

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MEDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

Année 2013

N° attribué par la bibliothèque

									2	3
--	--	--	--	--	--	--	--	--	---	---

L'antigène de mélanome MELOE-1 :
expression tissu-spécifique et immunogénicité

THÈSE DE DOCTORAT
Discipline : Biologie
Spécialité : Immunologie/Cancérologie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Mathilde BOBINET

Le 13 décembre 2013, devant le jury ci-dessous

Présidente : Professeur Marie-Dominique GALIBERT
Rapporteurs : Professeur Joëlle ROCHE,
Professeur Bernard BONNOTTE

*Directrice de thèse :
Docteur Nathalie LABARRIÈRE
Co-directrice de thèse :
Docteur Agnès MOREAU-AUBRY*

Je remercie le Professeur Joëlle Roche et le Professeur Bernard Bonnotte d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

Je tiens à remercier également le Professeur Marie-Dominique Galibert d'avoir accepté d'être examinateur et présidente de mon jury de thèse.

Un énorme merci à Nathalie Labarrière, directrice de l'équipe 3, mais également et surtout ma chef. Merci à toi pour tout ce que j'ai pu apprendre à tes côtés depuis maintenant cinq ans. Grâce à ta gentillesse, ton humanité mais également à ton soutien dans des moments difficiles, je peux dire sans aucun doute que j'ai effectué ma thèse dans les meilleures conditions possibles.

Un grand merci aussi à Agnès Moreau-Aubry, ma co-directrice. Ton rire et tes sifflotements resteront longtemps dans mes oreilles. Ta bonne humeur a fait de notre « coin » un endroit sympa pour travailler. Merci aussi pour ta « normalité », chose pas si courante que ça.

Merci à vous deux, mes chefs, car grâce à vous j'ai passé trois années super.

Merci à toi Virginie pour toutes ces poilades en salle de culture, pour ton aide si précieuse quand je n'avais pas assez de mes deux mains, pour ta disponibilité et ton écoute.

Laëtitia, merci pour ton aide tout au long de ma thèse. Ta volonté d'aider est vraiment un bonheur. Et aussi merci pour ta gentillesse à toute épreuve.

Merci à vous deux, car grâce à ce travail « à six mains » j'ai pu avancer sans difficultés dans ma thèse.

Merci pour les copines du midi et tous ces bons moments de détente passés avec vous. Les blagues plus ou moins de bon goût me manqueront, les crises de rire aussi.

Merci à tous les membres de l'équipe 3 : Nadine, Housseem, Delphine, François, Catherine, Agnès, Romain, Maud, Sylvain et Tiphaine. Depuis cinq ans maintenant que j'orbite dans cette équipe, cela va me faire bizarre de ne plus vous croiser.

Merci à Bob Marley, grâce à qui je gagne une bouteille de champagne.

Merci à ma sœur Marceline, pour avoir pris le temps de lire mon manuscrit et de m'avoir évité tant de répétitions. Grâce toi, je n'ai jamais été aussi riche en synonyme du mot « également ».

Merci à ma famille et aussi à ma belle famille, pour avoir été à mon écoute durant toute ma thèse et durant la rédaction.

