

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2008

N°66

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE  
PHARMACIE SPECIALISEE**

Soutenu devant le jury interrégional le 17 décembre 2008

**par**

**Régis BOUQUIE**

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 6 mai 1987 tient lieu de :

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**DEVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE DE TRI DE LYMPHOCYTES  
T CD8 SPECIFIQUES UTILISABLE EN CLINIQUE**

**Président :** M. Jean-Yves PETIT, Pr. de Pharmacologie - Nantes

**Directeur de Thèse :** M. François LANG, Pr. de Pharmacologie – Nantes

**Membres du jury :**

M. Antoine DUPUIS, Maître de Conférence en Pharmacie Clinique Praticien  
Hospitalier – Pharmacien - Poitiers

M. Mickaël BOURGEOIS – Pharmacien Hospitalier

Mme Isabelle ARNAUD – Pharmacien

# Table des matières

INTRODUCTION	1
I. LA REPONSE DES LYMPHOCYTES TAB CD8	3
A. INITIATION : LA RECONNAISSANCE ANTIGENIQUE	5
1) <i>Les molécules du CMH de classe I</i>	5
2) <i>Le récepteur des lymphocytes T <math>\alpha\beta</math>: TCR</i>	9
3) <i>Le co-récepteur CD8</i>	13
4) <i>Les autres co-récepteurs</i>	14
5) <i>La synapse immunologique et la transmission du signal d'activation</i>	17
B. LA PHASE D'EXPANSION CLONALE	21
1) <i>Sécrétion de cytokines</i>	22
2) <i>Cytotoxicité</i>	23
3) <i>Migration vers les tissus périphériques</i>	24
C. PHASE DE CONTRACTION CLONALE	24
D. GENERATION DU REPERTOIRE MEMOIRE	25
E. REGULATION DE L' APOPTOSE PENDANT LA REPONSE IMMUNE	26
1) <i>Les acteurs de l'apoptose</i>	27
2) <i>Les mécanismes moléculaires de l'apoptose</i>	32
3) <i>Le contrôle de la réponse immunitaire</i>	35
II. LE MELANOME	37
A. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES	37
B. FACTEURS DE RISQUE	38
1) <i>Les facteurs de risque constitutionnels:</i>	39
2) <i>Les facteurs de risque extrinsèques :</i>	39
C. CLASSIFICATION	40
1) <i>Classification anatomo-clinique des mélanomes cutanés</i>	40
2) <i>Classification histologique des mélanomes cutanés</i>	42
3) <i>Les mélanomes non cutanés</i>	45
D. FACTEURS PRONOSTIQUES	46
1) <i>Histologiques</i>	46
2) <i>Non histologiques</i>	47
E. PRISE EN CHARGE CONVENTIONNELLE	47
1) <i>Traitement chirurgical</i>	47
2) <i>Traitements systémiques</i>	48
3) <i>Efficacité des traitements systémiques</i>	50
III. L'IMMUNOTHERAPIE DU MELANOME	53

<b>A.</b>	<b>L'IMMUNOTHERAPIE ACTIVE OU VACCINATION THERAPEUTIQUE</b>	<b>56</b>
1)	<i>Les vaccins peptidiques ou protéiques</i>	57
2)	<i>La vaccination par cellules tumorales :</i>	58
3)	<i>La vaccination par protéines de choc thermiques :</i>	59
4)	<i>Injection de cellules présentatrices chargées :</i>	60
5)	<i>Vaccination par plasmides ou vecteurs viraux :</i>	61
<b>B.</b>	<b>L'IMMUNOTHERAPIE ADOPTIVE</b>	<b>63</b>
1)	<i>Injection de TIL</i>	64
2)	<i>Injection de populations enrichies en lymphocytes T CD8 spécifiques</i>	68
3)	<i>Injection de clones</i>	69
4)	<i>Transfert de lymphocytes modifiés génétiquement</i>	71
<b>IV.</b>	<b>PROJET DE RECHERCHE ET OBJECTIF DU TRAVAIL</b>	<b>73</b>
	<b>RESULTATS</b>	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>
<b>V.</b>	<b>DEVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE DE TRI UTILISABLE EN CLINIQUE</b>	<b>75</b>
<b>A.</b>	<b>CHOIX DE LA SOURCE DE CELLULE SPECIFIQUE DE MELAN-A</b>	<b>75</b>
1)	<i>Efficacité du tri immuno-magnétique</i>	77
2)	<i>Répertoire des populations triées</i>	78
3)	<i>Etude fonctionnelle des cellules triées</i>	80
4)	<i>Conclusion et perspectives</i>	83
<b>B.</b>	<b>DEVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE DE TRI UTILISABLE EN CLINIQUE</b>	<b>86</b>
1)	<i>préparation des multimères HLA/peptide</i>	86
2)	<i>Comparaison de l'efficacité des tris réalisés avec les billes M450-AvT ou M280<sub>s</sub></i>	93
3)	<i>Etude de l'apoptose induite par les multimères M450-AvT vs M280.</i>	103
4)	<i>Activation de la production de cytokines par les différents multimères</i>	107
5)	<i>Analyse de l'avidité de sous-familles Vβ triées par les différents multimères</i>	109
6)	<i>Analyse de l'apoptose induite par les multimères sur les sous-familles de Vβ</i>	113
	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>116</b>
	<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>130</b>
1)	<i>Culture cellulaire</i>	130
2)	<i>Cytométrie de flux</i>	131
3)	<i>Cytotoxicité</i>	133
4)	<i>Mise en évidence de l'apoptose</i>	134
5)	<i>La résonance plasmonique de surface</i>	134
6)	<i>Analyse Statistique</i>	136
	<b>ANNEXES</b>	<b>171</b>

# Figures

Figure 1 : Structure 3D des molécules de CMH de classe I	6
Figure 2 : Production de complexes CMH-peptide recombinants	8
Figure 3 : structure du complexe TCR/CD3	10
Figure 4 : La synapse immunologique mature (Huppa et coll. 2003).	19
Figure 5 : Transduction du signal TCR/CD3	21
Figure 6 : Les voies de l'apoptose.	34
Figure 7 : Progression tumorale et classification de Breslow et de Clark	43
Figure 8 : Pureté des tris de cellules spécifiques issues de trois sources différentes	78
Figure 9 : Analyse du répertoire des populations triées	79
Figure 10 : Avidité des populations triées.	81
Figure 11 : Avidité des lymphocytes T V $\beta$ 8 et V $\beta$ 14 spécifiques de Melan-A	82
Figure 12 : Etapes de la construction du plasmide pHN1-HLA-A*0201-AvT	88
Figure 13 : Sensorgrammes	90
Figure 14 : Résultats de l'alanine-scan	91
Figure 15 : Calibration des billes M450 et M280	93
Figure 16 : Résultats des tris Melan-A	96
Figure 17 : Etude de répertoire des populations Melan-A triées	97
Figure 18 : Analyse fonctionnelle des tris Melan-A	99
Figure 19 : Tris NA17-A et gp100	102
Figure 20 : Calibration des billes M280	104
Figure 22 : Apoptose induite par les billes	106
Figure 23 : Mesure de l'activité des caspases	107
Figure 24 : Mesure de la sécrétion de cytokines	109
Figure 25 : caractéristiques des populations des patients 1#2 et 3	110
Figure 26 Résultats des tris V $\beta$	112
Figure 27 : Index de stimulation des sous-familles V $\beta$	114
Figure 28 : Fixation des monomères sur les billes M450-AvT et M280	122
Figure 29 : Corrélation apoptose / activation	125
Figure 30 : principe du système de détection du Biacore®	136

# Tableaux

Tableau 1 : Classification des phototypes	40
Tableau 2 : Classification TNM des mélanomes	45
Tableau 3 : Marges d'exérèses recommandées en fonction de l'indice de Breslow	48
Tableau 5 : Résultats des tris	95
Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés.	133

## 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 immunorégulateurs). 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 dérivants 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 8<sup>e</sup> ou 9<sup>e</sup> 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) (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'interactions 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 Fonction 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 (empéripolérisme)(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*).

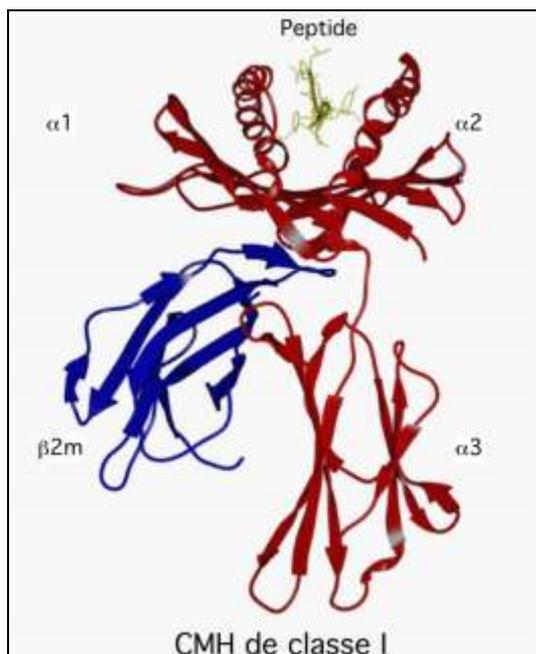


Figure 1 : Structure 3D des molécules de CMH de classe I

### 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 (Mickel John 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 (M 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 (M 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 (F Lang et coll. 2001)).

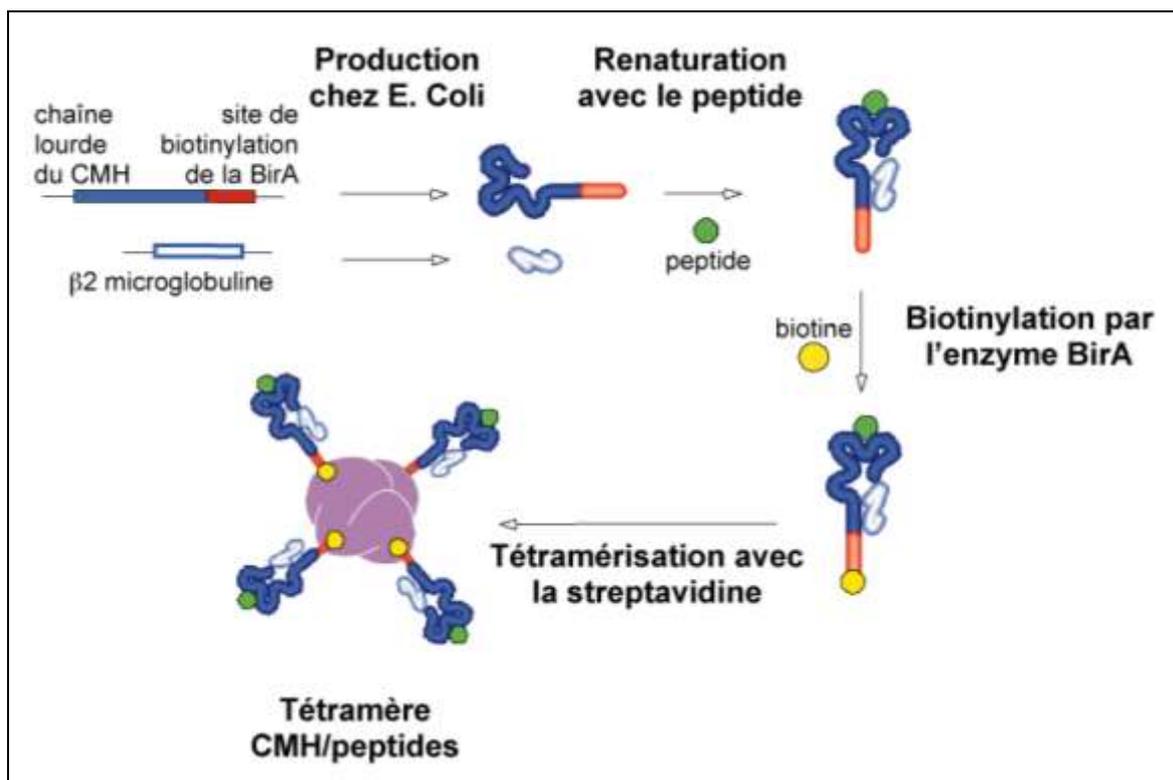


Figure 2 : Production de complexes CMH-peptide recombinants (F Lang et coll. 2001).

## 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 associées à la protéine 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.

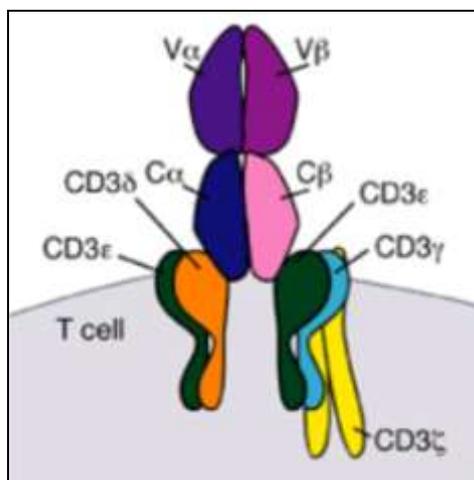


Figure 3 : structure du complexe TCR/CD3

### 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  $\beta$  (Mark M. Davis et coll. 1988). La chaîne  $\beta$  est réarrangée en premier par recombinaison entre les segments V, D et J, puis C (E 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 » (M. 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, (Anton 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°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 autres co-récepteurs

En plus de la reconnaissance spécifique d'un complexe CMH/peptide par le TCR (dit premier signal), l'initiation d'une réponse lymphocytaire T nécessite d'autres signaux de stimulations non spécifiques indispensables à l'activation des lymphocytes T naïfs. S'ils sont absents, la réponse générée sera abortive. Les lymphocytes T seront soit rendus anergiques, incapables de répondre et de sécréter des cytokines, soit supprimés. 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. Les molécules de co-stimulation sont regroupées dans 2 grandes familles selon leur structure. Les membres de la famille CD28 appartiennent à la super-famille des immunoglobulines, alors que l'autre grand groupe de molécules de co-stimulation est représenté par certains des membres de la famille du TNF.

