.
- Blanchet, J. S. et coll. (2001). A new generation of Melan-A/MART-1 peptides that fulfill both increased immunogenicity and high resistance to biodegradation: implication for molecular anti-melanoma immunotherapy. *J Immunol* 167, 5852-61.
- Blank, C. et coll. (2006). Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int J Cancer* 119, 317-27.
- Boatright, K. M. et coll. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11, 529-41.
- Bodinier, M. (2001). Thèse de doctorat - Bodinier Marie - universite de nantes . Available at:  
<http://scholar.google.fr/scholar?num=50&hl=en&lr=&q=bodinier+universite+de+nantes&btnG=Search> [Accédé Novembre 30, 2001].
- Bodinier, M., Peyrat, M. A., Tournay, C., Davodeau, F., Romagne, F., Bonneville, M., et Lang, F. (2000). Efficient detection and immunomagnetic sorting of specific T cells using multimers of MHC class I and peptide with reduced CD8 binding. *Nat Med* 6, 707-10.
- Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T., et Thompson, C. B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3, 87-98.

- Borowski, A. B., Boesteanu, A. C., Mueller, Y. M., Carafides, C., Topham, D. J., Altman, J. D., Jennings, S. R., et Katsikis, P. D. (2007). Memory CD8<sup>+</sup> T cells require CD28 costimulation. *J Immunol* 179, 6494-503.
- Boutboul, F. et coll. (2005). Modulation of interleukin-7 receptor expression characterizes differentiation of CD8 T cells specific for HIV, EBV and CMV. *AIDS* 19, 1981-6.
- Boyman, O., Kovar, M., Rubinstein, M. P., Surh, C. D., et Sprent, J. (2006). Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science* 311, 1924-7.
- Bradley, L. M., Haynes, L., et Swain, S. L. (2005). IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis. *Trends Immunol* 26, 172-6.
- Brantley, M. A., Worley, L., et Harbour, J. W. (2002). Altered expression of Rb and p53 in uveal melanomas following plaque radiotherapy. *Am J Ophthalmol* 133, 242-8.
- Brenchley, J. M. et coll. (2003). Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* 101, 2711-20.
- Brenner, D., Krammer, P. H., et Arnold, R. (2008). Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* 66, 52-64.
- Bretscher, P. A. (1999). A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 185-90.
- Brinckerhoff, L. H., Kalashnikov, V. V., Thompson, L. W., Yamshchikov, G. V., Pierce, R. A., Galavotti, H. S., Engelhard, V. H., et Slingluff, C. L. (1999). Terminal modifications inhibit proteolytic degradation of an immunogenic MART-1(27-35) peptide: implications for peptide vaccines. *Int J Cancer* 83, 326-34.
- Brown, D. A., et Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-44.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., et Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-7.
- Brunet, J. F., Denizot, F., Luciani, M. F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M. G., et Golstein, P. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 328, 267-70.
- Brunner, T., Wasem, C., Torgler, R., Cima, I., Jakob, S., et Corazza, N. (2003). Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol* 15, 167-76.
- Bukczynski, J., Wen, T., et Watts, T. (2003). Costimulation of human CD28<sup>-</sup> T cells by 4-

- 1BB ligand. *European Journal of Immunology* 33, 446-454.
- Burnet, F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1-27.
- Busam, K. J. (2004). The prognostic importance of tumor mitotic rate for patients with primary cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol* 11, 360-1.
- Butte, M. J., Keir, M. E., Phamduy, T. B., Sharpe, A. H., et Freeman, G. J. (2007). Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27, 111-22.
- Butz, E. A., et Bevan, M. J. (1998). Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection. *Immunity* 8, 167-75.
- Cai, G., Anumanthan, A., Brown, J. A., Greenfield, E. A., Zhu, B., et Freeman, G. J. (2008). CD160 inhibits activation of human CD4+ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol* 9, 176-85.
- Cambier, J. C. (1995). Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol* 155, 3281-5.
- Cannons, J. L., Lau, P., Ghumman, B., DeBenedette, M. A., Yagita, H., Okumura, K., et Watts, T. H. (2001). 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol* 167, 1313-24.
- Carreño, L. J., González, P. A., et Kalergis, A. M. (2006). Modulation of T cell function by TCR/pMHC binding kinetics. *Immunobiology* 211, 47-64.
- Carter, L. et coll. (2002). PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* 32, 634-43.
- Caserta, S., Alessi, P., Guarnerio, J., Basso, V., et Mondino, A. (2008). Synthetic CD4+ T cell-targeted antigen-presenting cells elicit protective antitumor responses. *Cancer Res* 68, 3010-8.
- Castellino, F., Huang, A. Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C., et Germain, R. N. (2006). Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* 440, 890-5.
- Cebecauer, M., Guillaume, P., Hozak, P., Mark, S., Everett, H., Schneider, P., et Luescher, I. F. (2005). Soluble MHC-Peptide Complexes Induce Rapid Death of CD8+ CTL. *J Immunol* 174, 6809-6819.
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., et Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184, 747-52.

- Chang, J. T. et coll. (2007). Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* 315, 1687-91.
- Chaput, N., Darrasse-Jèze, G., Bergot, A., Cordier, C., Ngo-Abdalla, S., Klatzmann, D., et Azogui, O. (2007). Regulatory T cells prevent CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 Th cells at tumor sites. *J Immunol* 179, 4969-78.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., et Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-12.
- Chiu, W. K., Fann, M., et Weng, N. (2006). Generation and Growth of CD28nullCD8+ Memory T Cells Mediated by IL-15 and Its Induced Cytokines. *J Immunol.* 177, 7802-7810.
- Choi, B. K., Bae, J. S., Choi, E. M., Kang, W. J., Sakaguchi, S., Vinay, D. S., et Kwon, B. S. (2004). 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4+CD25+ T cells. *J Leukoc Biol* 75, 785-91.
- Christen, U., Edelmann, K. H., McGavern, D. B., Wolfe, T., Coon, B., Teague, M. K., Miller, S. D., Oldstone, M. B. A., et von Herrath, M. G. (2004). A viral epitope that mimics a self antigen can accelerate but not initiate autoimmune diabetes. *J Clin Invest* 114, 1290-8.
- Cianfrocca, R., Muscolini, M., Marzano, V., Annibaldi, A., Marinari, B., Levrero, M., Costanzo, A., et Tuosto, L. (2008). RelA/NF-kappaB recruitment on the bax gene promoter antagonizes p73-dependent apoptosis in costimulated T cells. *Cell Death Differ* 15, 354-63.
- Cohen, A. D. et coll. (2006). Agonist Anti-GITR Antibody Enhances Vaccine-Induced CD8+ T-Cell Responses and Tumor Immunity. *Cancer Res.* 66, 4904-4912.
- Cohen, Y., Rosenbaum, E., Begum, S., Goldenberg, D., Esche, C., Lavie, O., Sidransky, D., et Westra, W. H. (2004). Exon 15 BRAF mutations are uncommon in melanomas arising in nonsun-exposed sites. *Clin Cancer Res* 10, 3444-7.
- Cole, D. J., Wilson, M. C., Rivoltini, L., Custer, M., et Nishimura, M. I. (1997). T-cell receptor repertoire in matched MART-1 peptide-stimulated peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer Res* 57, 5320-7.
- Colombatti, A., Doliana, R., Schiappacassi, M., Argentini, C., Tonutti, E., Feruglio, C., et Sala, P. (1998). Age-related persistent clonal expansions of CD28(-) cells: phenotypic and molecular TCR analysis reveals both CD4(+) and CD4(+)CD8(+) cells with identical CDR3 sequences. *Clin Immunol Immunopathol* 89, 61-70.
- Compte, E., Pontarotti, P., Collette, Y., Lopez, M., et Olive, D. (2004). Frontline: Characterization of BT3 molecules belonging to the B7 family expressed on immune cells. *Eur J Immunol* 34, 2089-99.

- Couedel, C., Bodinier, M., Peyrat, M. A., Bonneville, M., Davodeau, F., et Lang, F. (1999). Selection and long-term persistence of reactive CTL clones during an EBV chronic response are determined by avidity, CD8 variable contribution compensating for differences in TCR affinities. *J Immunol* 162, 6351-8.
- Curtin, J. A. et coll. (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 353, 2135-47.
- D'Souza, W. N., et Lefrançois, L. (2003). IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J Immunol* 171, 5727-35.
- Dahl, C., et Guldberg, P. (2007). The genome and epigenome of malignant melanoma. *APMIS* 115, 1161-76.
- Dahl, K., Karlsson, M., Marits, P., Hoffstedt, A., Winqvist, O., et Thörn, M. (2008). Metinell Node—The First Lymph Node Draining a Metastasis—Contains Tumor-Reactive Lymphocytes. *Ann Surg Oncol.* 15, 1454–1463.
- Dai, D. L., Martinka, M., et Li, G. (2005). Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J Clin Oncol* 23, 1473-82.
- Dal Porto, J., Johansen, T. E., Catipović, B., Parfiit, D. J., Tuveson, D., Gether, U., Kozlowski, S., Fearon, D. T., et Schneck, J. P. (1993). A soluble divalent class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T cells at nanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6671-5.
- Daniels, M. A., et Jameson, S. C. (2000). Critical Role for CD8 in T Cell Receptor Binding and Activation by Peptide/Major Histocompatibility Complex Multimers. *J. Exp. Med.* 191, 335-346.
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., et Traganos, F. (1997). Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27, 1-20.
- Davies, H. et coll. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-54.
- Davis, I. D. et coll. (2004). Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10697-702.
- Davis, M. M., et Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395-402.
- Dawicki, W., et Watts, T. H. (2004). Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo. *Eur J Immunol* 34, 743-51.

- De Smet, C., Lurquin, C., van der Bruggen, P., De Plaen, E., Brasseur, F., et Boon, T. (1994). Sequence and expression pattern of the human MAGE2 gene. *Immunogenetics* 39, 121-9.
- DeBenedette, M. A., Shahinian, A., Mak, T. W., et Watts, T. H. (1997). Costimulation of CD28- T lymphocytes by 4-1BB ligand. *J Immunol* 158, 551-9.
- DeBenedette, M. A., Wen, T., Bachmann, M. F., Ohashi, P. S., Barber, B. H., Stocking, K. L., Peschon, J. J., et Watts, T. H. (1999). Analysis of 4-1BB Ligand (4-1BBL)-Deficient Mice and of Mice Lacking Both 4-1BBL and CD28 Reveals a Role for 4-1BBL in Skin Allograft Rejection and in the Cytotoxic T Cell Response to Influenza Virus. *J Immunol* 163, 4833-4841.
- Derby, M. A., Snyder, J. T., Tse, R., Alexander-Miller, M. A., et Berzofsky, J. A. (2001). An abrupt and concordant initiation of apoptosis: antigen-dependent death of CD8+CTL. *European Journal of Immunology* 31, 2951-2959.
- Diehl, L. et coll. (2002). In vivo triggering through 4-1BB enables Th-independent priming of CTL in the presence of an intact CD28 costimulatory pathway. *J Immunol* 168, 3755-62.
- Ding, L., et Shevach, E. M. (1994). Activation of CD4+ T cells by delivery of the B7 costimulatory signal on bystander antigen-presenting cells (trans-costimulation). *Eur J Immunol* 24, 859-66.
- Ding, Y. H., Smith, K. J., Garboczi, D. N., Utz, U., Biddison, W. E., et Wiley, D. C. (1998). Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids. *Immunity* 8, 403-11.
- DiSanto, J. P., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F., Fischer, A., et de Saint Basile, G. (1993). CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 361, 541-3.
- Dong, H. et coll. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8, 793-800.
- Dréno, B. et coll. (2002). Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 51, 539-46.
- Dudley, E. C., Petrie, H. T., Shah, L. M., Owen, M. J., et Hayday, A. C. (1994). T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* 1, 83-93.
- Dudley, M. E. et coll. (2001). Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 24, 363-73.
- Dudley, M. E. et coll. (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal

- repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-4.
- Dudley, M. E. et coll. (2005). Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 23, 2346-57.
- Dudley, M. E., et Rosenberg, S. A. (2007). Adoptive Cell Transfer Therapy. *Semin Oncol* 34, 524-531.
- Dupont, J., Latouche, J., Ma, C., et Sadelain, M. (2005). Artificial antigen-presenting cells transduced with telomerase efficiently expand epitope-specific, human leukocyte antigen-restricted cytotoxic T cells. *Cancer Res* 65, 5417-27.
- Duval, L., Schmidt, H., Kaltoft, K., Fode, K., Jensen, J. J., Sorensen, S. M., Nishimura, M. I., et von der Maase, H. (2006). Adoptive transfer of allogeneic cytotoxic T lymphocytes equipped with a HLA-A2 restricted MART-1 T-cell receptor: a phase I trial in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 12, 1229-36.
- Dyneke, J. N., Chan, S. M., Liu, J., Zha, J., Fairbrother, W. J., et Vucic, D. (2008). Microphthalmia-associated transcription factor is a critical transcriptional regulator of melanoma inhibitor of apoptosis in melanomas. *Cancer Res* 68, 3124-32.
- Ebata, T., Mogi, S., Hata, Y., Fujimoto, J. I., Yagita, H., Okumura, K., et Azuma, M. (2001). Rapid induction of CD95 ligand and CD4+ T cell-mediated apoptosis by CD137 (4-1BB) costimulation. *Eur J Immunol* 31, 1410-6.
- Eck, S. C., Chang, D., Wells, A. D., et Turka, L. A. (1997). Differential down-regulation of CD28 by B7-1 and B7-2 engagement. *Transplantation* 64, 1497-9.
- Eder, J. P. et coll. (2000). A phase I trial of a recombinant vaccinia virus expressing prostate-specific antigen in advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* 6, 1632-8.
- Eigentler, T. K., Buettner, P. G., Leiter, U., et Garbe, C. (2004). Impact of ulceration in stages I to III cutaneous melanoma as staged by the American Joint Committee on Cancer Staging System: an analysis of the German Central Malignant Melanoma Registry. *J Clin Oncol* 22, 4376-83.
- Elflein, K., Rodriguez-Palmero, M., Kerkau, T., et Hünig, T. (2003). Rapid recovery from T lymphopenia by CD28 superagonist therapy. *Blood* 102, 1764-70.
- Elices, M. J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., Hemler, M. E., et Lobb, R. R. (1990). VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60, 577-84.
- Elpek, K. G., Yolcu, E. S., Franke, D. D. H., Lacelle, C., Schabowsky, R., et Shirwan, H. (2007). Ex vivo expansion of CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling. *J Immunol* 179, 7295-304.

- Emanuel, P. O., Mannion, M., et Phelps, R. G. (2008). Complete regression of primary malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 30, 178-81.
- Erol, N., Oner, U., Artan, S., Isiksoy, S., et Yurdakul, S. (2004). Chromosomal abnormalities, p53 and Bcl-2 expression and clinical outcome in choroidal melanoma. *Melanoma Res* 14, 473-8.
- Fagnoni, F. F., Vescovini, R., Mazzola, M., Bologna, G., Nigro, E., Lavagetto, G., Franceschi, C., Passeri, M., et Sansoni, P. (1996). Expansion of cytotoxic CD8+ CD28- T cells in healthy ageing people, including centenarians. *Immunology* 88, 501-7.
- Fife, B. T., et Bluestone, J. A. (2008). Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev* 224, 166-82.
- Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., et Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23-33.
- Francken, A. B. et coll. (2004). The prognostic importance of tumor mitotic rate confirmed in 1317 patients with primary cutaneous melanoma and long follow-up. *Ann Surg Oncol* 11, 426-33.
- von Freeden-Jeffry, U., Solvason, N., Howard, M., et Murray, R. (1997). The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* 7, 147-54.
- Fujinami, R. S., Herrath, M. G. V., Christen, U., et Whitton, J. L. (2006). Molecular Mimicry, Bystander Activation, or Viral Persistence: Infections and Autoimmune Disease. *Clin Microbiol Rev.* 19, 80-94.
- Futagawa, T., Akiba, H., Kodama, T., Takeda, K., Hosoda, Y., Yagita, H., et Okumura, K. (2002). Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *Int Immunol* 14, 275-86.
- Gao, J., Zhang, H., Bai, X., Wen, J., Zheng, X., Liu, J., Zheng, P., et Liu, Y. (2002). Perinatal blockade of b7-1 and b7-2 inhibits clonal deletion of highly pathogenic autoreactive T cells. *J Exp Med* 195, 959-71.
- Garni-Wagner, B. A., Lee, Z. H., Kim, Y. J., Wilde, C., Kang, C. Y., et Kwon, B. S. (1996). 4-1BB is expressed on CD45RAhiROhi transitional T cell in humans. *Cell Immunol* 169, 91-8.
- Germeau, C. et coll. (2005). High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens. *J Exp Med* 201, 241-8.
- Gervois, N., Labarriere, N., Le Guiner, S., Pandolfino, M., Fonteneau, J., Guilloux, Y., Diez, E., Dreno, B., et Jotereau, F. (2000). High Avidity Melanoma-reactive Cytotoxic T Lymphocytes Are Efficiently Induced from Peripheral Blood Lymphocytes on

Stimulation by Peptide-pulsed Melanoma Cells. *Clin Cancer Res* 6, 1459-1467.

Giannoni, F. et coll. (2005). Clustering of T cell ligands on artificial APC membranes influences T cell activation and protein kinase C theta translocation to the T cell plasma membrane. *J Immunol* 174, 3204-11.

Gimotty, P. A., Guerry, D., Ming, M. E., Elenitsas, R., Xu, X., Czerniecki, B., Spitz, F., Schuchter, L., et Elder, D. (2004). Thin primary cutaneous malignant melanoma: a prognostic tree for 10-year metastasis is more accurate than American Joint Committee on Cancer staging. *J Clin Oncol* 22, 3668-76.

Giuliani, N., Lunghi, P., Morandi, F., Colla, S., Bonomini, S., Hojden, M., Rizzoli, V., et Bonati, A. (2004). Downmodulation of ERK protein kinase activity inhibits VEGF secretion by human myeloma cells and myeloma-induced angiogenesis. *Leukemia* 18, 628-35.

Godet, Y., Moreau-Aubry, A., Guilloux, Y., Vignard, V., Khammari, A., Dreno, B., Jotereau, F., et Labarriere, N. (2008). MELOE-1 is a new antigen overexpressed in melanomas and involved in adoptive T cell transfer efficiency. *J Exp Med* 205, 2673-82.

Goldrath, A. W., Sivakumar, P. V., Glaccum, M., Kennedy, M. K., Bevan, M. J., Benoist, C., Mathis, D., et Butz, E. A. (2002a). Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J Exp Med* 195, 1515-22.

Goldrath, A. W., Sivakumar, P. V., Glaccum, M., Kennedy, M. K., Bevan, M. J., Benoist, C., Mathis, D., et Butz, E. A. (2002b). Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J Exp Med* 195, 1515-22.

Gong, W., Ji, M., Cao, Z., Wang, L., Qian, Y., Hu, M., Qian, L., et Pan, X. (2008). Establishment and characterization of a cell based artificial antigen-presenting cell for expansion and activation of CD8+ T cells ex vivo. *Cell Mol Immunol* 5, 47-53.

Goodwin, R. G. et coll. (1993). Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Eur J Immunol* 23, 2631-41.

Gordon, J. (1995). CD40 and its ligand: central players in B lymphocyte survival, growth, and differentiation. *Blood Rev* 9, 53-6.

Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., et Dustin, M. L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-7.

Gramaglia, I., Cooper, D., Miner, K. T., Kwon, B. S., et Croft, M. (2000). Co-stimulation of antigen-specific CD4 T cells by 4-1BB ligand. *Eur J Immunol* 30, 392-402.

- Granados, S., et Hwang, S. T. (2004). Roles for CD30 in the Biology and Treatment of CD30+ Lymphoproliferative Diseases. *J Invest Dermatol* 122, 1345-1347.
- Gravestain, L. A., Blom, B., Nolten, L. A., de Vries, E., van der Horst, G., Ossendorp, F., Borst, J., et Loenen, W. A. (1993). Cloning and expression of murine CD27: comparison with 4-1BB, another lymphocyte-specific member of the nerve growth factor receptor family. *Eur J Immunol* 23, 943-50.
- Greten, T. F., Slansky, J. E., Kubota, R., Soldan, S. S., Jaffee, E. M., Leist, T. P., Pardoll, D. M., Jacobson, S., et Schneck, J. P. (1998). Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19-specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7568-73.
- Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z., et Rosenberg, S. A. (1982). Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 155, 1823-41.
- Gudmundsdottir, H., Wells, A. D., et Turka, L. A. (1999). Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J Immunol* 162, 5212-23.
- Guillaume, P., Legler, D. F., Boucheron, N., Doucey, M., Cerottini, J., et Luescher, I. F. (2003). Soluble Major Histocompatibility Complex-Peptide Octamers with Impaired CD8 Binding Selectively Induce Fas-dependent Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 4500-4509.
- Ha, S., Mueller, S. N., Wherry, E. J., Barber, D. L., Aubert, R. D., Sharpe, A. H., Freeman, G. J., et Ahmed, R. (2008). Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection. *J Exp Med.* 205, 543-555.
- Habib-Agahi, M., Jaberipour, M., Phan, T. T., et Searle, P. F. (2008). Preferential T cell expansion by artificial antigen presenting cells expressing 4-1BBL alone or in combination with CD80 or CD86. *Iran J Immunol* 5, 136-47.
- Habib-Agahi, M., Phan, T. T., et Searle, P. F. (2007). Co-stimulation with 4-1BB ligand allows extended T-cell proliferation, synergizes with CD80/CD86 and can reactivate anergic T cells. *Int Immunol* 19, 1383-94.
- Halstead, E. S., Mueller, Y. M., Altman, J. D., et Katsikis, P. D. (2002). In vivo stimulation of CD137 broadens primary antiviral CD8+ T cell responses. *Nat Immunol* 3, 536-41.
- Hamaguchi, Y., Hasegawa, M., Matsushita, T., Komura, K., Takehara, K., et Fujimoto, M. (2008). Clinical association of serum CD137 (4-1BB) levels in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18838252> [Accédé Décembre 4, 2008].