Enfin, merci à toi Charles, pour avoir été présent tout au long de ces trois ans, pour m'avoir soutenue de manière inconditionnelle dans les moments difficiles, d'avoir su me dire que j'y arriverai même quand j'étais persuadée que ce n'était pas le cas.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS	9
PRÉAMBULE	12
INTRODUCTION	15
1. LA REPONSE IMMUNE ADAPTATIVE	16
1.1. L'activation lymphocytaire T	16
1.1.1. La présentation du peptide antigénique par les cellules présentatrices d'antigènes	17
a. Internalisation de l'antigène	17
b. Apprêtement et présentation de l'antigène	18
Voies d'apprêtement des antigènes sur les molécules de CMH de classe I	18
Voie d'apprêtement des antigènes sur les molécules du CMH de classe II	21
1.1.2. La signalisation par le TCR	23
1.1.3. Activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques : la synapse immunologique	25
1.2. Les lymphocytes T	27
1.2.1. La différenciation des lymphocytes T	27
1.2.2. Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques	29
1.2.3. Les lymphocytes T CD4	30
a. Les différentes catégories de lymphocytes T CD4	30
Les lymphocytes T CD4 helper de type 1	31
Les lymphocytes T CD4 helper de type 2	33
Les lymphocytes T CD4 helper de type 17	34
Les lymphocytes T régulateurs : iTreg	35
b. Fonctions effectrices des lymphocytes T CD4 helper	35
Help CD4 sur la génération de réponses lymphocytaires T CD8 primaires	35
Help CD4 sur la génération de réponses lymphocytaires T CD8 mémoires	37
c. Rôle des lymphocytes T CD4 helper dans la réponse anti-tumorale	39
2. LE MELANOME	43
2.1. Définition et Epidémiologie	43
2.2. Classification	44
2.3. Les mutations dans le mélanome	46
3. LE CONCEPT D'IMMUNOSURVEILLANCE / IMMUNOEDITING	48
4. LA CLASSIFICATION DES ANTIGENES DE TUMEUR	51
4.1. Les antigènes « cancer germline »/« cancer testis »	51
4.2. Les antigènes surexprimés	52
4.3. Les antigènes de différenciation tissulaire	53
4.4. Les antigènes mutés - Les antigènes d'expression aberrante	54
5. LA REGULATION DE LA TRANSCRIPTION DES ANTIGENES DE MELANOME	56
5.1. La régulation par les facteurs de transcription tissu-spécifiques	56
5.1.1. Les facteurs de transcription tissu-spécifiques et la différenciation mélanocytaire	56
5.1.2. Les facteurs de transcription tissu-spécifiques et les mélanocytes adultes	62
5.1.3. Les facteurs de transcription tissu-spécifiques et le mélanome	64
5.2. La régulation épigénétique	66

5.2.1. Les Modifications des histones	67
5.2.2. La Méthylation de l'ADN	71
5.2.3. La régulation épigénétique de la transcription des antigènes de mélanome	73
6. LES IMMUNOTHERAPIES DANS LE MELANOME	76
6.1. Les immunothérapies passives ou adoptives	77
6.1.1. Transfert de Lymphocytes Infiltrant la Tumeur (TIL)	77
6.1.2. Transfert de lymphocytes T spécifiques issus de PBMC	77
6.1.3. TCR transgéniques/ Récepteurs d'antigènes chimériques (CAR)	78
6.2. Immunothérapie active : la stratégie de vaccination peptidique	80
6.2.1. Vaccination par peptides courts	80
6.2.2. Longs Peptides Synthétiques (SLP)	83
OBJET DE L'ÉTUDE	86
RÉSULTATS	90
Article 1 : Overexpression of <i>meloe</i> gene in melanomas is controlled both by specific transcription factors and hypomethylation	91
Article 2 : MELOE-1 Antigen Contains Multiple HLA Class II T Cell Epitopes Recognized by Th1 CD4+ T Cells from Melanoma Patients	94
Résultats complémentaires : Comparaison <i>in vitro</i> de l'immunogénicité de la protéine MELOE-1 entière, du long peptide MELOE-1 ₁₁₋₄₆ et du peptide court MELOE-1 ₃₆₋₄₄ .	96
1. Objectifs	97
2. Méthodologie	97
3. Résultats	99
4. Conclusion	103
DISCUSSION	105
1. Etude des mécanismes impliqués dans la régulation de la transcription du gène <i>meloe</i>	106
1.1. Régulation transcriptionnelle du gène <i>meloe</i> par les facteurs de transcription	106
1.2. Régulation transcriptionnelle du gène <i>meloe</i> par méthylation de l'ADN	109
1.3. Régulation post-transcriptionnelle	112
1.4. Conclusion	114
2. Etude de l'immunogénicité de l'antigène MELOE-1 chez les donneurs sains et les patients porteurs de mélanome	115
2.1. Caractérisation d'épitopes T CD4 présents dans l'antigène MELOE-1 capables de stimuler des réponses T CD4 helper	115
2.2. Immunogénicité de la protéine MELOE-1 en termes de réponses T CD4	116
2.3. Stratégies envisagées dans la conception du vaccin	117
2.4. Conclusion	119
BIBLIOGRAPHIE	120
ANNEXE	157
Article 3 : A long peptide from MELOE-1 contains multiple HLA class II T cell epitopes in addition to the HLA-A*0201 epitope: an attractive candidate for melanoma vaccination.	158