### Famille des immunoglobulines

#### i. CD28

Le CD28 est exprimé constitutivement par les lymphocytes T naïfs et se fixe à ses ligands B7.1 et B7.2 (CD80 et CD86) qui sont exprimés sur la plupart des cellules présentatrices d'antigène. L'interaction CD28/B7 fournit un fort signal activateur qui conduit, en synergie avec le signal délivré par le TCR, à une augmentation prolongée de la prolifération des lymphocytes T et à une forte augmentation de la production d'IL-2. Par

ailleurs, il a été montré que l'activation du CD28 favorisait la survie des lymphocytes T en augmentant l'expression de Bcl-x<sub>L</sub> (Boise et coll. 1995). Le rôle anti-apoptotique du CD28 a été confirmé dans d'autres études (Russell G. Jones et coll. 2002; Alegre et coll. 2001)

ii. CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)

Le CTLA-4 appartient à la même famille que le CD28, et se lie également à B7.1 et B7.2, mais avec une affinité supérieure à celle du CD28 (Linsley et coll. 1994). Son expression est induite suite à l'activation du TCR et il va inhiber les signaux activateurs délivrés par le TCR et le CD28, ceci conduisant à inhiber la prolifération ainsi que les fonctions effectrices du lymphocyte T (pour revue (Greenwald et coll. 2005).

iii. PD-1 (Programmed Death-1)

PD-1 est exprimé par les lymphocytes T activés. Ses ligands sont PDL-1 et PDL-2 (homologues de B7.1 et B7.2). Il joue un rôle inhibiteur de l'activation des lymphocytes T stimulés en conduisant à un arrêt du cycle cellulaire (mais pas à la mort des cellules comme son nom pourrait l'indiquer) (Latchman et coll. 2001; Keir et coll. 2008).

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 traité 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).

#### iv. CD27

Le ligand du CD27 est le CD70 (Bowman et coll. 1994). Le CD27 est exprimé par la majorité des lymphocytes T naïfs (Lens et al., 1998), et le CD70 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. Les lymphocytes en phase tardive de différenciation perdent de manière irréversible le CD27. L'activation du CD27 augmente la prolifération globale des lymphocytes T, mais vraisemblablement plutôt par un rôle de facteur de survie que par une augmentation du nombre de division cellulaire (Hendriks et coll. 2003).

#### v. Le 4-1BBL

Le 4-1BB est exprimé à la surface des lymphocytes T activés, les thymocytes et les cellules dendritiques. Le 4-1BB ligand est exprimé à la surface des macrophages activés, des cellules dendritiques stimulées et des lymphocytes B et T activés. Le 4-1BB est capable de co-stimuler la prolifération des lymphocytes T une fois qu'ils ont perdu le CD28. Il intervient donc plus tardivement au cours de la réponse immunitaire (Bertram et coll. 2004). De plus, le 4-1BB augmente la survie des lymphocytes T activés, en induisant les molécules anti-apoptotiques c-FLIP<sub>short</sub> et BCL-X<sub>L</sub> (Hyeon-Woo Lee et coll. 2002; Stärck et coll. 2005; Vinay

et coll. 2006; Melero et coll. 2008).

La famille des récepteurs au TNF est constituée de nombreuses molécules de co-stimulation, mais toutes n'ont pas un rôle principal sur l'activation des lymphocytes T CD8, qui nous concernent plus particulièrement ici. Nous ne ferons donc que citer les couples OX40/OX40L, HVEM/LIGHT, GITR/GITRL, CD30/CD30L, CD40/CD40L.

### *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 entre 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 en raison de 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 » (Kyeong-Hee Lee et coll. 2002).

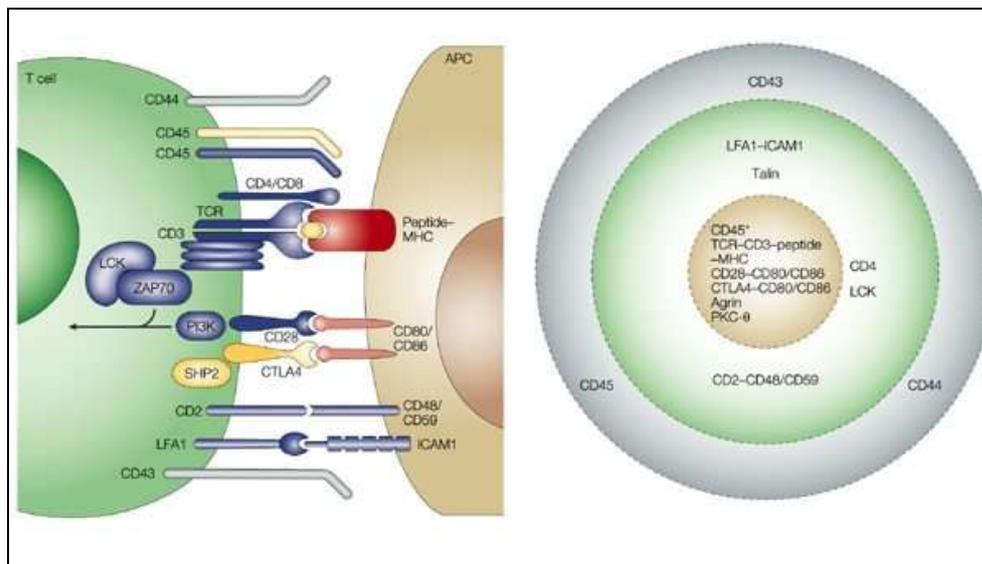


Figure 4 : La synapse immunologique mature (Huppa et coll. 2003).

### Transmission du signal d'activation

Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR disposent d'un domaine intra-cytoplasmique 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 réactions enzymatiques 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 p56 $lck$  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 successifs de plusieurs protéines conduit à la formation du signalosome, à l'origine des quatre grandes voies de la signalisation (cf. Figure 5):

La voie dépendante du calcium qui aboutit à l'activation du facteur de transcription NF-AT (*Nuclear Factor 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,

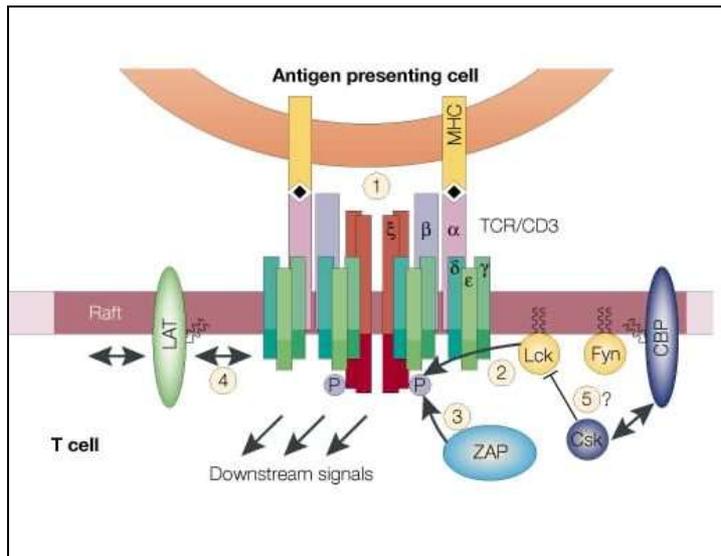
Ces 2 premières voies sont initiées par l'activation de la phospholipase C $\gamma$  (PLC- $\gamma$ );

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 : Transduction du signal TCR/CD3*

*Événements intracellulaires de transduction du signal d'activation du 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 haute 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 stimulation correcte des lymphocytes T CD8 par les cellules présentatrices d'antigènes induit leur prolifération et leur différenciation en cellules effectrices et mémoires. Suite à l'initiation, la réponse d'un lymphocyte T peut être divisé en trois étapes successives: l'expansion clonale, la contraction et la génération de cellules mémoires.

### 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 (van Stipdonk et coll. 2001). La prolifération est

associée à une différenciation en cellules effectrices, caractérisées par leur capacité à sécréter des cytokines et à lyser les cellules cibles. 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 (U H von Andrian et coll. 2000).

### 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'IL2 (pour revue, (Sprent et coll. 2002), qui favorise la différenciation des lymphocytes T activés en effecteurs. L'activation induit parallèlement l'expression membranaire de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL2 (CD25) permettant la formation du récepteur de haute affinité (IL2R $\alpha\beta\gamma$ ). Ainsi, l'IL2 est capable d'exercer une action autocrine positive sur les lymphocytes T CD8. Néanmoins, l'IL2 qui agit sur les lymphocytes T CD8 est principalement produite par les lymphocytes T CD4. Les lymphocytes T CD8 peuvent

également sécréter de l'IL4 et du GM-CSF.

### 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. Le TNF produit lors de l'activation a également, mais dans une moindre mesure, une action cytotoxique.

### 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 (cf plus loin et pour revue, (Peter H 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)).

### 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

Une fois que l'infection est sous le contrôle du 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 la phase de contraction meurent par

apoptose, selon un mécanisme appelé AICD (*Activation-Induced Cell Death*) (cf. plus loin). 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'IL2, durant cette phase de contraction joue un rôle actif pro-apoptotique.

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

### 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 mal connus. 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 dendritiques 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).

#### Régulation de l'apoptose pendant la réponse immune

Il existe deux types de mort cellulaire : la nécrose qui est considérée comme une mort cellulaire désordonnée, et par opposition, l'apoptose qui est considérée comme une mort cellulaire ordonnée. Dans ce chapitre, nous ne nous intéresserons qu'à la mort cellulaire programmée ou apoptose.

Pour maintenir l'homéostasie après leur expansion clonale, les lymphocytes T activés doivent revenir à un nombre normal une fois que l'antigène aura été éliminé. Les seules cellules qui resteront sont les cellules mémoires. Elles sont résistantes à l'apoptose et seront capables de répondre rapidement à une nouvelle exposition à l'antigène.

Les lymphocytes qui seront re-stimulés avant la fin de la réponse immune mourront par AICD (*Activation-Induced Cell Death*), alors que ceux qui ne seront pas re-stimulés mourront par négligence ou ACAD (*Activated*

*Cell-Autonomous Death*).

Les mécanismes connus induisant l'apoptose des cellules 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 peut 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). Ce récepteur est exprimé à la surface de nombreux types cellulaires, sa stimulation va induire sa trimérisation. Les modifications conformationnelles qui suivent favorisent l'interaction du domaine de mort avec une protéine adaptatrice FADD (*Fas Associated Death Domain*) qui possède un domaine effecteur de mort cellulaire (DED : *Death Effector Domain*) responsable du recrutement, de la procaspase-8. Cet ensemble formé de FasL/Fas/FADD/procaspas-8 correspond au DISC (pour revue (Lavrik et coll. 2005)).

### La familles 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 (Andreas 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 un rôle plus régulateur que 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 (*cytanyl-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 intervient 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

Comme nous l'avons vu précédemment, deux voies aux mécanismes moléculaires distincts peuvent conduire à l'apoptose des cellules :

Une voie dite extrinsèque, impliquant les récepteurs de mort cellulaire, dont le modèle le mieux connu est le couple Fas/FasL,

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 vont conduire à l'activation des caspases, responsables des phénomènes morphologiques et biochimiques observés lors de l'apoptose (cf. Figure 6).

#### Voie extrinsèque

Dans la voie extrinsèque, 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). 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 due 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, puisqu'ils vont être

impliqués dans la propagation ou l'interruption de ces signaux. Les membres de cette famille, qui comprennent à la fois des molécules pro- et anti-apoptotiques, interagissent entre eux pour former des homo ou hétérodimères. Le niveau relatif de chaque membre pro- ou anti-apoptotique détermine la sensibilité cellulaire au signaux de mort. Lorsque la balance penche en faveur 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 (Peter H Krammer et coll. 2007).