- Hamann, D., Baars, P. A., Rep, M. H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S. R., Klein, M. R., et van Lier, R. A. (1997a). Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 186, 1407-18.
- Hamann, D., Baars, P. A., Rep, M. H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S. R., Klein, M. R., et van Lier, R. A. (1997b). Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 186, 1407-18.
- Hammerbeck, C. D., et Mescher, M. F. (2008). Antigen controls IL-7R alpha expression levels on CD8 T cells during full activation or tolerance induction. *J Immunol* 180, 2107-16.
- Hathcock, K. S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P., et Hodes, R. J. (1994). Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med* 180, 631-40.
- Hendriks, J., Xiao, Y., et Borst, J. (2003). CD27 Promotes Survival of Activated T Cells and Complements CD28 in Generation and Establishment of the Effector T Cell Pool. *J Exp Med*. 198, 1369–1380.
- Hendriks, J., Xiao, Y., Rossen, J. W. A., van der Sluijs, K. F., Sugamura, K., Ishii, N., et Borst, J. (2005). During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40 collectively determine formation of CD8<sup>+</sup> memory T cells and their capacity for secondary expansion. *J Immunol* 175, 1665-76.
- Hintzen, R. Q., de Jong, R., Lens, S. M., et van Lier, R. A. (1994). CD27: marker and mediator of T-cell activation? *Immunol Today* 15, 307-11.
- Hirano, F. et coll. (2005). Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res* 65, 1089-96.
- Hislop, A. D., Gudgeon, N. H., Callan, M. F., Fazou, C., Hasegawa, H., Salmon, M., et Rickinson, A. B. (2001). EBV-specific CD8<sup>+</sup> T cell memory: relationships between epitope specificity, cell phenotype, and immediate effector function. *J Immunol* 167, 2019-29.
- Holmström, T. H., Schmitz, I., Söderström, T. S., Poukkula, M., Johnson, V. L., Chow, S. C., Krammer, P. H., et Eriksson, J. E. (2000). MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *EMBO J*. 19, 5418–5428.
- Hsu, C., Hughes, M. S., Zheng, Z., Bray, R. B., Rosenberg, S. A., et Morgan, R. A. (2005). Primary Human T Lymphocytes Engineered with a Codon-Optimized IL-15 Gene Resist Cytokine Withdrawal-Induced Apoptosis and Persist Long-Term in the Absence of Exogenous Cytokine. *J Immunol*. 175, 7226–7234.
- Hsu, C. et coll. (2007). Cytokine-independent growth and clonal expansion of a primary human CD8<sup>+</sup> T-cell clone following retroviral transduction with the IL-15 gene. *Blood* 109, 5168-77.

- Hsueh, E. C., Gupta, R. K., Qi, K., et Morton, D. L. (1998). Correlation of specific immune responses with survival in melanoma patients with distant metastases receiving polyvalent melanoma cell vaccine. *J Clin Oncol* 16, 2913-20.
- Huang, J., Kerstann, K. W., Ahmadzadeh, M., Li, Y. F., El-Gamil, M., Rosenberg, S. A., et Robbins, P. F. (2006). Modulation by IL-2 of CD70 and CD27 Expression on CD8+ T Cells: Importance for the Therapeutic Effectiveness of Cell Transfer Immunotherapy. *J Immunol.* 176, 7726-7735.
- Huang, J., Lo, P., Zal, T., Gascoigne, N. R. J., Smith, B. A., Levin, S. D., et Grey, H. M. (2002). CD28 plays a critical role in the segregation of PKC theta within the immunologic synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9369-73.
- Hughes, M. S. et coll. (2005). Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. *Hum Gene Ther* 16, 457-72.
- Hugues, S., Fetler, L., Bonifaz, L., Helft, J., Amblard, F., et Amigorena, S. (2004). Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol* 5, 1235-42.
- Huppa, J. B., et Davis, M. M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 3, 973-983.
- Hurtado, J. C., Kim, S. H., Pollok, K. E., Lee, Z. H., et Kwon, B. S. (1995). Potential role of 4-1BB in T cell activation. Comparison with the costimulatory molecule CD28. *J Immunol* 155, 3360-7.
- Hurtado, J. C., Kim, Y. J., et Kwon, B. S. (1997). Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *J Immunol* 158, 2600-9.
- Hussein, M. R., Haemel, A. K., et Wood, G. S. (2003). Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J Pathol* 199, 275-88.
- Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., et Kroczek, R. A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-6.
- Hwang, L. N., Yu, Z., Palmer, D. C., et Restifo, N. P. (2006). The in vivo expansion rate of properly stimulated transferred CD8+ T cells exceeds that of an aggressively growing mouse tumor. *Cancer Res* 66, 1132-8.
- Imai, C., Mihara, K., Andreansky, M., Nicholson, I. C., Pui, C., Geiger, T. L., et Campana, D. (2004). Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18, 676-84.
- Isa, A., Kasprowicz, V., Norbeck, O., Loughry, A., Jeffery, K., Broliden, K., Klenerman, P.,

- Tolfvenstam, T., et Bowness, P. (2005). Prolonged activation of virus-specific CD8+T cells after acute B19 infection. *PLoS Med* 2, e343.
- Jabbari, A., et Harty, J. T. (2005). Cutting edge: differential self-peptide/MHC requirement for maintaining CD8 T cell function versus homeostatic proliferation. *J Immunol* 175, 4829-33.
- Janssen, E. M., Droin, N. M., Lemmens, E. E., Pinkoski, M. J., Bensinger, S. J., Ehst, B. D., Griffith, T. S., Green, D. R., et Schoenberger, S. P. (2005). CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434, 88-93.
- Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G., et Schoenberger, S. P. (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421, 852-6.
- Jäger, E. et coll. (2006). Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NY-ESO-1-specific immune responses in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14453-8.
- Ji, H., Liao, G., Faubion, W. A., Abadía-Molina, A. C., Cozzo, C., Laroux, F. S., Caton, A., et Terhorst, C. (2004). Cutting edge: the natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression. *J Immunol* 172, 5823-7.
- Jiang, D., Yue, P. S. E., Drenkard, D., et Schwarz, H. (2008). Induction of proliferation and monocytic differentiation of human CD34+ cells by CD137 ligand signaling. *Stem Cells* 26, 2372-81.
- Jürgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., et Reed, J. C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4997-5002.
- Kaech, S. M., Tan, J. T., Wherry, E. J., Konieczny, B. T., Surh, C. D., et Ahmed, R. (2003). Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 4, 1191-8.
- Kanamaru, F., Youngnak, P., Hashiguchi, M., Nishioka, T., Takahashi, T., Sakaguchi, S., Ishikawa, I., et Azuma, M. (2004). Costimulation via glucocorticoid-induced TNF receptor in both conventional and CD25+ regulatory CD4+ T cells. *J Immunol* 172, 7306-14.
- Kannagi, R. (2002). Regulatory roles of carbohydrate ligands for selectins in the homing of lymphocytes. *Curr Opin Struct Biol* 12, 599-608.
- Kassiotis, G., Zamoyska, R., et Stockinger, B. (2003). Involvement of avidity for major histocompatibility complex in homeostasis of naive and memory T cells. *J Exp Med* 197, 1007-16.

- Kaufman, H. L., Cheung, K., Haskall, Z., Horig, H., Hesdorffer, C., Panicali, D., DeRaffele, G., et Spanknebel, K. (2003). Clinical protocol. Intra-Lesional rF-B7.1 versus rF-TRICOM vaccine in the treatment of metastatic cancer. *Hum Gene Ther* 14, 803-27.
- Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., et Kikutani, H. (1994). The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1, 167-78.
- Kawakami, Y. et coll. (1995). Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J Immunol* 154, 3961-8.
- Khammari, A. et coll. (2007). Long-term follow-up of patients treated by adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 56, 1853-60.
- Kienzle, G., et von Kempis, J. (2000). CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *Int Immunol* 12, 73-82.
- Kim, Y., Brutkiewicz, R. R., et Broxmeyer, H. E. (2002). Role of 4-1BB (CD137) in the functional activation of cord blood CD28-CD8+ T cells. *Blood* 100, 3253-3260.
- Kirchhoff, S., Müller, W. W., Li-Weber, M., et Krammer, P. H. (2000). Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur J Immunol* 30, 2765-74.
- Klebanoff, C. A., Gattinoni, L., et Restifo, N. P. (2006). CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev.* 211, 214-224.
- Klenerman, P., et Hill, A. (2005). T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat Immunol* 6, 873-9.
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R., et Newmeyer, D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-6.
- Knabel, M., Franz, T. J., Schiemann, M., Wulf, A., Villmow, B., Schmidt, B., Bernhard, H., Wagner, H., et Busch, D. H. (2002). Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer. *Nat Med* 8, 631-7.
- Knutson, K. L., et Disis, M. L. (2005). Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 54, 721-8.
- Konno, A. et coll. (2002). CD8alpha alpha memory effector T cells descend directly from clonally expanded CD8alpha +beta high TCRalpha beta T cells in vivo. *Blood* 100,

4090-7.

- Kopf, M., Ruedl, C., Schmitz, N., Gallimore, A., Lefrang, K., Ecabert, B., Odermatt, B., et Bachmann, M. F. (1999). OX40-deficient mice are defective in Th cell proliferation but are competent in generating B cell and CTL Responses after virus infection. *Immunity* 11, 699-708.
- Kortylewski, M., Heinrich, P. C., Kauffmann, M. E., Böhm, M., MacKiewicz, A., et Behrmann, I. (2001). Mitogen-activated protein kinases control p27/Kip1 expression and growth of human melanoma cells. *Biochem J* 357, 297-303.
- Krammer, P. H., Arnold, R., et Lavrik, I. N. (2007). Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 7, 532-42.
- Krinzman, S. J. et coll. (1996). Inhibition of T cell costimulation abrogates airway hyperresponsiveness in a murine model. *J Clin Invest* 98, 2693-9.
- Krueger, A., Fas, S. C., Baumann, S., et Krammer, P. H. (2003). The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev* 193, 58-69.
- Kryczek, I., Wei, S., Zou, L., Zhu, G., Mottram, P., Xu, H., Chen, L., et Zou, W. (2006). Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol* 177, 40-4.
- Kwon, B. et coll. (1999). Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. *J Biol Chem* 274, 6056-61.
- Kwon, B. S., et Weissman, S. M. (1989). cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1963-7.
- Kwon, B. S. et coll. (2002). Immune responses in 4-1BB (CD137)-deficient mice. *J Immunol* 168, 5483-90.
- Kwon, B. S. et coll. (2002). Immune Responses in 4-1BB (CD137)-Deficient Mice. *J Immunol* 168, 5483-5490.
- Labarriere, N., Pandolfino, M. C., Raingeard, D., Le Guiner, S., Diez, E., Le Dréan, E., Dreno, B., et Jotereau, F. (1998). Frequency and relative fraction of tumor antigen-specific T cells among lymphocytes from melanoma-invaded lymph nodes. *Int J Cancer* 78, 209-15.
- Labarrière, N., Bretaudeau, L., Gervois, N., Bodinier, M., Bougras, G., Diez, E., Lang, F., Gregoire, M., et Jotereau, F. (2002). Apoptotic body-loaded dendritic cells efficiently cross-prime cytotoxic T lymphocytes specific for NA17-A antigen but not for Melan-A/MART-1 antigen. *Int J Cancer* 101, 280-6.
- Labarrière, N., Gervois, N., Bonnin, A., Bouquié, R., Jotereau, F., et Lang, F. (2008). PBMC are as good a source of tumor-reactive T lymphocytes as TIL after selection by

- Melan-A/A2 multimer immunomagnetic sorting. *Cancer Immunol. Immunother* 57, 185-95.
- Labarrière, N., Pandolfino, M., Gervois, N., Khammari, A., Tessier, M., Dréno, B., et Jotereau, F. (2002). Therapeutic efficacy of melanoma-reactive TIL injected in stage III melanoma patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 51, 532-538.
- Laderach, D., Wesa, A., et Galy, A. (2003). 4-1BB-ligand is regulated on human dendritic cells and induces the production of IL-12. *Cell Immunol* 226, 37-44.
- Lang, F., et Bodinier, M. (2001). MHC-peptide multimers: tools of choice for detecting and sorting antigen-specific T-cells. *Transfusion* 41, 687-90.
- Lanzavecchia, A., et Sallusto, F. (2002). Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol* 2, 982-7.
- Latouche, J. B., et Sadelain, M. (2000). Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. *Nat Biotechnol* 18, 405-9.
- Lavrik, I., Golks, A., et Krammer, P. H. (2005). Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118, 265-7.
- Le Gal, F. A., Avril, M. F., Bosq, J., Lefebvre, P., Deschemin, J. C., Andrieu, M., Dore, M. X., et Guillet, J. G. (2001). Direct evidence to support the role of antigen-specific CD8(+) T cells in melanoma-associated vitiligo. *J Invest Dermatol* 117, 1464-70.
- Lea, N. C., Orr, S. J., Stoeber, K., Williams, G. H., Lam, E. W., Ibrahim, M. A. A., Mufti, G. J., et Thomas, N. S. B. (2003). Commitment point during G0-->G1 that controls entry into the cell cycle. *Mol Cell Biol* 23, 2351-61.
- Lee, H., Park, S., Choi, B. K., Kim, H. H., Nam, K., et Kwon, B. S. (2002). 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol* 169, 4882-8.
- Lee, J. et coll. (2005). Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of inflammatory bowel disease. *Immunol Lett* 101, 210-6.
- Lee, K. H. et coll. (1998). Functional dissociation between local and systemic immune response during anti-melanoma peptide vaccination. *J Immunol* 161, 4183-94.
- Lee, K., Holdorf, A. D., Dustin, M. L., Chan, A. C., Allen, P. M., et Shaw, A. S. (2002). T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295, 1539-42.
- Lee, P., Chang, C., et Lin, C. (2003). Lipopolysaccharide preferentially induces 4-1BB ligand expression on human monocyte-derived dendritic cells. *Immunol Lett* 90, 215-21.
- van Leeuwen, E. M. M., de Bree, G. J., Remmerswaal, E. B. M., Yong, S., Tesselaar, K., ten

- Berge, I. J. M., et van Lier, R. A. W. (2005). IL-7 receptor alpha chain expression distinguishes functional subsets of virus-specific human CD8+ T cells. *Blood* 106, 2091-8.
- Lefranc, M. (2002). Différenciation des lymphocytes T. <http://www.imgt.org>. Available at: [http://imgt.cines.fr/textes/IMGTeducation/Tutorials/TRandTcells/\\_FR/citer.html](http://imgt.cines.fr/textes/IMGTeducation/Tutorials/TRandTcells/_FR/citer.html) [Accédé Novembre 12, 2008].
- Leiter, U., Buettner, P. G., Eigentler, T. K., et Garbe, C. (2004). Prognostic factors of thin cutaneous melanoma: an analysis of the central malignant melanoma registry of the german dermatological society. *J Clin Oncol* 22, 3660-7.
- Lens, M. B., et Dawes, M. (2004). Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 150, 179-85.
- Lens, S. M., Tesselaar, K., van Oers, M. H., et van Lier, R. A. (1998). Control of lymphocyte function through CD27-CD70 interactions. *Semin Immunol* 10, 491-9.
- Levy, C., Khaled, M., et Fisher, D. E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 12, 406-14.
- Li, J., Huston, G., et Swain, S. L. (2003). IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J Exp Med* 198, 1807-15.
- Li, Y., Zhi, W., Wareski, P., et Weng, N. (2005). IL-15 activates telomerase and minimizes telomere loss and may preserve the replicative life span of memory CD8+ T cells in vitro. *J Immunol* 174, 4019-24.
- Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3, 361-70.
- Lin, C., et H?nig, T. (2003). Efficient expansion of regulatory T cells <I>in vitro</I> and <I>in vivo</I> with a CD28 superagonist. *European Journal of Immunology* 33, 626-638.
- Lin, W. et coll. (2008). Fc-dependent expression of CD137 on human NK cells: insights into "agonistic" effects of anti-CD137 monoclonal antibodies. *Blood* 112, 699-707.
- Lindsey, K. R. et coll. (2006). Evaluation of prime/boost regimens using recombinant poxvirus/tyrosinase vaccines for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 12, 2526-37.
- Lindstedt, M., Johansson-Lindbom, B., et Borrebaeck, C. A. K. (2003). Expression of CD137 (4-1BB) on human follicular dendritic cells. *Scand J Immunol* 57, 305-10.
- Linsley, P. S., Bradshaw, J., Urnes, M., Grosmaire, L., et Ledbetter, J. A. (1993). CD28 engagement by B7/BB-1 induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to CD28 signaling. *J Immunol* 150, 3161-9.

- Linton, P., Bautista, B., Biederman, E., Bradley, E. S., Harbertson, J., Kondrack, R. M., Padrick, R. C., et Bradley, L. M. (2003). Costimulation via OX40L expressed by B cells is sufficient to determine the extent of primary CD4 cell expansion and Th2 cytokine secretion in vivo. *J Exp Med* 197, 875-83.
- Liu, X., Bai, X. F., Wen, J., Gao, J. X., Liu, J., Lu, P., Wang, Y., Zheng, P., et Liu, Y. (2001). B7H costimulates clonal expansion of, and cognate destruction of tumor cells by, CD8(+) T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 194, 1339-48.
- Lodolce, J. P., Boone, D. L., Chai, S., Swain, R. E., Dassopoulos, T., Trettin, S., et Ma, A. (1998). IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9, 669-76.
- Longthorne, V. L., et Williams, G. T. (1997). Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *EMBO J* 16, 3805-12.
- Lurquin, C., Lethé, B., De Plaen, E., Corbière, V., Théate, I., van Baren, N., Coulie, P. G., et Boon, T. (2005). Contrasting frequencies of antitumor and anti-vaccine T cells in metastases of a melanoma patient vaccinated with a MAGE tumor antigen. *J Exp Med* 201, 249-57.
- Lynch, D. H. (2008). The promise of 4-1BB (CD137)-mediated immunomodulation and the immunotherapy of cancer. *Immunol Rev* 222, 277-86.
- Mackensen, A., Carcelain, G., Viel, S., Raynal, M. C., Michalaki, H., Triebel, F., Bosq, J., et Hercend, T. (1994). Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma. *J Clin Invest.* 93, 1397-1402.
- Mackensen, A., Meidenbauer, N., Vogl, S., Laumer, M., Berger, J., et Andreesen, R. (2006). Phase I Study of Adoptive T-Cell Therapy Using Antigen-Specific CD8+ T Cells for the Treatment of Patients With Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 24, 5060-5069.
- Maczek, C., Berger, T. G., Schuler-Thurner, B., Schultz, E. S., Hamann, A., Dunbar, P. R., Cerundolo, V., Steinkasserer, A., et Schuler, G. (2005). Differences in phenotype and function between spontaneously occurring melan-A-, tyrosinase- and influenza matrix peptide-specific CTL in HLA-A\*0201 melanoma patients. *Int J Cancer* 115, 450-5.
- Madakamutil, L. T. et coll. (2004). CD8alpha-mediated survival and differentiation of CD8 memory T cell precursors. *Science* 304, 590-3.
- Maldonado, J. L. et coll. (2003). Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst* 95, 1878-90.
- Malissen, M., Trucy, J., Jouvin-Marche, E., Cazenave, P. A., Scollay, R., et Malissen, B. (1992). Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunol Today* 13, 315-22.

- Mandruzzato, S. et coll. (2002). Large and Dissimilar Repertoire of Melan-A/MART-1-Specific CTL in Metastatic Lesions and Blood of a Melanoma Patient. *J Immunol* 169, 4017-4024.
- Marinari, B., Costanzo, A., Marzano, V., Piccolella, E., et Tuosto, L. (2004). CD28 delivers a unique signal leading to the selective recruitment of RelA and p52 NF- $\kappa$ B subunits on IL-8 and Bcl-xL gene promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 6098–6103.
- Marks-Konczalik, J., Dubois, S., Losi, J. M., Sabzevari, H., Yamada, N., Feigenbaum, L., Waldmann, T. A., et Tagaya, Y. (2000). IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 11445–11450.
- Marrack, P. et coll. (2000). Homeostasis of alpha beta TCR+ T cells. *Nat Immunol* 1, 107-11.
- Mason, D. (1998). A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today* 19, 395-404.
- Masopust, D., Kaech, S. M., Wherry, E. J., et Ahmed, R. (2004). The role of programming in memory T-cell development. *Curr Opin Immunol* 16, 217-25.
- Maus, M. V., Thomas, A. K., Leonard, D. G., Allman, D., Addya, K., Schlienger, K., Riley, J. L., et June, C. H. (2002). Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB. *Nat Biotech* 20, 143-148.
- Mazo, I. B. et coll. (2005). Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T cells. *Immunity* 22, 259-70.
- McAdam, A. J., Greenwald, R. J., Levin, M. A., Chernova, T., Malenkovich, N., Ling, V., Freeman, G. J., et Sharpe, A. H. (2001). ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 409, 102-5.
- McGill, G. G. et coll. (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* 109, 707-18.
- McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M., et Byrne, M. C. (2002). CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells: Gene Expression Analysis Reveals a Functional Role for the Glucocorticoid-Induced TNF Receptor. *Immunity* 16, 311-323.
- McNamara, J. O. ,, Kolonias, D., Pastor, F., Mittler, R. S., Chen, L., Giangrande, P. H., Sullenger, B., et Gilboa, E. (2008). Multivalent 4-1BB binding aptamers costimulate CD8+ T cells and inhibit tumor growth in mice . *J Clin Invest.* 118, 376-386.
- Meidenbauer, N., Marienhagen, J., Laumer, M., Vogl, S., Heymann, J., Andreesen, R., et Mackensen, A. (2003). Survival and Tumor Localization of Adoptively

- Transferred Melan-A-Specific T Cells in Melanoma Patients . *J Immunol* 170, 2161-2169.
- Meidenbauer, N. et coll. (2004). High Frequency of Functionally Active Melan-A-Specific T Cells in a Patient with Progressive Immunoproteasome-Deficient Melanoma. *Cancer Res* 64, 6319-6326.
- Melero, I., Johnston, J. V., Shufford, W. W., Mittler, R. S., et Chen, L. (1998). NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cell Immunol* 190, 167-72.
- Melero, I., Shuford, W. W., Newby, S. A., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., Hellström, K. E., Mittler, R. S., et Chen, L. (1997). Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* 3, 682-5.
- Mempel, T. R., Pittet, M. J., Khazaie, K., Weninger, W., Weissleder, R., von Boehmer, H., et von Andrian, U. H. (2006). Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity* 25, 129-41.
- Mempel, T. R., Henrickson, S. E., et von Andrian, U. H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154-159.
- Michel, J., Langstein, J., Hofstädter, F., et Schwarz, H. (1998). A soluble form of CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, is released by activated lymphocytes and is detectable in sera of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 28, 290-5.
- Michel, J., et Schwarz, H. (2000). Expression of soluble CD137 correlates with activation-induced cell death of lymphocytes. *Cytokine* 12, 742-6.
- Michel, J., Pauly, S., Langstein, J., Krammer, P. H., et Schwarz, H. (1999). CD137-induced apoptosis is independent of CD95. *Immunology* 98, 42-46.
- Millán, J., Hewlett, L., Glyn, M., Toomre, D., Clark, P., et Ridley, A. J. (2006). Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol* 8, 113-23.
- Miller, R. E., Jones, J., Le, T., Whitmore, J., Boiani, N., Gliniak, B., et Lynch, D. H. (2002). 4-1BB-specific monoclonal antibody promotes the generation of tumor-specific immune responses by direct activation of CD8 T cells in a CD40-dependent manner. *J Immunol* 169, 1792-800.
- Modjtahedi, N., Giordanetto, F., Madeo, F., et Kroemer, G. (2006). Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol* 16, 264-72.
- Moebius, U., Kober, G., Griscelli, A. L., Hercend, T., et Meuer, S. C. (1991). Expression of different CD8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations. *Eur J*

Immunol 21, 1793-800.