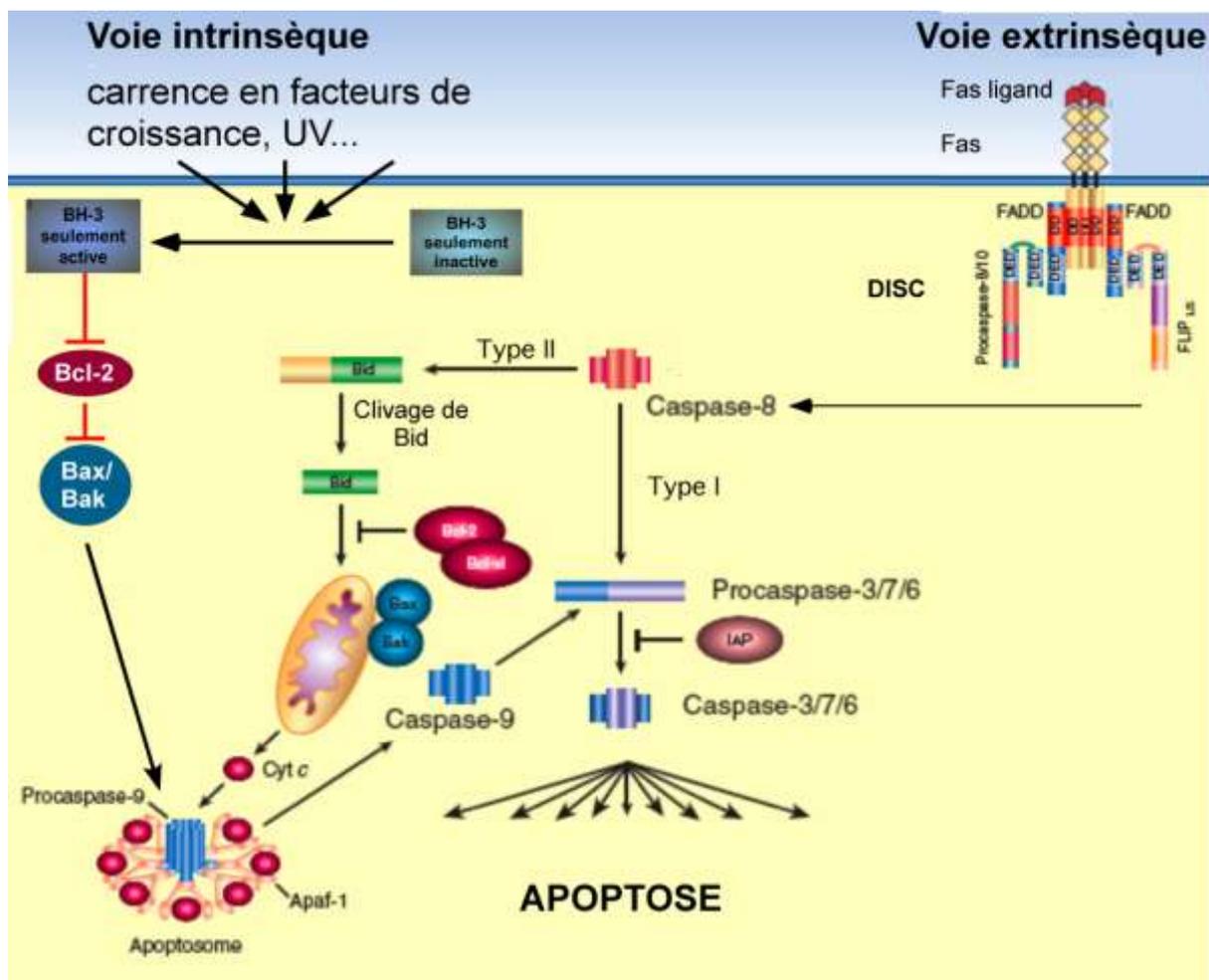


Figure 6 : Les voies de l'apoptose.

*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'AICD 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 activé 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.

## 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).

---

Phototype I	Peau extrêmement blanche, cheveux blonds, yeux bleus/verts	Brûle toujours facilement, ne bronze jamais
Phototype II	Peau blanche, cheveux roux à bruns, yeux verts/bruns	Brûle toujours facilement, bronze à peine
Phototype III	Peau moyenne, cheveux bruns, yeux bruns	Brûle modérément, bronze graduellement et uniformément
Phototype IV	Peau olivâtre, cheveux bruns/noirs, yeux bruns/noirs	Brûle à peine, bronze toujours bien
Phototype V	Peau brun foncé, cheveux noirs, yeux noirs	Brûle rarement, bronze beaucoup
Phototype VI	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 7).

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 infiltrent 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).

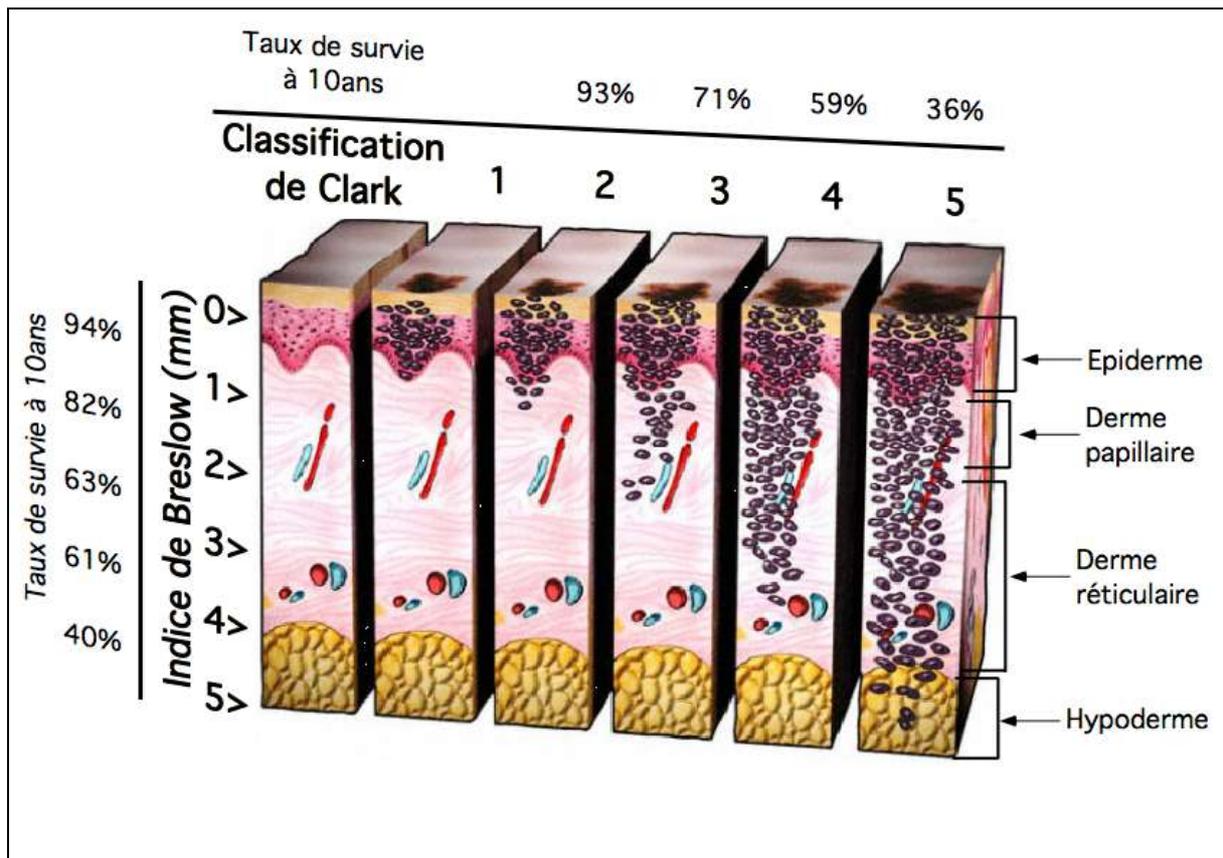


Figure 7 : Progression tumorale et classification de Breslow et de Clark

Stades	Critères
Stade IA	Tumeur inférieure ou égale à 1 mm d'épaisseur, niveau de Clark II ou III, sans ulcération (pT1a) ;N0, M0
Stade IB	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

---

Stade IIA	<p>Tumeur supérieure à 1 mm et inférieure ou égale à 2 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT2b) ; N0, M0</p> <p>Tumeur supérieure à 2 mm et inférieure ou égale à 4 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT3a) ; N0, M0</p>
Stade IIB	<p>Tumeur supérieure à 2 mm et inférieure ou égale à 4 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT3b) ; N0, M0</p> <p>Tumeur supérieure à 4 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT4a), N0, M0</p>
Stade IIC	Tumeur supérieure 4 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT4b), N0, M0
Stade IIIA	Tumeur sans ulcération (tous pT), métastases microscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux (N1a, 2a) ; M0
Stade IIIB	<p>Tumeur sans ulcération (tous pT), métastases macroscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux ou métastases « en transit » (N1b, 2b, 2c); M0</p> <p>Tumeur avec ulcération (tous pT), métastases microscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux ou métastases « en transit » (N1a, 2a, 2c) ; M0</p>
Stade IIIC	<p>Tumeur avec ulcération (tous pT), métastases macroscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux (N1b, 2b), M0</p> <p>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)</p>

---

*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 représente environ 5% des mélanomes, 85% ont une origine uvéale. 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

### Histologiques

#### L'ulcération

L'ulcération apparaît comme un facteur pronostique indépendant dans plusieurs études multi-variées (Eigentler et coll. 2004) (Balch, S J Soong, Gershenwald, 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 excoirations 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 fin. 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).

### 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	Marges	d'exérèse
Mélanome	in	0,5 cm	
0 - 1 mm		1 cm	
1,01 - 2 mm	1	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,

temozolimide, vindesine, cisplatine) versus chimio-immunothérapie (INF $\alpha$   $\pm$  IL-2) chez des patients atteints de mélanome métastatique (A. D. 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 (INF $\alpha$  seul ou INF $\alpha$ +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 évalué 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 INF $\alpha$ +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 (P 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 (S A 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 (Craig L 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 (Steven A 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 (Ian D Davis et coll. 2004; Danila 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 (Steven A Rosenberg et coll. 2004).

*La vaccination par protéines de choc thermiques :*

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 (Steven A 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 (Steven A 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. L'utilisation du vecteur viral a favorisé l'augmentation des CTL spécifiques par rapport au plasmide nu (Caroline L 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, tyrosine) 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; E. 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 (Steven A 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 (S A 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 avaient augmenté d'un facteur 5 ou 6 (Eder et coll. 2000), malgré cette augmentation 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 (S A Rosenberg et coll. 1998; Steven A 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; D E Speiser et coll. 1997). Par ailleurs la faible efficacité des approches de vaccination peut être expliquée par des mécanismes d'échappement tumoraux. 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 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* (S A 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 (S A 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 (S A 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 IL2 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 (S A 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 (Mark E 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 (Mark E 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 (M J 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 (M E Dudley et coll. 2001).

Parralèlement, 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, si chez 6 patients des régressions de métastase ou des stabilisations de la maladie ont été enregistrées, seul 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 « *antigen 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 (Mark E 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 (M. S. 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 (Mark E. 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 (K H 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 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 tumeurs 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<sup>+</sup> 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 (Nathalie 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<sup>+</sup> par rapport au CD4<sup>+</sup> ni de la fréquence des cellules spécifiques 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 amenés à utiliser une méthode de tri immuno-magnétique 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 qualité des cellules obtenues. Aussi, nous avons décidé d'adapter cet outil afin de l'exploiter en médecine humaine, puisque aucune technique de grade clinique ne permettait le tri de lymphocytes T sur la base de leur spécificité.

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, 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.

## 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 (S A 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.

#### *Efficacité 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 8).

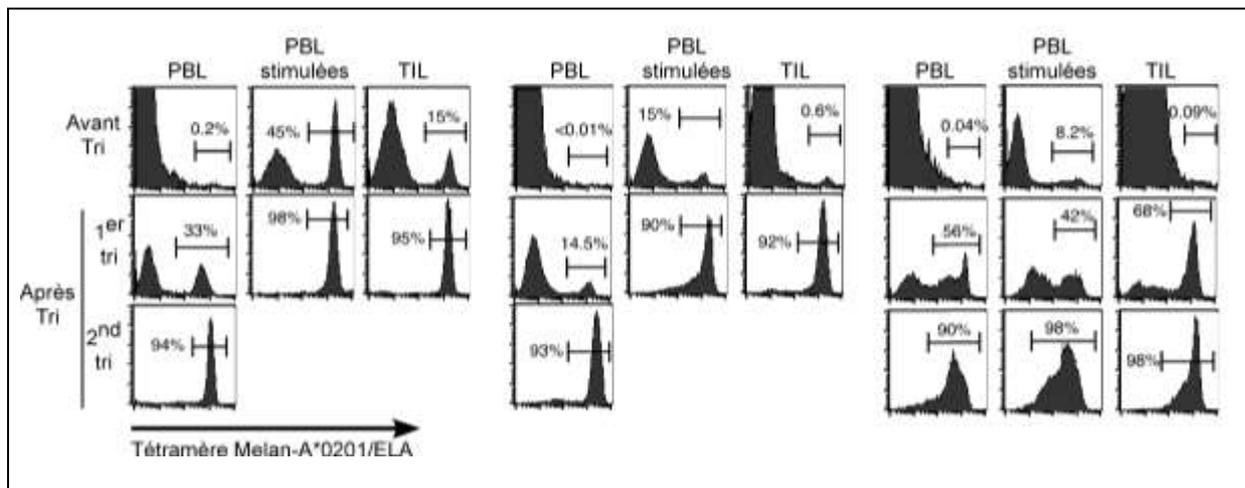


Figure 8 : Pureté des tris de cellules spécifiques issues de trois sources différentes PBMC, PBMC stimulé et TIL. La pureté a été évaluée par marquage tétramère.

### 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

Vβ3 alors que celles issues de PBMC non stimulées sont Vβ8 et celles triées à partir de PBMC stimulées sont Vβ14 à 50% et Vβ3 à 25% (cf. Figure 9).