- Moran, M., et Miceli, M. C. (1998). Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation. *Immunity* 9, 787-96.
- Morel, Y. et coll. (2000). Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor. *J Immunol* 165, 4397-404.
- Morel, Y., Truneh, A., Sweet, R. W., Olive, D., et Costello, R. T. (2001). The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD40 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity. *J Immunol* 167, 2479-86.
- Morgan, R. A. et coll. (2006). Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science*. 314, 126–129.
- Moshinsky, D. J., et Wogan, G. N. (1997). UV-induced mutagenesis of human p53 in a vector replicated in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2266-71.
- Mueller, Y. M., Makar, V., Bojczuk, P. M., Witek, J., et Katsikis, P. D. (2003). IL-15 enhances the function and inhibits CD95/Fas-induced apoptosis of human CD4+ and CD8+ effector-memory T cells. *Int Immunol* 15, 49-58.
- Murali-Krishna, K., Lau, L. L., Sambhara, S., Lemonnier, F., Altman, J., et Ahmed, R. (1999). Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 286, 1377-81.
- Murata, K., Ishii, N., Takano, H., Miura, S., Ndhlovu, L. C., Nose, M., Noda, T., et Sugamura, K. (2000). Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. *J Exp Med* 191, 365-74.
- Müller, N., Brandt, J. V. D., Odoardi, F., Tischner, D., Herath, J., Flügel, A., et Reichardt, H. M. (2008). A CD28 superagonistic antibody elicits 2 functionally distinct waves of T cell activation in rats. *J Clin Invest*. 118, 1405–1416.
- Myers, L., Lee, S. W., Rossi, R. J., Lefrancois, L., Kwon, B. S., Mittler, R. S., Croft, M., et Vella, A. T. (2006). Combined CD137 (4-1BB) and adjuvant therapy generates a developing pool of peptide-specific CD8 memory T cells. *Int Immunol* 18, 325-33.
- Nathan, F. E., et Mastrangelo, M. J. (1998). Systemic therapy in melanoma. *Semin Surg Oncol* 14, 319-27.
- Neudorfer, J. et coll. (2007). Reversible HLA multimers (Streptamers) for the isolation of human cytotoxic T lymphocytes functionally active against tumor- and virus-derived antigens. *J Immunol Methods* 320, 119-31.
- Nishimura, H., Agata, Y., Kawasaki, A., Sato, M., Imamura, S., Minato, N., Yagita, H.,

- Nakano, T., et Honjo, T. (1996). Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes. *Int Immunol* 8, 773-80.
- Nocentini, G., et Riccardi, C. (2005). GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Eur J Immunol* 35, 1016-22.
- Norcross, M. A. (1984). A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann Immunol (Paris)* 135D, 113-34.
- Oelke, M., Maus, M. V., Didiano, D., June, C. H., Mackensen, A., et Schneck, J. P. (2003). Ex vivo induction and expansion of antigen-specific cytotoxic T cells by HLA-Ig-coated artificial antigen-presenting cells. *Nat Med* 9, 619-24.
- Oh, S., Perera, L. P., Terabe, M., Ni, L., Waldmann, T. A., et Berzofsky, J. A. (2008). IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5201-6.
- Ohshima, Y., Tanaka, Y., Tozawa, H., Takahashi, Y., Maliszewski, C., et Delespesse, G. (1997). Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol* 159, 3838-48.
- Olofsson, P. S. et coll. (2008). CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 117, 1292-301.
- Omholt, K., Kröckel, D., Ringborg, U., et Hansson, J. (2006). Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 16, 197-200.
- Overwijk, W. W. et coll. (2003). Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells. *J Exp Med* 198, 569-80.
- P. Anton van der Merwe, et Simon J. Davis (2003). MOLECULAR INTERACTIONS MEDIATING T CELL ANTIGEN RECOGNITION. Available at: <http://arjournals.annualreviews.org.gate2.inist.fr/doi/full/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141036?prevSearch=%28Molecular+interactions+mediating+T+cell+antigen+recognition%29+AND+%5Bjournal%3A+immunol%5D> [Accédé Novembre 26, 2008].
- Pandolfino, M. C., Labarrière, N., Tessier, M. H., Cassidanius, A., Bercegeay, S., Lemarre, P., Dehaut, F., Dréno, B., et Jotereau, F. (2001). High-scale expansion of melanoma-reactive TIL by a polyclonal stimulus: predictability and relation with disease advancement. *Cancer Immunol Immunother* 50, 134-40.
- Papagno, L. et coll. (2004). Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol* 2, E20.
- Papanicolaou, G. A., Latouche, J., Tan, C., Dupont, J., Stiles, J., Pamer, E. G., et Sadelain, M.

- (2003). Rapid expansion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells expressing a single HLA allele. *Blood* 102, 2498-505.
- Park, J., Yu, Q., Erman, B., Appelbaum, J. S., Montoya-Durango, D., Grimes, H. L., et Singer, A. (2004). Suppression of IL7 $\alpha$  transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* 21, 289-302.
- Parmiani, G., Sensi, M., Castelli, C., Rivoltini, L., et Anichini, A. (2002). T-cell response to unique and shared antigens and vaccination of cancer patients. *Cancer Immun* 2, 6.
- Patrick, R. J., Fenske, N. A., et Messina, J. L. (2007). Primary mucosal melanoma. *J Am Acad Dermatol* 56, 828-34.
- Pauly, S., Broll, K., Wittmann, M., Giegerich, G., et Schwarz, H. (2002). CD137 is expressed by follicular dendritic cells and costimulates B lymphocyte activation in germinal centers. *J Leukoc Biol* 72, 35-42.
- PAWELEC, G., MARIANI, E., McLEOD, J., BEN-YEHUDA, A., F?L?P, T., ARINGER, M., et BARNETT, Y. (2004). Engineering Anticancer T Cells for Extended Functional Longevity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1019, 178-185.
- Peterson, A. C., Harlin, H., et Gajewski, T. F. (2003). Immunization with Melan-A peptide-pulsed peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin-12 induces clinical activity and T-cell responses in advanced melanoma. *J Clin Oncol* 21, 2342-8.
- Pilla, L. et coll. (2006). A phase II trial of vaccination with autologous, tumor-derived heat-shock protein peptide complexes Gp96, in combination with GM-CSF and interferon-alpha in metastatic melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 55, 958-68.
- Pittet, M. J. et coll. (2001). Expansion and functional maturation of human tumor antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells after vaccination with antigenic peptide. *Clin Cancer Res* 7, 796s-803s.
- Pittet, M. J. et coll. (1999). High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J. Exp. Med* 190, 705-15.
- Pittet, M. J. et coll. (2003).  $\alpha$ 3 Domain Mutants of Peptide/MHC Class I Multimers Allow the Selective Isolation of High Avidity Tumor-Reactive CD8 T Cells. *J Immunol* 171, 1844-1849.
- Plunkett, F. J. et coll. (2007). The Loss of Telomerase Activity in Highly Differentiated CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> T Cells Is Associated with Decreased Akt (Ser473) Phosphorylation. *J Immunol* 178, 7710-7719.

- Polic, B., Kunkel, D., Scheffold, A., et Rajewsky, K. (2001). How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8744-9.
- Pollock, P. M. et coll. (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 33, 19-20.
- Pollok, K. E., Kim, Y. J., Hurtado, J., Zhou, Z., Kim, K. K., et Kwon, B. S. (1994). 4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulates anti-mu-primed splenic B cells. *Eur J Immunol* 24, 367-74.
- Pollok, K. E., Kim, Y. J., Zhou, Z., Hurtado, J., Kim, K. K., Pickard, R. T., et Kwon, B. S. (1993). Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J Immunol* 150, 771-81.
- Powell, D. J., Dudley, M. E., Hogan, K. A., Wunderlich, J. R., et Rosenberg, S. A. (2006). Adoptive transfer of vaccine-induced peripheral blood mononuclear cells to patients with metastatic melanoma following lymphodepletion. *J Immunol* 177, 6527-39.
- Powell, D. J., et Rosenberg, S. A. (2004). Phenotypic and functional maturation of tumor antigen-reactive CD8+ T lymphocytes in patients undergoing multiple course peptide vaccination. *J Immunother* 27, 36-47.
- Powell, D. J., Dudley, M. E., Robbins, P. F., et Rosenberg, S. A. (2005). Transition of late-stage effector T cells to CD27+ CD28+ tumor-reactive effector memory T cells in humans after adoptive cell transfer therapy. *Blood* 105, 241-250.
- Prakken, B., Wauben, M., Genini, D., Samodal, R., Barnett, J., Mendivil, A., Leoni, L., et Albani, S. (2000). Artificial antigen-presenting cells as a tool to exploit the immune 'synapse'. *Nat Med* 6, 1406-10.
- Pulle, G., Vidric, M., et Watts, T. H. (2006a). IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen-independent CD8 memory T cell survival. *J Immunol* 176, 2739-48.
- Pulle, G., Vidric, M., et Watts, T. H. (2006b). IL-15-Dependent Induction of 4-1BB Promotes Antigen-Independent CD8 Memory T Cell Survival. *J Immunol* 176, 2739-2748.
- Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M., et Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3, 287-96.
- Py, B., Slomianny, C., Auberger, P., Petit, P. X., et Benichou, S. (2004). Siva-1 and an alternative splice form lacking the death domain, Siva-2, similarly induce apoptosis in T lymphocytes via a caspase-dependent mitochondrial pathway. *J Immunol* 172, 4008-17.

Rabu C., T. (2005). UNIVERSITE DE NANTES.

Rabu, C., Quemener, A., Jacques, Y., Echasserieau, K., Vusio, P., et Lang, F. (2005). Production of Recombinant Human Trimeric CD137L (4-1BBL): CROSS-LINKING IS ESSENTIAL TO ITS T CELL CO-STIMULATION ACTIVITY. *J. Biol. Chem.* 280, 41472-41481.

Ragnarsson-Olding, B. K., Karsberg, S., Platz, A., et Ringborg, U. K. (2002). Mutations in the TP53 gene in human malignant melanomas derived from sun-exposed skin and unexposed mucosal membranes. *Melanoma Res* 12, 453-63.

Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A., et Stevanović, S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-9.

Refaeli, Y., Van Parijs, L., London, C. A., Tschopp, J., et Abbas, A. K. (1998). Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* 8, 615-23.

Reichert, P., Reinhardt, R. L., Ingulli, E., et Jenkins, M. K. (2001). Cutting edge: in vivo identification of TCR redistribution and polarized IL-2 production by naive CD4 T cells. *J Immunol* 166, 4278-81.