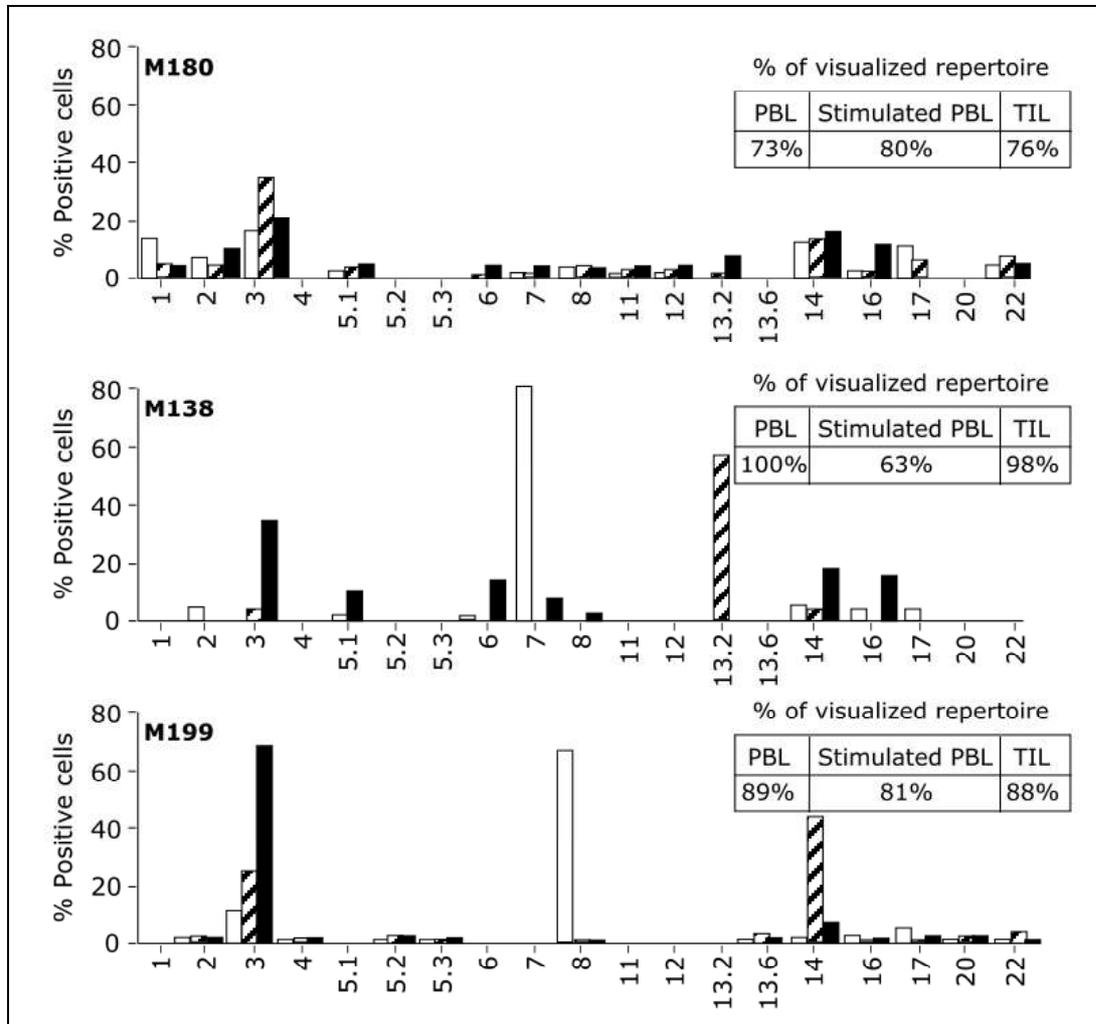


Figure 9 : Analyse du répertoire des populations triées  
Populations triées à partir de PBMC non stimulées (blanc), PBMC stimulées (hachuré) ou de TILs (noir). Les tableaux indiquent le pourcentage de population caractérisée pour chaque tri.

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 10).

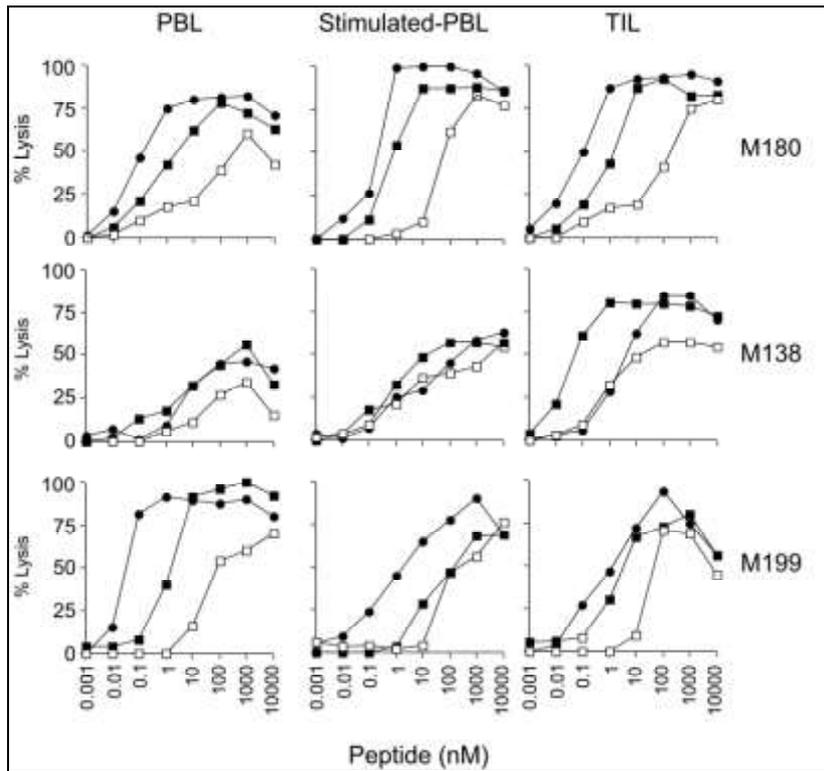


Figure 10 : Avidité des populations triées.

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 11).

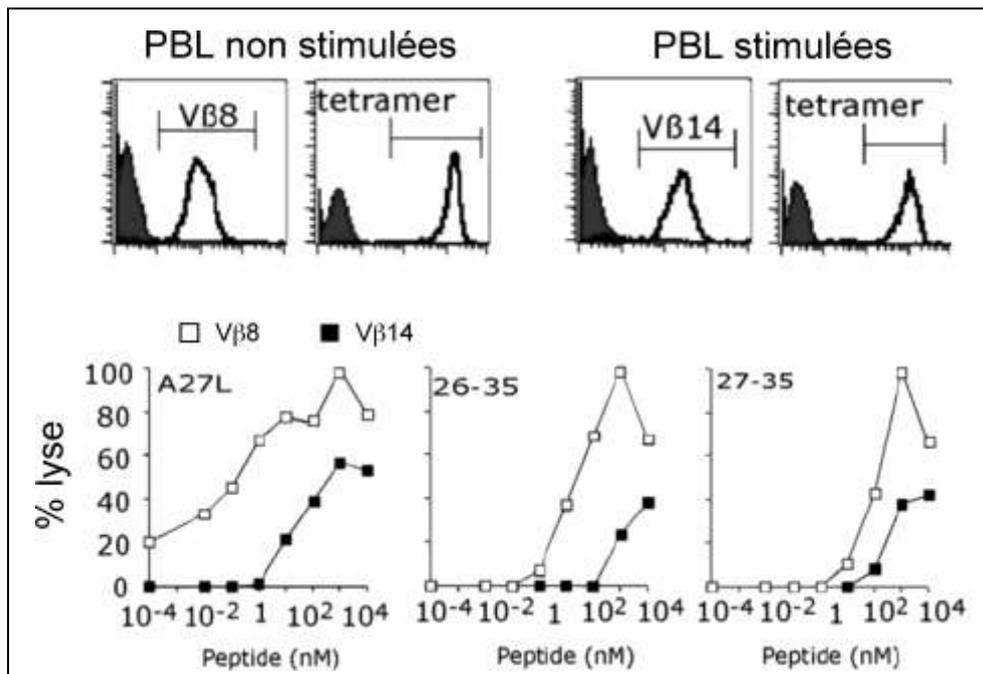


Figure 11 : Avidité des lymphocytes T Vβ8 et Vβ14 spécifiques de Melan-A  
 Analyse de l'avidité des lymphocytes T spécifiques de Melan-A Vβ8 et Vβ14 issus respectivement des tris de PBMC non stimulées et stimulées du patient M138. (A) analyse de la pureté des populations triées par marquage tétramère et Vβ correspondant. (B) Avidité des populations Vβ8 (carrés blancs) et Vβ14 (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 <sup>51</sup>Cr pendant 4h.

Le tri Vβ8 présente une meilleure affinité que le tri Vβ14 vis-à-vis des 3 peptides testés. Ce qui est en accord avec les disparités d'avidité observées pour les populations non triées : le Vβ8, 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 simulation 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 (Cebequier 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

## vi. 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 12):

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.

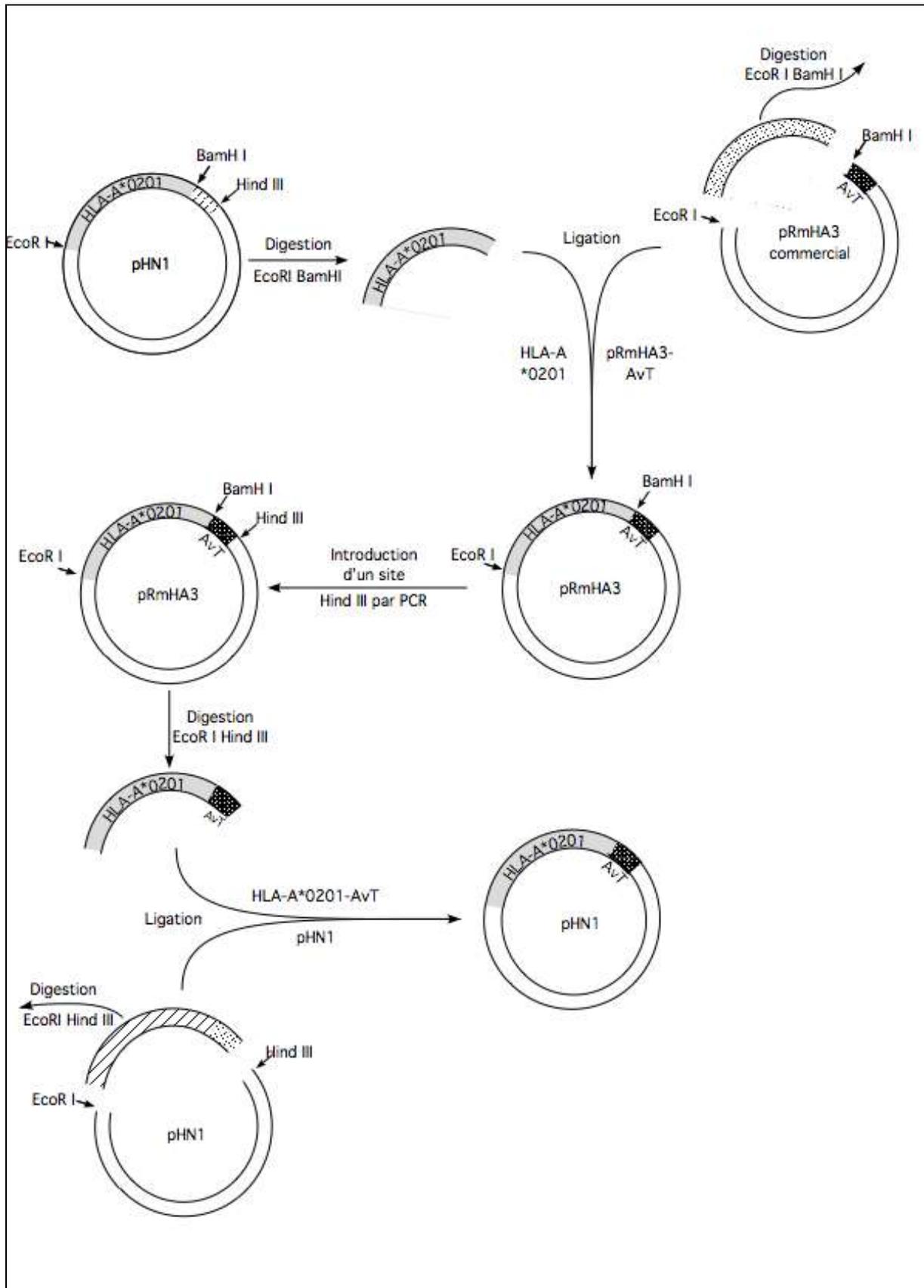
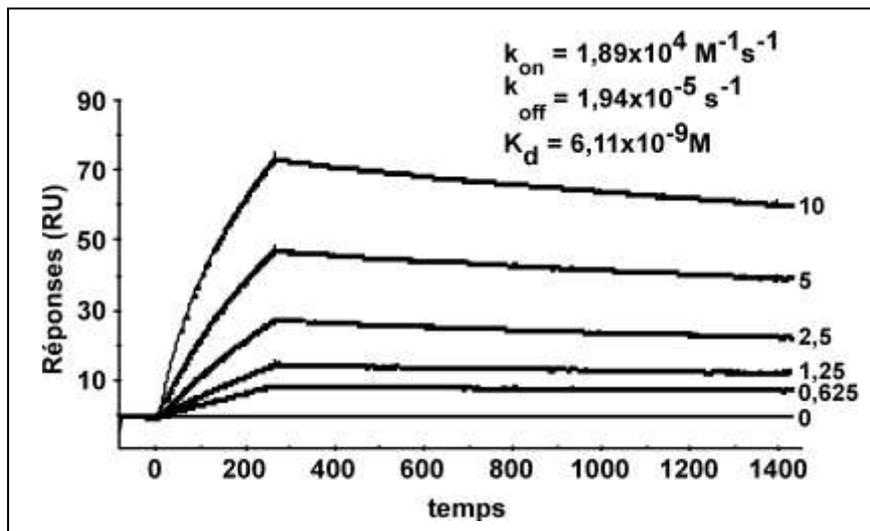


Figure 12 : Etapes de la construction du plasmide pHN1-HLA-A\*0201-AvT

## vii. 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.134). 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 13*. La valeur calculée de la constante de dissociation (Kd) 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 13 : 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 14 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 .

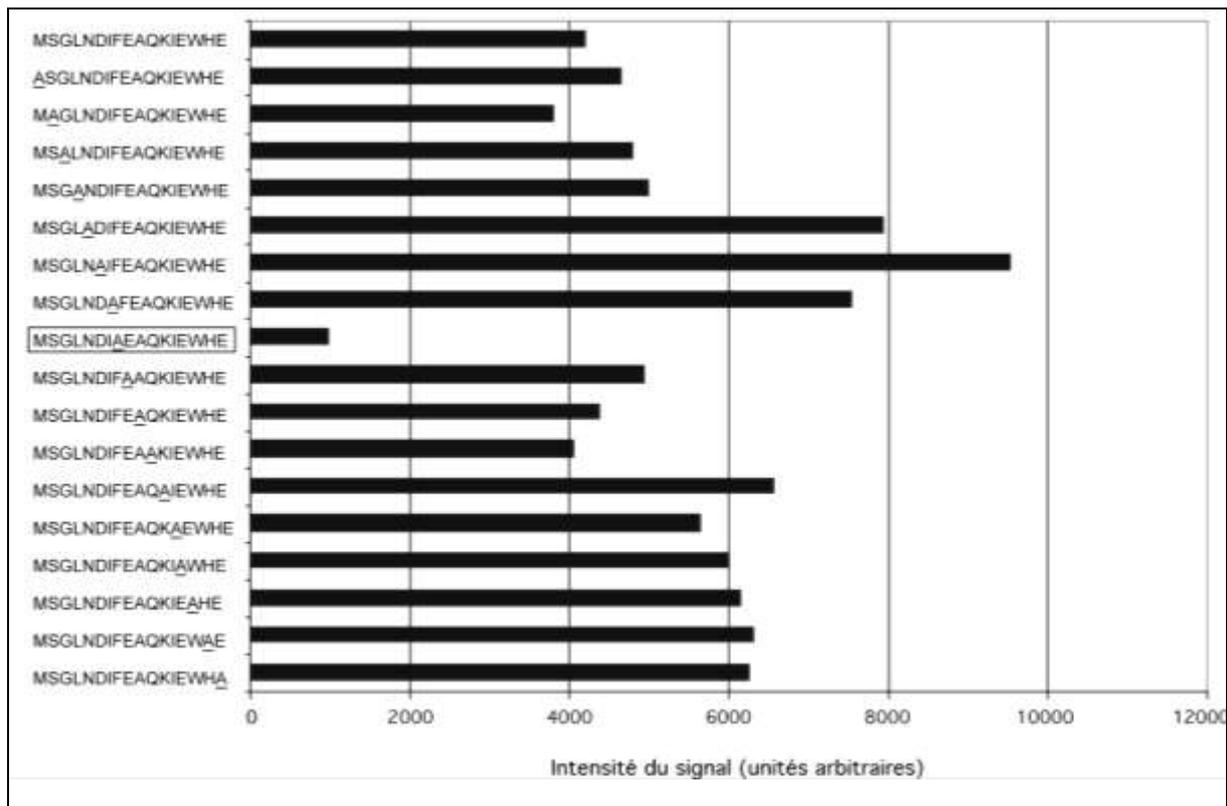


Figure 14 : Résultats de l’alanine-scan

viii. 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 15A).

Afin de déterminer avec précision la concentration saturante de HLA biotinyllé et non biotinyllé 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 biotinyllé et M280-streptavidine pour le HLA biotinyllé. 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 20):

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 biotinyllé (Figure 15B).

Avec les billes M280-streptavidine, des concentrations de 2µg/ml de monomères biotinyllés 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 15C).

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.

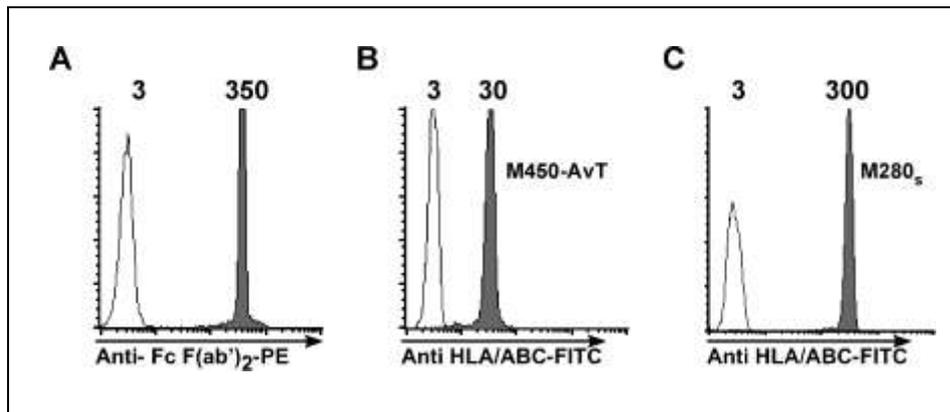


Figure 15 : Calibration des billes M450 et M280

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 4,5 $\mu$ m et 2,8 $\mu$ m). 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.

##### a. 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) (M A 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 16 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-	NA17
						100	-A
Pt 1	#1	Pt 1	#2	Pt 2 (PBMC)	Pt 3 (TIL)	Pt 5	Pt 6

	(PBM C)		(PBM C)		(PBM C)		(PBM C)		(PBM C)	(PBM C)
Population de départ										
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>
14 jours après tri/re-stimulation										
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>	1.44x10 <sup>8</sup>	1.13x10 <sup>8</sup>	2.34x10 <sup>7</sup>	1.08x10 <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.*

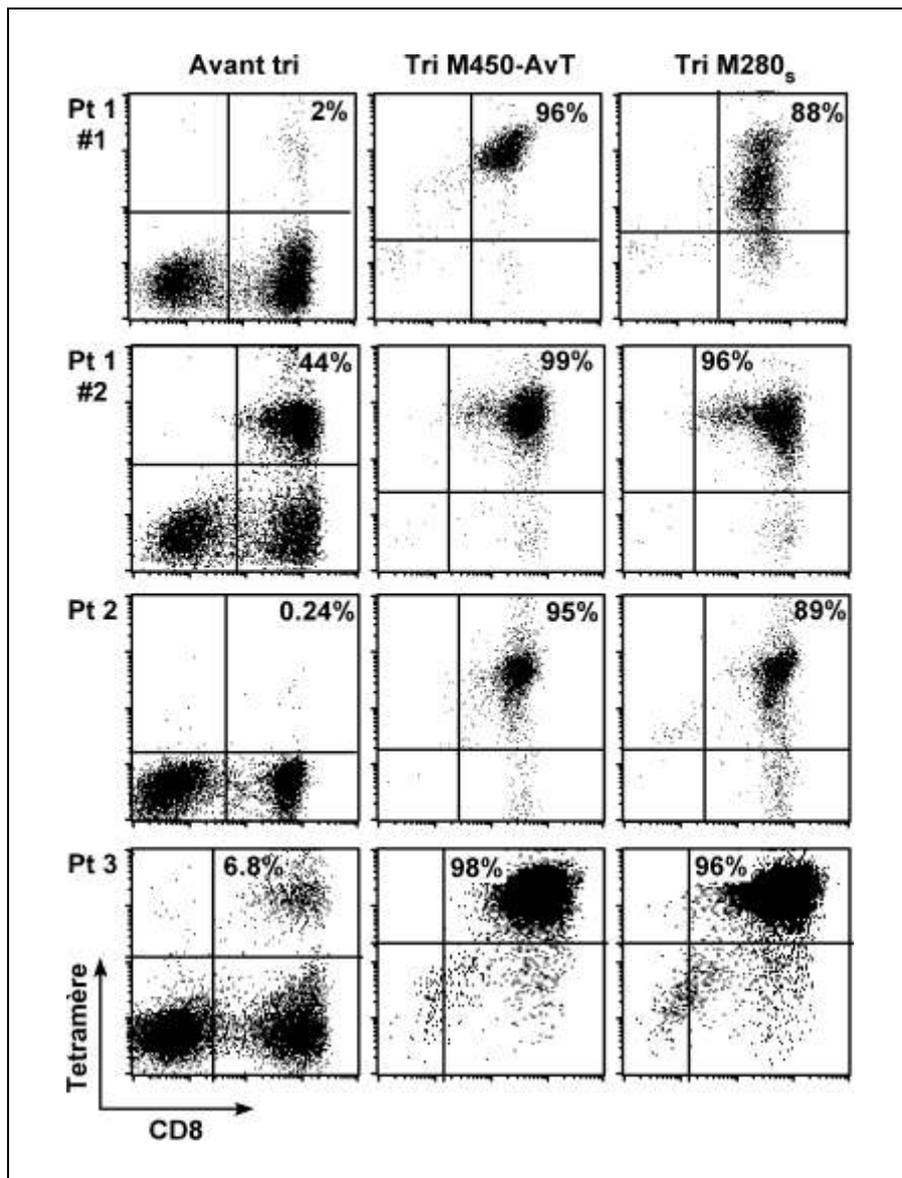


Figure 16 : Résultats des tris Melan-A

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.

*b. 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 Vβ 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 17). Nous n'observons pas de différences significatives de Vβ 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 Vβ. 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>.

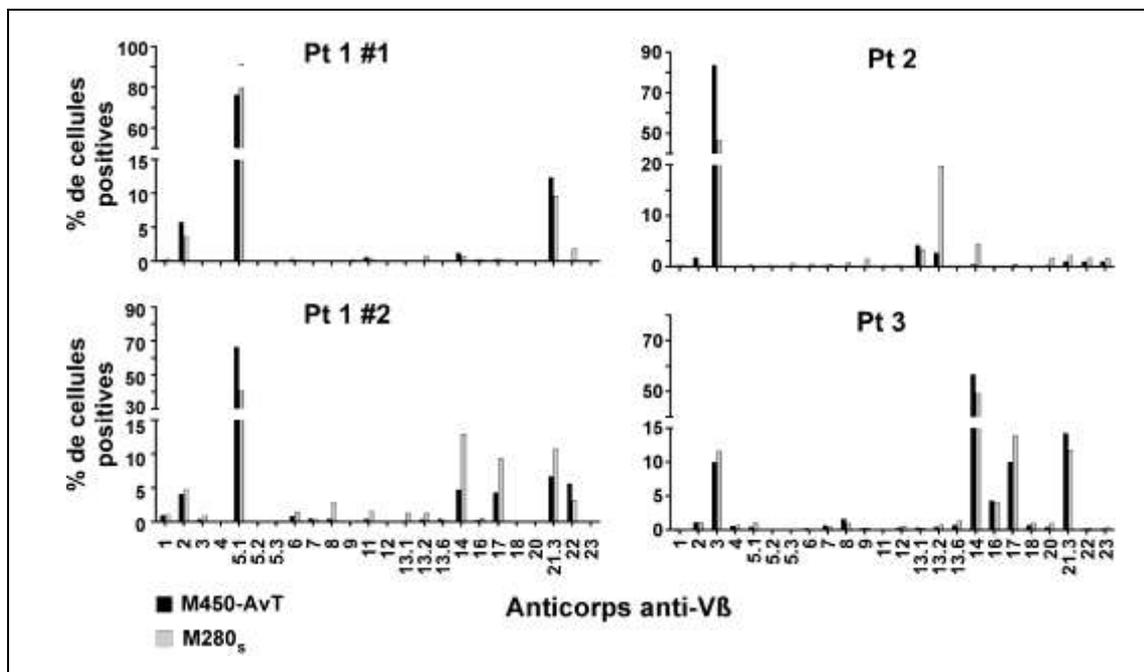


Figure 17 : Étude de répertoire des populations Melan-A triées

*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-Vβ puis analysées en cytométrie de flux.*

*c. 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.

ix. 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 18A. 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 18B : 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.

x. Production de cytokines

Chez 2 patients, nous avons comparé la production de cytokines en réponse à des lignées de mélanomes ( cf. Figure 18C). 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.

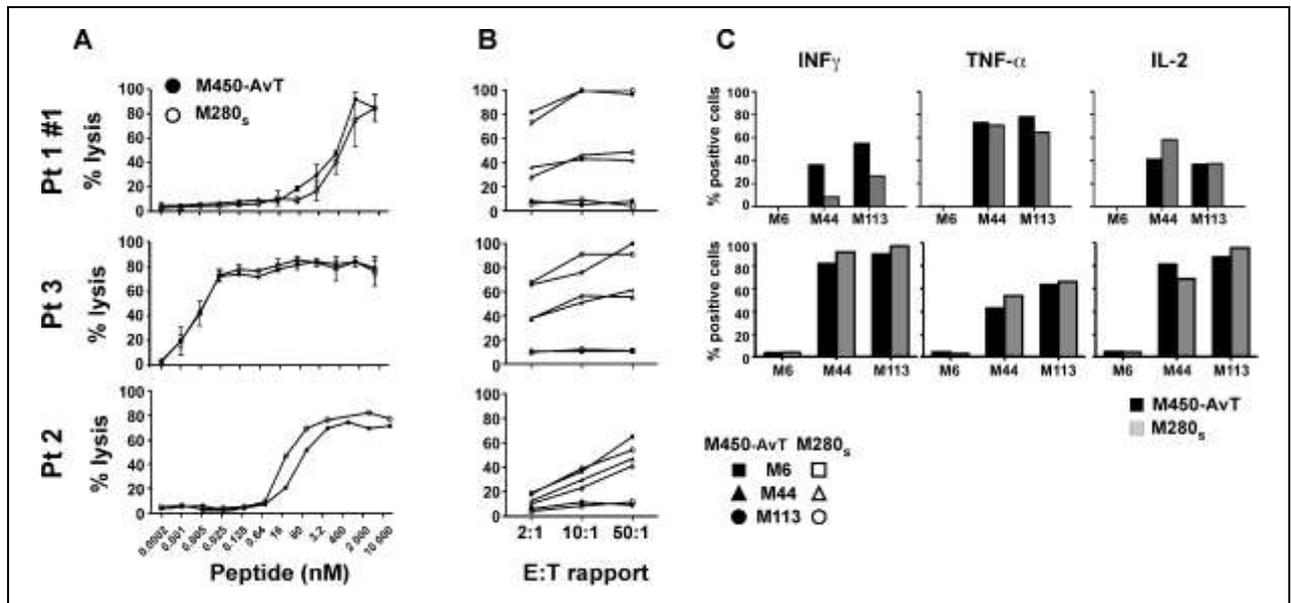


Figure 18 : Analyse fonctionnelle des tris Melan-A

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 (Nathalie Labarrière et coll. 2008; Gervois et coll. 2000; Cole et coll. 1997; Andreas 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 (Sixun Yang et coll. 2002; Nathalie 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 19A 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 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** indiquent les taux d'amplification et les facteurs d'enrichissement obtenus.