Reifenberger, J., Knobbe, C. B., Wolter, M., Blaschke, B., Schulte, K. W., Pietsch, T., Ruzicka, T., et Reifenberger, G. (2002). Molecular genetic analysis of malignant melanomas for aberrations of the WNT signaling pathway genes CTNNB1, APC, ICAT and BTRC. *Int J Cancer* 100, 549-56.

Révillard, J., et Assim (2001). *immunologie* 4 éd. (De Boeck Université).

Robbins, P. F., Dudley, M. E., Wunderlich, J., El-Gamil, M., Li, Y. F., Zhou, J., Huang, J., Jr, D. J. P., et Rosenberg, S. A. (2004). Cutting Edge: Persistence of Transferred Lymphocyte Clonotypes Correlates with Cancer Regression in Patients Receiving Cell Transfer Therapy. *J Immunol.* 173, 7125–7130.

Romagnani, S., Del Prete, G., Maggi, E., Chilosi, M., Caligaris-Cappio, F., et Pizzolo, G. (1995a). CD30 and type 2 T helper (Th2) responses. *J Leukoc Biol* 57, 726-30.

Romagnani, S., Del Prete, G., Maggi, E., Chilosi, M., Caligaris-Cappio, F., et Pizzolo, G. (1995b). CD30 and type 2 T helper (Th2) responses. *J Leukoc Biol* 57, 726-30.

Romero, P. et coll. (2007). Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 178, 4112-9.

Rooney, I. A., Butrovich, K. D., Glass, A. A., Borboroglu, S., Benedict, C. A., Whitbeck, J. C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., et Ware, C. F. (2000). The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells. *J Biol Chem* 275, 14307-15.

- Rosenberg, S. A. et coll. (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 316, 889-97.
- Rosenberg, S. A. et coll. (1993). Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst* 85, 622-32.
- Rosenberg, S. A. et coll. (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 319, 1676-80.
- Rosenberg, S. A., Spiess, P., et Lafreniere, R. (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233, 1318-21.
- Rosenberg, S. A. et coll. (1998). Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4, 321-7.
- Rosenberg, S. A. et coll. (1994). Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* 86, 1159-66.
- Rosenberg, S. A. et coll. (1998). Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. *J Natl Cancer Inst* 90, 1894-900.
- Rosenberg, S. A. et coll. (2005). Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma. *J Immunol* 175, 6169-76.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., et Restifo, N. P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10, 909-15.
- Rosenberg, S. A. et coll. (2003). Inability to immunize patients with metastatic melanoma using plasmid DNA encoding the gp100 melanoma-melanocyte antigen. *Hum Gene Ther* 14, 709-14.
- Rosenwald, A. et coll. (2003). Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 198, 851-62.
- Rudolf, D. et coll. (2008). Potent costimulation of human CD8 T cells by anti-4-1BB and anti-CD28 on synthetic artificial antigen presenting cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 57, 175-183.
- Sabbagh, L., Srokowski, C. C., Pulle, G., Snell, L. M., Sedgmen, B. J., Liu, Y., Tsitsikov, E. N., et Watts, T. H. (2006). A critical role for TNF receptor-associated factor 1 and Bim

- down-regulation in CD8 memory T cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 18703–18708.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., et Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-12.
- Salter, R. D. et coll. (1990). A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature* 345, 41-6.
- Sanchez-Lockhart, M., et Miller, J. (2006). Engagement of CD28 outside of the immunological synapse results in up-regulation of IL-2 mRNA stability but not IL-2 transcription. *J Immunol* 176, 4778-84.
- Sansom, D. M. (2000). CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology*. 101, 169–177.
- Saoulli, K. et coll. (1998). CD28-independent, TRAF2-dependent Costimulation of Resting T Cells by 4-1BB Ligand . *J Exp Med*. 187, 1849–1862.
- Sasse, A. D., Sasse, E. C., Clark, L. G. O., Ulloa, L., et Clark, O. A. C. (2007). Chemoimmunotherapy versus chemotherapy for metastatic malignant melanoma. *Cochrane Database Syst Rev*, CD005413.
- Sato, N., Patel, H. J., Waldmann, T. A., et Tagaya, Y. (2007). The IL-15/IL-15Ralpha on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 588-93.
- Sauce, D. et coll. (2002). Retrovirus-mediated gene transfer in primary T lymphocytes impairs their anti-Epstein-Barr virus potential through both culture-dependent and selection process-dependent mechanisms. *Blood* 99, 1165-73.
- Savage, C. O., Hughes, C. C., McIntyre, B. W., Picard, J. K., et Pober, J. S. (1993). Human CD4+ T cells proliferate to HLA-DR+ allogeneic vascular endothelium. Identification of accessory interactions. *Transplantation* 56, 128-34.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., et Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17, 1675-87.
- Schluns, K. S., et Lefrançois, L. (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol* 3, 269-79.
- Schmidt, J., Elflein, K., Stienekemeier, M., Rodriguez-Palmero, M., Schneider, C., Toyka, K. V., Gold, R., et Hünig, T. (2003). Treatment and prevention of experimental autoimmune neuritis with superagonistic CD28-specific monoclonal antibodies. *J Neuroimmunol* 140, 143-52.
- Scholer, A., Hugues, S., Boissonnas, A., Fetler, L., et Amigorena, S. (2008). Intercellular

- adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8<sup>+</sup> T cell memory. *Immunity* 28, 258-70.
- Schönland, S. O., Zimmer, J. K., Lopez-Benitez, C. M., Widmann, T., Ramin, K. D., Goronzy, J. J., et Weyand, C. M. (2003). Homeostatic control of T-cell generation in neonates. *Blood* 102, 1428-34.
- Schreiber, H., Wu, T. H., Nachman, J., et Kast, W. M. (2002). Immunodominance and tumor escape. *Semin Cancer Biol* 12, 25-31.
- Schwarz, H., Blanco, F. J., von Kempis, J., Valbracht, J., et Lotz, M. (1996). ILA, a member of the human nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family, regulates T-lymphocyte proliferation and survival. *Blood* 87, 2839-45.
- Schwarz, H., Tuckwell, J., et Lotz, M. (1993). A receptor induced by lymphocyte activation (ILA): a new member of the human nerve-growth-factor/tumor-necrosis-factor receptor family. *Gene* 134, 295-8.
- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F., et Ohashi, P. S. (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 17, 829-74.
- Sedy, J. R. et coll. (2005). B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol* 6, 90-8.
- Seo, S. K., Choi, J. H., Kim, Y. H., Kang, W. J., Park, H. Y., Suh, J. H., Choi, B. K., Vinay, D. S., et Kwon, B. S. (2004). 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 10, 1088-94.
- Seshasayee, D. et coll. (2007). In vivo blockade of OX40 ligand inhibits thymic stromal lymphopoietin driven atopic inflammation. *J Clin Invest.* 117, 3868–3878.
- Shahinian, A. et coll. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261, 609-12.
- Sharief, M. K. (2002). Heightened intrathecal release of soluble CD137 in patients with multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 9, 49-54.
- Sharpe, A. H., et Freeman, G. J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2, 116-26.
- Shevach, E. M., et Stephens, G. L. (2006). The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat Rev Immunol* 6, 613-8.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., et Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163, 5211-8.
- Shu, L., Yin, W., Zhuang, H., et Hua, Z. (2006). Comparison of gene expression profiles in mouse primary T cells under normal and prolonged activation. *Blood Cells Mol*

Dis 37, 64-75.

Simons, K., et Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-72.

Simons, K., et Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-9.

Singer, S. J., et Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-31.

Slingluff, C. L. et coll. (2003). Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *J Clin Oncol* 21, 4016-26.

Smalley, K. S. M. (2003). A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int J Cancer* 104, 527-32.

Smith, C. L. et coll. (2005). Recombinant modified vaccinia Ankara primes functionally activated CTL specific for a melanoma tumor antigen epitope in melanoma patients with a high risk of disease recurrence. *Int J Cancer* 113, 259-66.

Smith, K. A. (1988). Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 240, 1169-76.

de Snoo, F. A., et Hayward, N. K. (2005). Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes. *Cancer Lett* 230, 153-86.

So, T., Lee, S., et Croft, M. (2006). Tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor family members that positively regulate immunity. *Int J Hematol* 83, 1-11.

Souques, M. (1999). [Lifetime probability of developing a melanoma in the Ile-de-France in 1994]. *Ann Dermatol Venereol* 126, 327-30.

Speiser, D. E., Bachmann, M. F., Shahinian, A., Mak, T. W., et Ohashi, P. S. (1997). Acute graft-versus-host disease without costimulation via CD28. *Transplantation* 63, 1042-4.

Speiser, D. E., Miranda, R., Zakarian, A., Bachmann, M. F., McKall-Faienza, K., Odermatt, B., Hanahan, D., Zinkernagel, R. M., et Ohashi, P. S. (1997). Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *J Exp Med* 186, 645-53.

Spinicelli, S., Nocentini, G., Ronchetti, S., Krausz, L. T., Bianchini, R., et Riccardi, C. (2002). GITR interacts with the pro-apoptotic protein Siva and induces apoptosis. *Cell Death Differ* 9, 1382-4.

Sprent, J., Judge, A. D., et Zhang, X. (2002). Cytokines and memory-phenotype CD8+ cells. *Adv Exp Med Biol* 512, 147-53.

- Springer, T. A., et Lasky, L. A. (1991). Cell adhesion. Sticky sugars for selectins. *Nature* 349, 196-7.
- Stahl, J. M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J. Q., Bosenberg, M. W., Kester, M., Sandirasegarane, L., et Robertson, G. P. (2004). Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* 64, 7002-10.
- Stang, A., Parkin, D. M., Ferlay, J., et Jöckel, K. (2005). International uveal melanoma incidence trends in view of a decreasing proportion of morphological verification. *Int J Cancer* 114, 114-23.
- Stärck, L., Scholz, C., Dörken, B., et Daniel, P. T. (2005). Costimulation by CD137/4-1BB inhibits T cell apoptosis and induces Bcl-xL and c-FLIP(short) via phosphatidylinositol 3-kinase and AKT/protein kinase B. *Eur J Immunol* 35, 1257-66.
- Stephens, G. L., McHugh, R. S., Whitters, M. J., Young, D. A., Luxenberg, D., Carreno, B. M., Collins, M., et Shevach, E. M. (2004). Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 173, 5008-20.
- van Stipdonk, M. J., Lemmens, E. E., et Schoenberger, S. P. (2001). Naïve CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* 2, 423-9.
- Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5, 189-200.
- Streuli, M., Hall, L. R., Saga, Y., Schlossman, S. F., et Saito, H. (1987). Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens. *J Exp Med* 166, 1548-66.
- Sun, J. C., et Bevan, M. J. (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300, 339-42.
- Sun, J. C., Lehar, S. M., et Bevan, M. J. (2006). Augmented IL-7 signaling during viral infection drives greater expansion of effector T cells but does not enhance memory. *J Immunol* 177, 4458-63.
- Sun, J. C., Williams, M. A., et Bevan, M. J. (2004). CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nat Immunol* 5, 927-33.
- Suntharalingam, G., Perry, M. R., Ward, S., Brett, S. J., Castello-Cortes, A., Brunner, M. D., et Panoskaltsis, N. (2006). Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of the Anti-CD28 Monoclonal Antibody TGN1412. *N Engl J Med* 355, 1018-1028.
- Takahashi, C., Mittler, R. S., et Vella, A. T. (1999). Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T