#### xi. 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 19).

#### xii. 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 19).

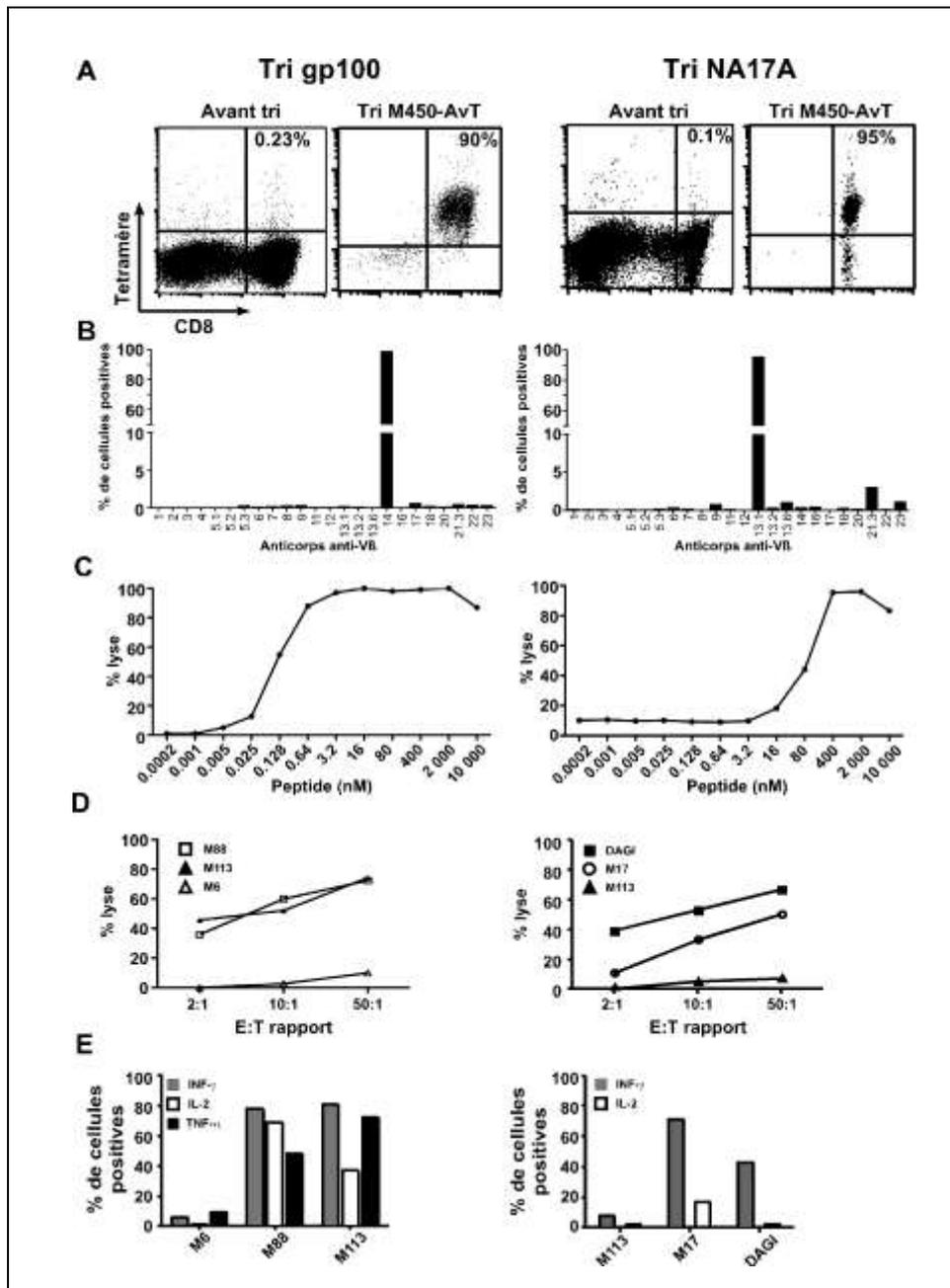


Figure 19 : Tris NA17-A et gp100

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 (Activation Induced Cell Death) (Philippe 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 20) :

M280<sub>s</sub> qui sont saturées en complexe HLA/peptide (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , MFI : 300)

M280<sub>us1</sub> qui sont produites en incubant les billes avec 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$  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 0,0075µg/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.

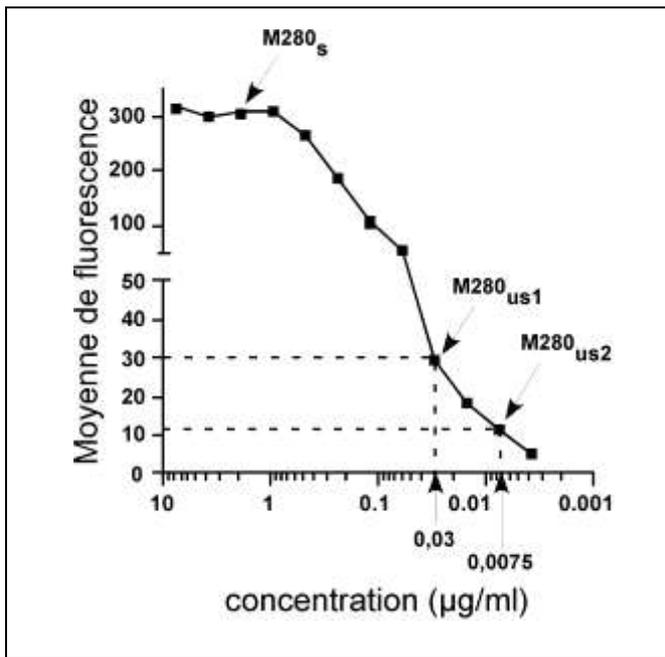


Figure 20 : Calibration des billes M280  
Courbe de calibration des billes M280 streptavidine avec le monomère HLA\*A201/MelanA biotinylé. Les flèches indiquent les concentrations de monomère permettant l'obtention des billes M280<sub>us1</sub> et M280<sub>us2</sub>.

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 21). 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 21A 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 21B résume les résultats obtenus sur un panel de clones spécifiques de Melan-A. Le pourcentage moyen d'apoptose induit dans les différentes conditions a 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.

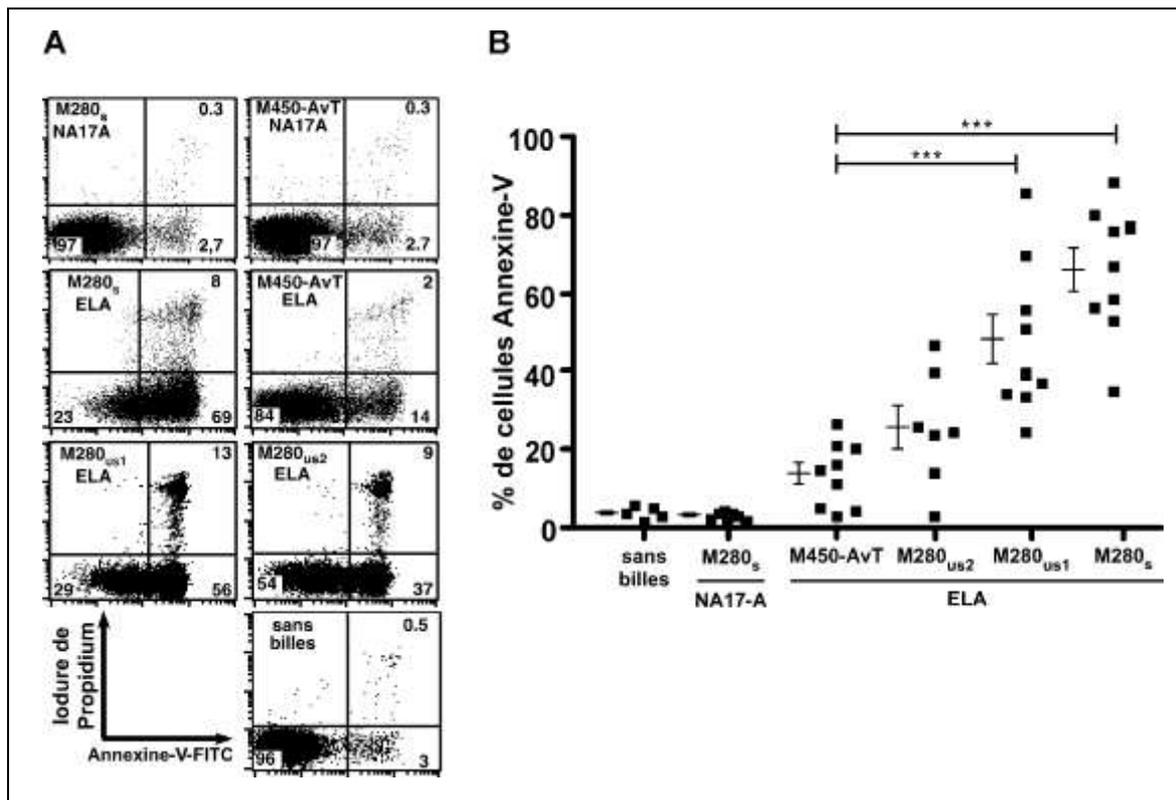


Figure 21 : Apoptose induite par les billes

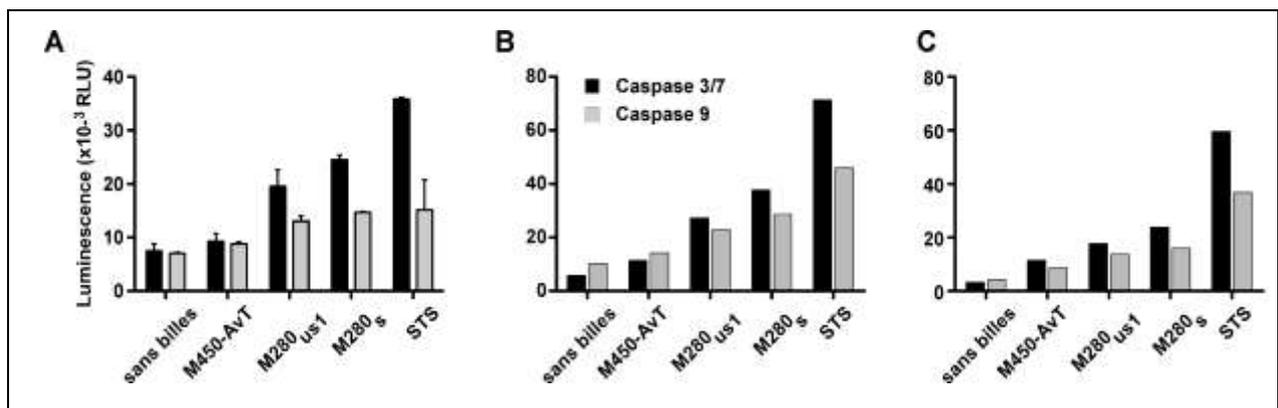
A : Exemple représentatif de l'apoptose observée sur des clones spécifiques de Melan-A après 6h d'incubation sans billes ou au rapport 1:1 avec les billes M450-AvT, M280<sub>s</sub>, M280<sub>us1</sub>, M280<sub>us2</sub> couplées au monomère Melan-A ou NA17-A. L'apoptose est évaluée par double marquage 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 22 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 22 : 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.*

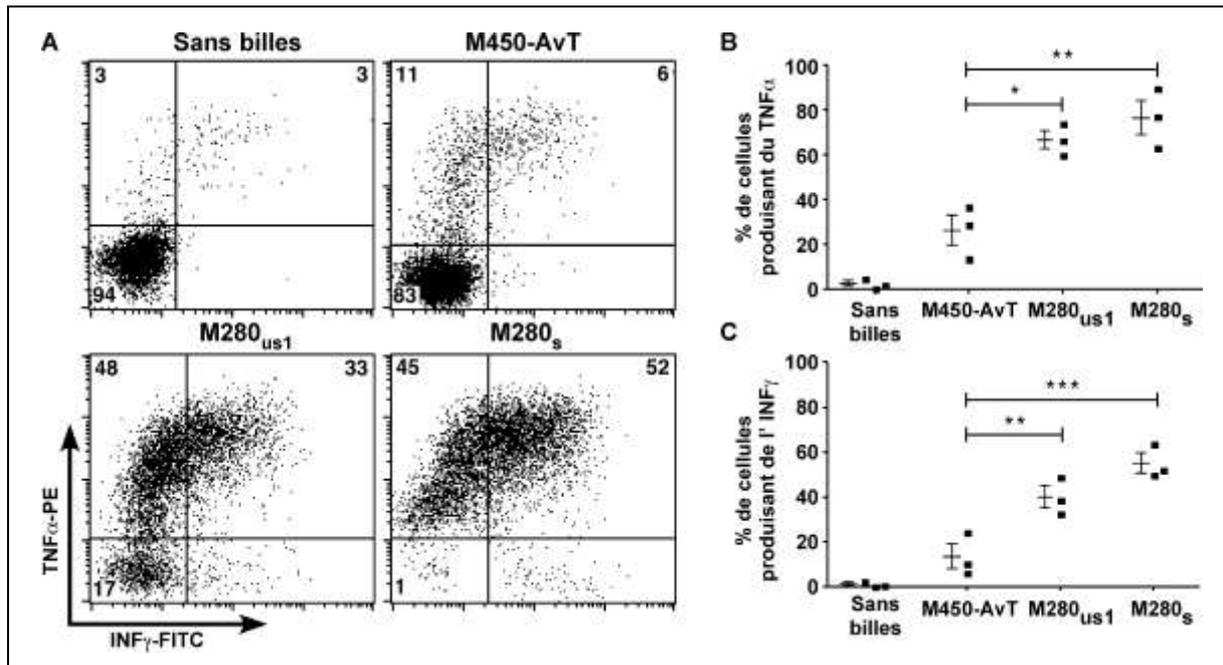
#### Activation de la production de cytokines par les différents multimères

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 23A 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 23 B et C résumant 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 minime par rapport à celle induite par les billes M280 saturées ou non.



*Figure 23 : 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 ;  $\square\square$  :  $p < 0,01$ ,  $\square$  :  $p < 0,05$*

### 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 (M 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 24).

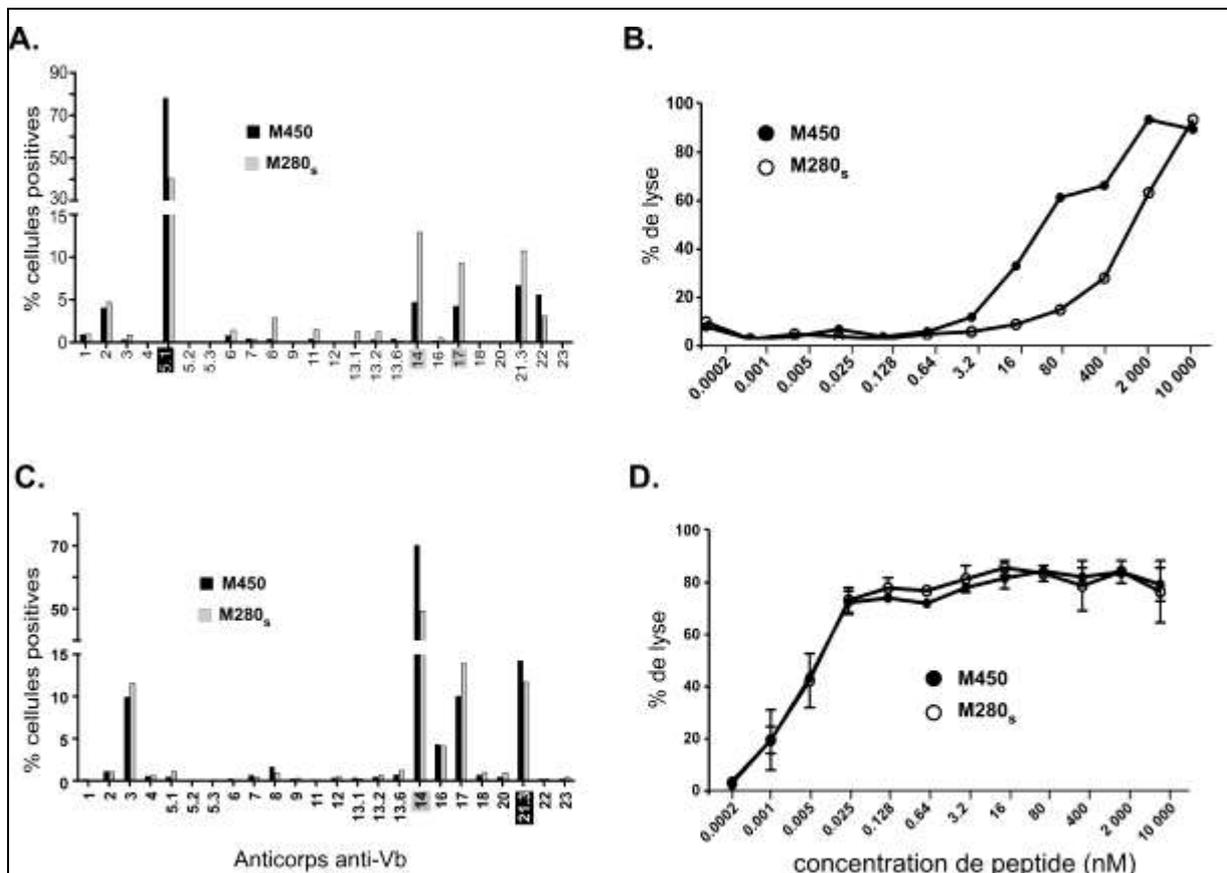


Figure 24 : caractéristiques des populations des patients 1#2 et 3  
 Caractéristiques des populations spécifiques de Melan-A du patient 1#2 (A. et B.) et du patient 3 (C. et D.) après tris. A. et C. : répertoire des populations triées par les billes M450-AvT (barres noires) et M280<sub>s</sub> (barres blanches) par

*marquage avec 24 anticorps anti-V $\beta$ . 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 V $\beta$  prédominants issus de chacun des tris de ces patients (cf. Figure 25 A et C) :

Patient n°1#2 : V $\beta$  5.1 (80%) issu du tri M450-AvT et les V $\beta$  14 (13%) et V $\beta$  17 (11%) issu du tri M280<sub>s</sub>

Patient n°3 : V $\beta$  21.3 (15%) issu du tri M450-AvT et le V $\beta$  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 25 B et D).

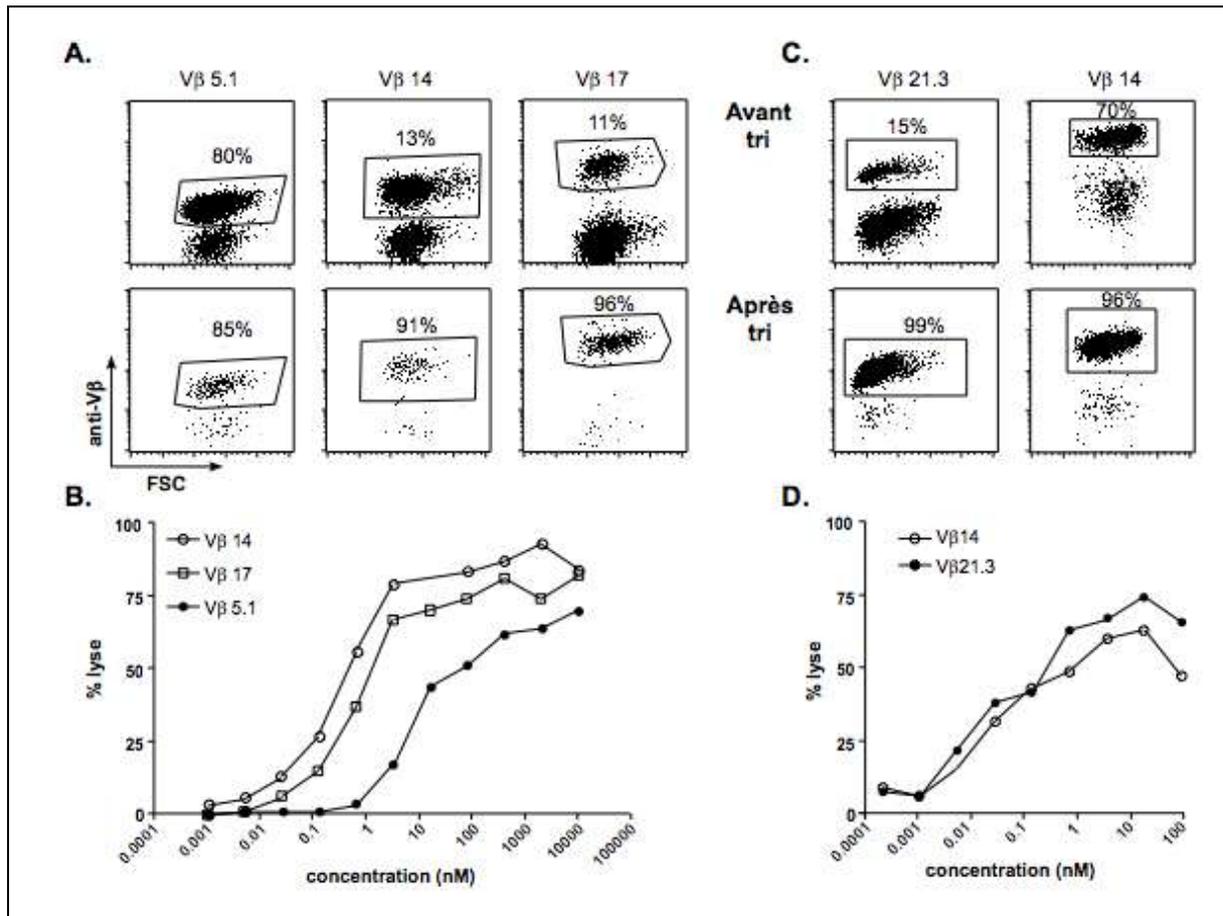


Figure 25 Résultats des tris Vβ

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 issu du tri M450-AvT (rond noir) et Vβ14 (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 obtenues présentent 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 Vβ.

#### Analyse de l'apoptose induite par les multimères sur les sous-familles de Vβ

Nous avons donc voulu savoir si certaines sous-familles de Vβ 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-Vβ, seuls les Vβ majoritaires seront analysés par la suite. Les cellules ont été incubées avec les multimères M450-AvT ou les multimères M280<sub>s</sub> 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 Vβ 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 26A et 1,6 pour la Figure 26B) ; alors que la co-incubation avec les billes M280<sub>s</sub> conduit à un facteur d'amplification global inférieur à 1 (respectivement 0,6 et 0,36 pour les populations A et B). La Figure 26 rapporte les index de stimulation obtenus pour chaque sous-famille de Vβ pour les 2 lignées testées. Pour chaque Vβ, 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 Vβ :

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.

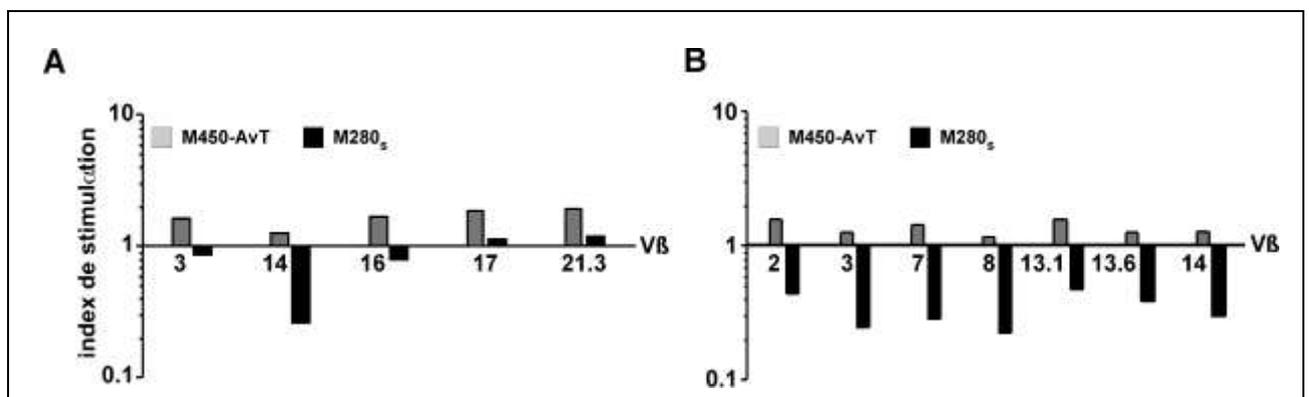


Figure 26 : Index de stimulation des sous-familles Vβ

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 Vβ 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 26A, 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 26B : 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.

## Discussion et perspectives

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 suppresseur. 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 suppresseurs, 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 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 lympho-déplétion 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 (M C 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 (N Labarriere et coll. 1998; Nathalie 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 27).