- cell survival signal. *J Immunol* 162, 5037-40.
- Tan, J. T., Whitmire, J. K., Ahmed, R., Pearson, T. C., et Larsen, C. P. (1999). 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J Immunol* 163, 4859-68.
- Taraban, V. Y., Rowley, T. F., O'Brien, L., Chan, H. T. C., Haswell, L. E., Green, M. H. A., Tutt, A. L., Glennie, M. J., et Al-Shamkhani, A. (2002). Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses. *Eur J Immunol* 32, 3617-27.
- Tarkowski, M. (2003). Expression and a role of CD30 in regulation of T-cell activity. *Curr Opin Hematol* 10, 267-71.
- Tesselaar, K., Arens, R., van Schijndel, G. M. W., Baars, P. A., van der Valk, M. A., Borst, J., van Oers, M. H. J., et van Lier, R. A. W. (2003). Lethal T cell immunodeficiency induced by chronic costimulation via CD27-CD70 interactions. *Nat Immunol* 4, 49-54.
- Tham, E. L., Jensen, P. L., et Mescher, M. F. (2001). Activation of antigen-specific T cells by artificial cell constructs having immobilized multimeric peptide-class I complexes and recombinant B7-Fc proteins. *J Immunol Methods* 249, 111-9.
- Thimme, R. et coll. (2005). Increased expression of the NK cell receptor KLRG1 by virus-specific CD8 T cells during persistent antigen stimulation. *J Virol* 79, 12112-6.
- Timmerman, J. M. et coll. (2002). Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 99, 1517-26.
- Tone, M., Tone, Y., Adams, E., Yates, S. F., Frewin, M. R., Cobbold, S. P., et Waldmann, H. (2003). Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15059-64.
- Topp, M. S., Riddell, S. R., Akatsuka, Y., Jensen, M. C., Blattman, J. N., et Greenberg, P. D. (2003). Restoration of CD28 Expression in CD28- CD8+ Memory Effector T Cells Reconstitutes Antigen-induced IL-2 Production. *J. Exp. Med.* 198, 947-955.
- Tromme, I. (2007). ÉPIDÉMIOLOGIE, FACTEURS DE RISQUE ET DÉPISTAGE DU MÉLANOME.
- Trowbridge, I. S., et Thomas, M. L. (1994). CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 12, 85-116.
- Tseng, S. Y. et coll. (2001). B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 193, 839-46.
- Turner, J. M., Brodsky, M. H., Irving, B. A., Levin, S. D., Perlmutter, R. M., et Littman, D. R.

- (1990). Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* 60, 755-65.
- Vallejo, A. N., Schirmer, M., Weyand, C. M., et Goronzy, J. J. (2000). Clonality and longevity of CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> T cells are associated with defects in apoptotic pathways. *J Immunol* 165, 6301-7.
- Valmori, D. et coll. (2002). Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity. *Cancer Res* 62, 1743-50.
- Valmori, D. et coll. (2007). Vaccination with NY-ESO-1 protein and CpG in Montanide induces integrated antibody/Th1 responses and CD8 T cells through cross-priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8947-8952.
- Van Parijs, L., Refaeli, Y., Lord, J. D., Nelson, B. H., Abbas, A. K., et Baltimore, D. (1999). Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity* 11, 281-8.
- Van Pel, A., et Boon, T. (1982). Protection against a nonimmunogenic mouse leukemia by an immunogenic variant obtained by mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 4718-22.
- Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M., et Bolen, J. B. (1988). The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 55, 301-8.
- Vence, L., Palucka, A. K., Fay, J. W., Ito, T., Liu, Y., Banchereau, J., et Ueno, H. (2007). Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20884-9.
- Venesio, T. et coll. (2008). In melanocytic lesions the fraction of BRAF V600E alleles is associated with sun exposure but unrelated to ERK phosphorylation. *Mod Pathol* 21, 716-26.
- Vignard, V. et coll. (2005). Adoptive Transfer of Tumor-Reactive Melan-A-Specific CTL Clones in Melanoma Patients Is Followed by Increased Frequencies of Additional Melan-A-Specific T Cells. *J Immunol* 175, 4797-4805.
- Vinay, D. S., et Kwon, B. S. (1998). Role of 4-1BB in immune responses. *Semin. Immunol* 10, 481-9.
- Vinay, D. S., Wolisi, G. O., Yu, K., Choi, B. K., et Kwon, B. S. (2003). Immunity in the absence of CD28 and CD137 (4-1BB) molecules. *Immunol Cell Biol* 81, 176-84.
- Vivier, E., et Daëron, M. (1997). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today* 18, 286-91.

- Wallace, D. L., Bérard, M., Soares, M. V. D., Oldham, J., Cook, J. E., Akbar, A. N., Tough, D. F., et Beverley, P. C. L. (2006). Prolonged exposure of naïve CD8+ T cells to interleukin-7 or interleukin-15 stimulates proliferation without differentiation or loss of telomere length. *Immunology* 119, 243-53.
- Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y., Linsley, P. S., Freeman, G. J., Green, J. M., Thompson, C. B., et Bluestone, J. A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1, 405-13.
- Wan, Y. Y., et DeGregori, J. (2003). The survival of antigen-stimulated T cells requires NFkappaB-mediated inhibition of p73 expression. *Immunity* 18, 331-42.
- Wang, C., Wen, T., Routy, J., Bernard, N. F., Sekaly, R. P., et Watts, T. H. (2007). 4-1BBL induces TNF receptor-associated factor 1-dependent Bim modulation in human T cells and is a critical component in the costimulation-dependent rescue of functionally impaired HIV-specific CD8 T cells. *J Immunol* 179, 8252-63.
- Wang, Q., Zhang, P., Zhang, Q., Wang, X., Li, J., Ma, C., Sun, W., et Zhang, L. (2008). Analysis of CD137 and CD137L expression in human primary tumor tissues. *Croat. Med. J* 49, 192-200.
- Wang, S., Bajorath, J., Flies, D. B., Dong, H., Honjo, T., et Chen, L. (2003). Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J Exp Med* 197, 1083-91.
- Watanabe, M., Hara, Y., Tanabe, K., Toma, H., et Abe, R. (2005). A distinct role for ICOS-mediated co-stimulatory signaling in CD4+ and CD8+ T cell subsets. *Int Immunol* 17, 269-78.
- Watson, A. R. O., et Lee, W. T. (2004). Differences in signaling molecule organization between naive and memory CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 173, 33-41.
- Watts, T. H. (2005). TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* 23, 23-68.
- Weinberg, A. D., Vella, A. T., et Croft, M. (1998). OX-40: life beyond the effector T cell stage. *Semin Immunol* 10, 471-80.
- Wellbrock, C., et Marais, R. (2005). Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J Cell Biol.* 170, 703-708.
- Wen, T., Bukczynski, J., et Watts, T. H. (2002). 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. *J Immunol* 168, 4897-906.
- Wherry, E. J., Barber, D. L., Kaech, S. M., Blattman, J. N., et Ahmed, R. (2004). Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16004-9.

- Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., van der Most, R., et Ahmed, R. (2003). Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 77, 4911-27.
- Widlund, H. R., et Fisher, D. E. (2003). Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* 22, 3035-41.
- Wilcox, R. A., Flies, D. B., Zhu, G., Johnson, A. J., Tamada, K., Chapoval, A. I., Strome, S. E., Pease, L. R., et Chen, L. (2002). Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors. *J Clin Invest* 109, 651-9.
- Wilcox, R. A., Tamada, K., Strome, S. E., et Chen, L. (2002). Signaling Through NK Cell-Associated CD137 Promotes Both Helper Function for CD8+ Cytolytic T Cells and Responsiveness to IL-2 But Not Cytolytic Activity. *J Immunol* 169, 4230-4236.
- Williams, M. A., et Bevan, M. J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 25, 171-92.
- Williams, M. A., Tyznik, A. J., et Bevan, M. J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* 441, 890-3.
- Winter, H., Engel, N. K. V. D., Poehlein, C. H., Hatz, R. A., Fox, B. A., et Hu, H. (2007). Tumor-specific T cells signal tumor destruction via the lymphotoxin  $\beta$  receptor. *J Transl Med.* 5, 14.
- Wolfl, M., Kuball, J., Ho, W. Y., Nguyen, H., Manley, T. J., Bleakley, M., et Greenberg, P. D. (2007). Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood* 110, 201-10.
- Woodward, J. K. L., Rennie, I. G., Burn, J. L., et Sisley, K. (2005). A potential role for TGFbeta in the regulation of uveal melanoma adhesive interactions with the hepatic endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 3473-7.
- Wyer, J. R., Willcox, B. E., Gao, G. F., Gerth, U. C., Davis, S. J., Bell, J. I., van der Merwe, P. A., et Jakobsen, B. K. (1999). T cell receptor and coreceptor CD8 alphaalpha bind peptide-MHC independently and with distinct kinetics. *Immunity* 10, 219-25.
- Xu, D., Sauter, B. V., Huang, T., Meseck, M., Woo, S. L. C., et Chen, S. (2005). The systemic administration of Ig-4-1BB ligand in combination with IL-12 gene transfer eradicates hepatic colon carcinoma. *Gene Ther* 12, 1526-33.
- Xu, Y. et coll. (2007). Selective targeting of the LIGHT-HVEM costimulatory system for the treatment of graft-versus-host disease. *Blood* 109, 4097-104.

- Xue, H., Kovanen, P. E., Pise-Masison, C. A., Berg, M., Radovich, M. F., Brady, J. N., et Leonard, W. J. (2002). IL-2 negatively regulates IL-7 receptor alpha chain expression in activated T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13759-64.
- Xue, L. et coll. (2002). Siva-1 binds to and inhibits BCL-XL-mediated protection against UV radiation-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 6925-6930.
- Yamazaki, T., Akiba, H., Koyanagi, A., Azuma, M., Yagita, H., et Okumura, K. (2005). Blockade of B7-H1 on macrophages suppresses CD4+ T cell proliferation by augmenting IFN-gamma-induced nitric oxide production. *J Immunol* 175, 1586-92.
- Yan, X., Johnson, B. D., et Orentas, R. J. (2008). Induction of a VLA-2 (CD49b)-Expressing Effector T Cell Population by a Cell-Based Neuroblastoma Vaccine Expressing CD137L. *J Immunol* 181, 4621-4631.
- Yang, H. Y., Chu, M., Zheng, L. W., Zwahlen, R. A., Luo, J., Zou, D. H., et Sun, S. T. (2008). Transgenic B7-H3 therapy induces tumor-specific immune response in human oral squamous cell cancer: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106, 721-8.
- Yang, S., Linette, G. P., Longerich, S., et Haluska, F. G. (2002). Antimelanoma activity of CTL generated from peripheral blood mononuclear cells after stimulation with autologous dendritic cells pulsed with melanoma gp100 peptide G209-2M is correlated to TCR avidity. *J Immunol* 169, 531-9.
- Yee, C., Thompson, J. A., Byrd, D., Riddell, S. R., Roche, P., Celis, E., et Greenberg, P. D. (2002). Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16168-73.
- Yee, C. et coll. (2000). Melanocyte Destruction after Antigen-specific Immunotherapy of Melanoma: Direct Evidence of T Cell-mediated Vitiligo. *J. Exp. Med.* 192, 1637-1644.
- Yoon, Y., Ao, Z., Cheng, Y., Schlossman, S. F., et Prasad, K. V. (1999). Murine Siva-1 and Siva-2, alternate splice forms of the mouse Siva gene, both bind to CD27 but differentially transduce apoptosis. *Oncogene* 18, 7174-9.
- Youle, R. J., et Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.
- Yu, X., Martin, P. J., et Anasetti, C. (2003). CD28 Signal Enhances Apoptosis of CD8 T Cells After Strong TCR Ligation . *J Immunol* 170, 3002-3006.
- Zajac, P. et coll. (2003). Phase I/II clinical trial of a nonreplicative vaccinia virus expressing multiple HLA-A0201-restricted tumor-associated epitopes and costimulatory molecules in metastatic melanoma patients. *Hum Gene Ther* 14, 1497-510.

- Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gómez-Monterrey, I., Castedo, M., et Kroemer, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 183, 1533-44.
- Zeh, H. J., Perry-Lalley, D., Dudley, M. E., Rosenberg, S. A., et Yang, J. C. (1999). High Avidity CTLs for Two Self-Antigens Demonstrate Superior In Vitro and In Vivo Antitumor Efficacy. *J Immunol* 162, 989-994.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., et Korsmeyer, S. J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619-28.
- Zhang, B. et coll. (2007a). Immune suppression or enhancement by CD137 T cell costimulation during acute viral infection is time dependent. *J Clin Invest* 117, 3029-41.
- Zhang, B. et coll. (2007b). Immune suppression or enhancement by CD137 T cell costimulation during acute viral infection is time dependent. *J Clin Invest.* 117, 3029-3041.
- Zhang, H., Snyder, K. M., Suhoski, M. M., Maus, M. V., Kapoor, V., June, C. H., et Mackall, C. L. (2007). 4-1BB Is Superior to CD28 Costimulation for Generating CD8+ Cytotoxic Lymphocytes for Adoptive Immunotherapy. *J Immunol* 179, 4910-4918.
- Zhang, M., Park, S., Wang, Y., Shah, R., Liu, N., Murmann, A. E., Wang, C., Peter, M. E., et Ashton-Rickardt, P. G. (2006). Serine protease inhibitor 6 protects cytotoxic T cells from self-inflicted injury by ensuring the integrity of cytotoxic granules. *Immunity* 24, 451-61.
- Zheng, G., Wang, B., et Chen, A. (2004). The 4-1BB costimulation augments the proliferation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 173, 2428-34.
- Zhong, W., et Reinherz, E. L. (2005). CD8 alpha alpha homodimer expression and role in CD8 T cell memory generation during influenza virus A infection in mice. *Eur J Immunol* 35, 3103-10.
- Zhou, J., Shen, X., Huang, J., Hodes, R. J., Rosenberg, S. A., et Robbins, P. F. (2005). Telomere Length of Transferred Lymphocytes Correlates with In Vivo Persistence and Tumor Regression in Melanoma Patients Receiving Cell Transfer Therapy. *J Immunol* 175, 7046-7052.
- Zhou, X. P., Gimm, O., Hampel, H., Niemann, T., Walker, M. J., et Eng, C. (2000). Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. *Am J Pathol* 157, 1123-8.
- Zhu, Y., Zhu, G., Luo, L., Flies, A. S., et Chen, L. (2007). CD137 stimulation delivers an antigen-independent growth signal for T lymphocytes with memory phenotype.

Blood 109, 4882-9.

Zinkernagel, R. M., et Doherty, P. C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701-2.

Zippelius, A. et coll. (2004). Effector Function of Human Tumor-Specific CD8 T Cells in Melanoma Lesions: A State of Local Functional Tolerance. *Cancer Res* 64, 2865-2873.

Zippelius, A. et coll. (2002). Thymic selection generates a large T cell pool recognizing a self-peptide in humans. *J Exp Med* 195, 485-94.

# ANNEXES

[Cancer Immunol Immunother.](#) 2008 Feb;57(2):185-95. Epub 2007 Jul 24

**PBMC are as good a source of tumor-reactive T lymphocytes as TIL after selection by Melan-A/A2 multimer immunomagnetic sorting.**

[Labarrière N](#), [Gervois N](#), [Bonnin A](#), [Bouquié R](#), [Jotereau E](#), [Lang F](#).

INSERM U601, 44093 Nantes, France. nlabar@nantes.inserm.fr

Choosing a reliable source of tumor-specific T lymphocytes and an efficient method to isolate these cells still remains a critical issue in adoptive cellular therapy (ACT). In this study, we assessed the capacity of MHC/peptide based immunomagnetic sorting followed by polyclonal T cell expansion to derive pure polyclonal and tumor-reactive Melan-A specific T cell populations from melanoma patient's PBMC and TIL. We first demonstrated that this approach was extremely efficient and reproducible. We then used this procedure to compare PBMC and TIL-derived cells from three melanoma patients in terms of avidity for Melan-A A27L analog, Melan-A(26-35) and Melan-A(27-35), tumor reactivity (lysis and cytokine production) and repertoire. Regardless of their origin, i.e., fresh PBMC, peptide stimulated PBMC or TIL, all sorted populations (from the three patients) were cytotoxic against HLA-A2+ melanoma cell lines expressing Melan-A. Although some variability in peptide avidity, lytic activity and cytokine production was observed between populations of different origins in a given patient, it differed from one patient to another and thus no correlation could be drawn between T cell source and reactivity. Analysis of Vbeta usage within the sorted populations showed the recurrence of Vbeta3 and Vbeta14 subfamilies in the three patients but differences in the rest of the Melan-A repertoire. In addition, in two patients, we observed major repertoire differences between populations sorted from the three sources. We especially documented that in vitro peptide stimulation of PBMC, used to facilitate the sort by enriching in specific T lymphocytes, could significantly alter their repertoire and reactivity towards tumor cells. We conclude that PBMC which are easily obtained from all melanoma patients, can be as good a source as TIL to derive high amounts of tumor-reactive Melan-A specific T cells, with this selection/amplification procedure. However, the conditions of peptide stimulation should be improved to prevent a possible loss of reactive clonotypes.

Cancer Immunol Immunother 2009 Apr;58(4):553-66. Epub 2008 Aug 27.

A fast and efficient HLA multimer-based sorting procedure that induces little apoptosis to isolate clinical grade human tumor specific T lymphocytes.

[Bouquié R](#), [Bonnin A](#), [Bernardeau K](#), [Khammari A](#), [Dréno B](#), [Iotereau F](#), [Labarrière N](#), [Lang F](#).

INSERM U892, 9 quai Moncoussu, 44093, Nantes Cedex 1, France.

HLA multimers are now widely used to stain and sort CD8 T lymphocytes specific for epitopes from viral or tumoral antigens presented in an HLA class I context. However, the transfer of this technology to a clinical setting to obtain clinical grade CD8 T lymphocytes that may be used in adoptive cell transfer (ACT) is hindered by two main obstacles: the first obstacle is the use of streptavidin or derived products that are not available in clinical grade to multimerize HLA/peptide monomers and the second is the reported high degree of apoptosis that eventually occurs when T cell receptors are crosslinked by HLA multimers. In the present report, we describe new HLA multimers composed of immunomagnetic beads covalently coupled to a mAb specific for the AviTag peptide and coated with HLA/peptide monomers bearing the non biotinylated AviTag at the COOH terminus of the HLA heavy chain. Thus, all the components of this new reagent can be obtained in clinical grade. We compared these new multimers with the previously described multimers made with streptavidin beads coated with biotinylated HLA/peptide monomers, in terms of sorting efficiency, recovery of functional T cells, apoptosis and activation. We provide evidence that the new multimers could very efficiently sort pure populations of T lymphocytes specific for three different melanoma antigens (Melan-A, gp100 and NA17-A) after a single peptide stimulation of melanoma patients' PBMC. The recovered specific T cells were cytotoxic against the relevant melanoma cell-lines and, in most cases, produced cytokines. In addition, in marked contrast with streptavidin-based multimers, our new multimers induced very little apoptosis or activation after binding specific T lymphocytes. Altogether, these new multimers fulfill all the necessary requirements to select clinical grade T lymphocytes and should facilitate the development of ACT protocols in cancer patients.

DOI 10.1007/s00262-008-0578-2

## OPTIMISATION DES METHODES DE SELECTION ET DE STIMULATION DES LYMPHOCYTES T CD8 SPECIFIQUES DE MELANOME

Le mélanome au stade métastatique est un cancer très agressif pour lequel aucun traitement conventionnel n'est efficace. L'existence de régressions spontanées corrélées à la présence de lymphocytes T spécifiques de tumeur a été décrite. L'immunothérapie passive représente donc une stratégie thérapeutique de choix. Dans la première partie de ce document, nous décrivons une technique de tri immunomagnétique de lymphocytes T CD8 spécifiques d'antigène de mélanome à base de multimères HLA, dont tous les composants peuvent être obtenus en grade clinique. Ce nouveau réactif permet d'obtenir rapidement des populations pures et fonctionnelles après une seule stimulation peptidique de PBMC. De plus, ce nouveau multimère n'induit que très peu d'apoptose et d'activation après sa liaison aux lymphocytes T spécifiques. Ces nouveaux multimères devraient faciliter le développement des protocoles d'immunothérapie adoptive chez les patients atteints de cancer. Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à l'effet de deux molécules de co-stimulation (CD28 et 4-1BB ligand) sur des lymphocytes T spécifiques de Melan-A. Elles sont indispensables à une stimulation correcte des lymphocytes T et jouent un rôle essentiel dans la génération et la persistance des lymphocytes T CD8 mémoires. Nous montrons que le CD28 est le plus efficace pour l'expansion des cellules spécifiques CD28+ chez les donneurs sains et chez les patients atteints de mélanome. En revanche, l'effet co-stimulant du 4-1BBL, qui concerne principalement les cellules spécifiques CD28-, est plus manifeste chez les patients que chez les donneurs sains.

Mots clés : immunothérapie, mélanome, multimères CMH, lymphocytes T, tri cellulaire, co-stimulation, 4-1BB ligand, CD28

## IMPROVEMENT OF MELANOMA SPECIFIC CD8 T LYMPHOCYTES SELECTION AND STIMULATION PROCEDURES

Metastatic melanoma is a very aggressive cancer, and unfortunately, conventional treatments are inefficient. The existence of spontaneous regressions due to the presence of cytotoxic T lymphocytes has been described. Thus, adoptive immunotherapy could be an interesting therapeutic strategy. In the first part of this document, we describe a new immunomagnetic reagent to sort melanoma specific CD8 T lymphocytes, based on multimeric MHC/peptide complexes. All the components of this new multimer can be obtained in clinical grade. This new reagent can quickly sort pure and functional specific T cells after a single peptide stimulation of melanoma patients' PBMCs. In addition, this new multimer induces very little apoptosis or activation after binding specific T lymphocytes. Therefore, it should facilitate the development of adoptive cell therapy protocols in cancer patients. In a second part, we studied the effects of two co-stimulation molecules (CD28 and 4-1BBL) on Melan-A specific CD8 T cells. These ligands are crucial for efficient stimulation and play a key role in the generation and maintenance of CD8 memory T cells. We show that CD28 is more efficient to expand CD28+ specific T cells, both from healthy donors and melanoma patients. The co-stimulatory effect of 4-1BBL, which concerns mainly CD28- T cells, was more pronounced in specific T cells from melanoma patients than from healthy donors .

keyword: immunotherapy, mélanoma, HLA multimers, T lymphocytes, cell sorting, co-stimulation, 4-1BB ligand, CD28