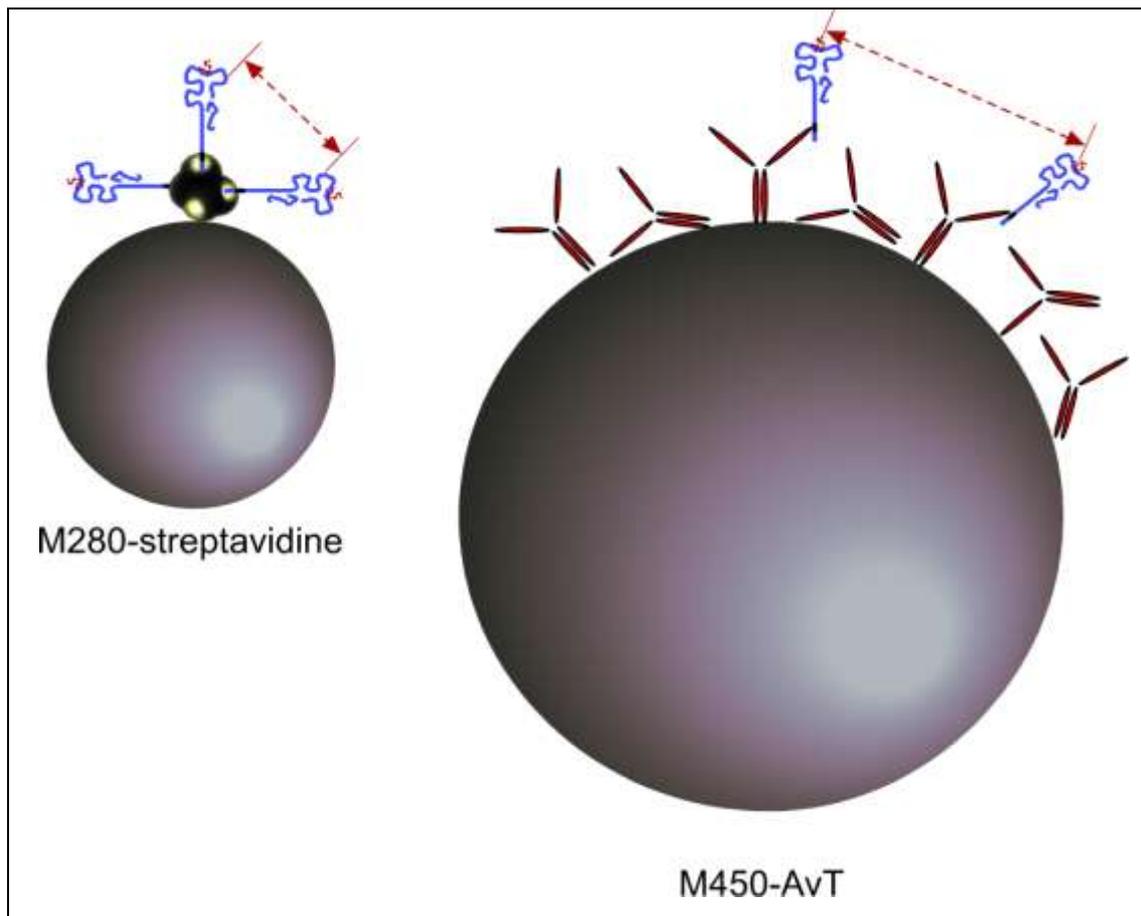


Figure 27 : Fixation des monomères sur les billes M450-AvT et M280

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 M280<sub>s</sub>. 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 (Philippe Guillaume et coll. 2003). Ces résultats confirmaient certains travaux effectués dans le laboratoire (M 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 28). 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).

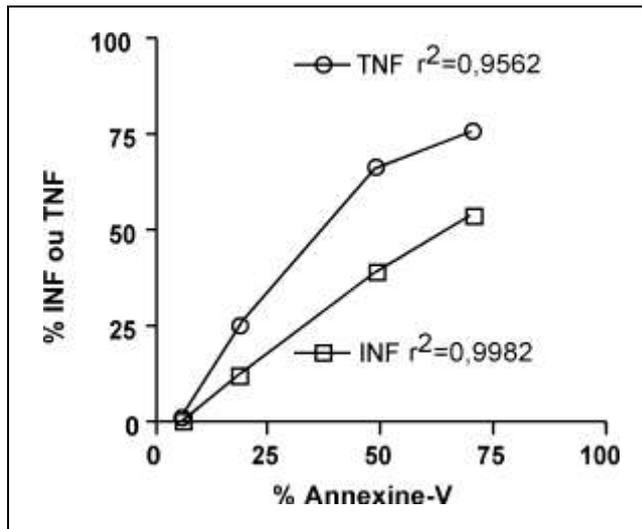


Figure 28 : Corrélation apoptose / activation

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 21). 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 (Sixun Yang et coll. 2002; Nathalie Labarrière et coll. 2008). Or, certains travaux montrent que des stimulations antigéniques répétées peuvent être à l'origine de la sélection de certains clonotypes (M A Alexander-Miller et coll. 1996; Zeh et coll. 1999). Dans une étude précédente, nous confirmions cette observation (Nathalie 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-injecté 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 (Brigitte 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 qu'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

## Matériel et Méthodes

### Culture cellulaire

#### Echantillons sanguins

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.

#### 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 numérés sur cellule de Malasez.

#### 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.

### 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.

### 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<sup>6</sup> LAZ (lymphocytes B transformés par le virus de l'EBV) et 10<sup>7</sup> 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.

### 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 (cf. *Tableau 5*).

### 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 (cf. *Tableau 5*).

Molécule ciblée	Clone et isotype	Fluorochrome
HLA*A0201	BB7-2, IgG2b	FITC
CD8	RPA-T8 IgG1, $\kappa$	FITC ou APC
HLA-ABC	B9.12.1, IgG2a	FITC

TNF- $\alpha$	6401.1111, IgG1, k	FITC ou PE
IFN- $\gamma$	45.B3 IgG1	FITC ou PE
IL2	MQ1-17H12 IgG2a, k	FITC ou PE
Anti-Vb	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 souris	Chèvre anti-souris F(ab') <sub>2</sub>	FITC ou PE

*Tableau 5 : 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 $\mu$ l de tampon contenant 5 $\mu$ l d'annexine-V-FITC et 5 $\mu$ 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

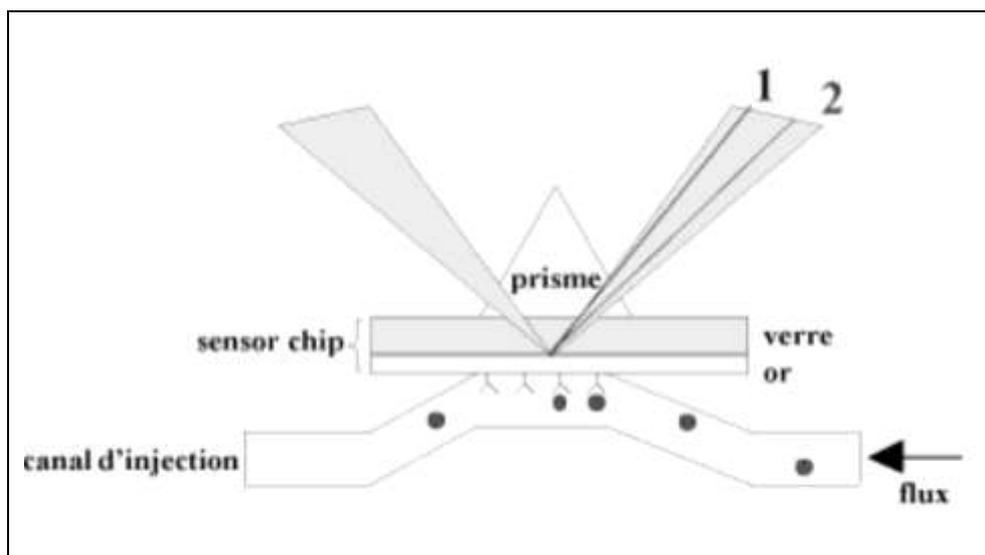
Cette seconde technique d'évaluation de l'apoptose utilise le test Caspase-Glo 3/7 et 9 de chez Proméga. Les substrats luminescents des caspases 3/7 et 9, respectivement DEVD- et LEHD-aminoluciferine, sont dissouts dans le tampon de lyse fourni. Un inhibiteur du protéasome, le MG132, est ajouté au test 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 $\mu$ 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.

#### La résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface est une méthode de mesure de la liaison d'un "ligand" sur un "récepteur" adsorbé à la surface d'une couche

métallique. Le système de détection est basé sur la mesure des variations de l'indice de réfraction d'une lumière monochromatique incidente sur la surface métallique. Cet indice de réfraction varie en fonction de la masse des molécules situées au voisinage de la surface. Ainsi, le suivi de cet angle en fonction du temps permet de suivre en temps réel l'association et la dissociation entre le ligand et l'analyte. Le signal obtenu est enregistré: c'est un sensorgramme (cf. Figure 29). Il est quantifié en unités de résonance (RU). Une variation de 1000 RU correspond à un déplacement de l'angle de  $0.1^\circ$  et équivaut à une fixation de 1 ng de protéine par  $\text{mm}^2$ . Dans les appareils commerciaux, la surface est l'une des faces d'une cellule où l'on peut faire circuler les liquides contenant le ligand (fixation) ou le solvant (relargage). On peut alors déterminer la cinétique de ces deux phénomènes.

Pour ce travail, la matrice utilisée est composée d'une surface aurifère sur laquelle des groupes dextran comportant des groupements carboxyl libres peuvent fixer de manière covalente des groupes  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{CHO}$ ,  $-\text{OH}$  ou  $-\text{COOH}$ . L'anticorps AvT-6A8 a été couplé de manière covalente à la matrice et la liaison des complexes HLA/Melan-A a été analysée.



*Figure 29 : principe du système de détection du Biacore®*

### 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).

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. (1995). Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* 181, 71-7.

Alegre, M. L., Frauwirth, K. A., et Thompson, C. B. (2001). T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 1, 220-8.

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.

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.

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.

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.

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.

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. (2004). 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.

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.

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.

Bowman, M. R., Crimmins, M. A., Yetz-Aldape, J., Kriz, R., Kelleher, K., et Herrmann, S. (1994). The cloning of CD70 and its identification as the ligand for CD27. *J Immunol* 152, 1756-61.

Brenner, D., Krammer, P. H., et Arnold, R. (2008). Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* 66, 52-64.

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.

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.

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.

Butz, E. A., et Bevan, M. J. (1998). Massive expansion of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells during an acute virus infection. *Immunity* 8, 167-75.

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.

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.

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<sup>+</sup> CTL. *J Immunol* 174, 6809-6819.

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.

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.

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.

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.

Dahl, K., Karlsson, M., Marits, P., Hoffstedt, A., Winqvist, O., et Thörn, M.

(2008). Metinel Node—The First Lymph Node Draining a Metastasis—Contains Tumor-Reactive Lymphocytes. *Ann Surg Oncol.* 15, 1454–1463.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Emanuel, P. O., Mannion, M., et Phelps, R. G. (2008). Complete regression of primary malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 30, 178-81.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Greenwald, R. J., Freeman, G. J., et Sharpe, A. H. (2005). The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23, 515-48.

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.

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.

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.

Hislop, A. D., Gudgeon, N. H., Callan, M. F., Fazou, C., Hasegawa, H., Salmon, M., et Rickinson, A. B. (2001). EBV-specific CD8+ T cell memory:

relationships between epitope specificity, cell phenotype, and immediate effector function. *J Immunol* 167, 2019-29.

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.

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.

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.

Jones, R. G. et coll. (2002). CD28-dependent Activation of Protein Kinase

B/Akt Blocks Fas-mediated Apoptosis by Preventing Death-inducing Signaling Complex Assembly. *J Exp Med.* 196, 335–348.

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.

Kannagi, R. (2002). Regulatory roles of carbohydrate ligands for selectins in the homing of lymphocytes. *Curr Opin Struct Biol* 12, 599-608.

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.

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.

Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., et Sharpe, A. H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26, 677-704.

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.

Kluck, R. M., Bossy-Wetzler, 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.

Krammer, P. H., Arnold, R., et Lavrik, I. N. (2007). Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 7, 532-42.

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.

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.

Lang, F., et Bodinier, M. (2001). MHC-peptide multimers: tools of choice for detecting and sorting antigen-specific T-cells. *Transfusion* 41, 687-90.

Latchman, Y. et coll. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2, 261-8.

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.

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, 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.

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.

Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3, 361-70.

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.

Linsley, P. S., Greene, J. L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J. A., et Peach, R. (1994). Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1, 793-801.

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.

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.

Madakamutil, L. T. et coll. (2004). CD8alpha-mediated survival and differentiation of CD8 memory T cell precursors. *Science* 304, 590-3.

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.

Mason, D. (1998). A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today* 19, 395-404.

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.

Melero, I., Murillo, O., Dubrot, J., Hervás-Stubbs, S., et Perez-Gracia, J. L. (2008). Multi-layered action mechanisms of CD137 (4-1BB)-targeted immunotherapies. *Trends Pharmacol Sci* 29, 383-90.

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.

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.

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.

Morgan, R. A. et coll. (2006). Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science*. 314, 126-129.

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.

Norcross, M. A. (1984). A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann Immunol (Paris)* 135D, 113-34.

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.

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.

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. (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.

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.

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.

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.

Révillard, J., et Assim (2001). *immunologie* 4 éd. (De Boeck Université).

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.

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.

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.

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.

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.

Schreiber, H., Wu, T. H., Nachman, J., et Kast, W. M. (2002). Immunodominance and tumor escape. *Semin Cancer Biol* 12, 25-31.

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.

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.

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.

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.

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., 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.

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.

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.

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.

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.

Tromme, I. (2007). ÉPIDÉMIOLOGIE, FACTEURS DE RISQUE ET DÉPISTAGE DU MÉLANOME.

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.

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 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.

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., Cha, K., et Kwon, B. S. (2006). Dual immunoregulatory pathways of 4-1BB signaling. *J Mol Med* 84, 726-36.

Vivier, E., et Daëron, M. (1997). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today* 18, 286-91.

Wofl, 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<sup>+</sup> T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood* 110, 201-10.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Annexes

Vu, le Président du jury

Vu, le Directeur de Thèse

Vu, le Directeur de l'UFR

Régis Bouquié

Développement d'une technique de tri de lymphocytes T CD8 spécifiques utilisable en clinique

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 représentent 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 peptide 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.

MOTS CLES : immunothérapie, mélanome, multimères CMH, lymphocytes T, tri cellulaire

Président : M. Jean-Yves PETIT, Professeur de  
Pharmacologie - Nantes

Directeur de Thèse : M. François LANG, Professeur de  
Pharmacologie – Nantes

Membres du jury : M. Antoine DUPUIS, Maître de conférence en Pharmacie  
Clinique Praticien Hospitalier – Pharmacien - Poitiers

M. Mickaël BOURGEOIS – Pharmacien  
Hospitalier

Mme Isabelle ARNAUD – Pharmacien

Adresse : Régis Bouquié, 8 rue Suzanne Lenglen 44800 Saint-Herblain