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

ADN	Acide désoxyribonucléique
Aim-1	Absent In Melanoma-1
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AP-1	Activator Protein-1
ARN	Acide ribonucléique
α -MSH	α-Melanocyte Stimulating Hormone

B

b-HLH-LZ	basic-Helix-Loop-Helix-Leucine-Zipper
BAGE	B Melanoma Antigen
BORIS	Brother Of the Regulator of Imprinted Sites
β 2m	β2-microglobuline

C

CAR	Chimeric Antigen Receptor
CBP/P300	CREB Binding Protein/P300
CDK	Cyclin Dependent Kinase
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation
CLIP	Class II-associated Invariant Peptide
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CREB	cAMP Response Element Binding protein
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte

D

DC	Cellule Dendritique
DCT	Dopachrome Tautomérase
DNMT	DNA Methyltransferase

E,F,G

ETS	E-Twenty Six
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAGE	G Melanoma Antigen

H

HAT	Histone acétyltransférase
-----	----------------------------------

HDAC	Histone deacetylase
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leucocyte Antigen
HLX	H2.0-like Homeobox
HMG	High Mobility Group
HPV	Human Papilloma Virus
HSP	Heat Shock Protein

I

IFN- γ	Interféron-γ
IL	Interleukine
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
ITAF	IRES Trans-Acting Factor
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

L,K

LMCV	Lymphocytic Choriomeningitis Virus
KDM	Lysine déméthylase
KMT	Lysine méthyltransférase

M,N

MAGE	Melanoma-associated Antigen
MAPK	Mitogen-activating protein kinase
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia sequence-1
MC1R	Melanocortin 1Receptor
MDSC	Myeloid-derived Suppressor Cell
MITF	Microphthalmia-associated Transcription Factor
MIIC	MHC class II Compartment
NK	Natural Killer
NY-ESO-1	New York Eosophagal Squamous cell carcinoma

O,P

OA1	Ocular Albinism 1
OLS	Organe Lymphoïde Secondaire
OVA	Ovalbumine
PAX	PAired-boX
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	Polymerase chain reaction
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PKA	Protéine Kinase A

PKC **Protéine Kinase C**
PSA **Prostate Specific Antigen**

R,S

RE **Réticulum Endoplasmique**
RISC **RNA Induced Silencing Complex**
ROR **RAR-related Orphan Receptor**
RT-PCR **Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction**
RUNX **Runt-related Transcription Factor**
SLP **Synthetic Long Peptide**
SMAC **Supramolecular Activation Complex**
SOX **Sry-related HMG Box**
SSX **Synovial Sarcoma X chromosome breakpoint**
STAT **Signal Transducer and Activator of Transcription**

T

TAP **Transporter associated with Antigen Processing**
TCR **T Cell Receptor**
TET **Ten Eleven Translocation**
TGF- β **Tumor Growth Factor- β**
Th **T helper**
TIL **Tumor Infiltrating Lymphocyte**
TLR **Toll Like Receptor**
TNF- α **Tumor Necrosis Factor- α**
TRAG-3 **Taxol Resistance Associated Gene-3**
TRAIL **TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand**
Treg **T régulateur**
Tyrp1 **Tyrosinase Related Protein 1**
Tyrp2 **Tyrosinase Related Protein 2 =DCT**

U,V,X

USF-1 **Upstream Stimulatory Factor 1**
UTR **Untranslated Region**
UV **Ultra-Violet**
VSV **Vesicular Stomatitis Virus**
XAGE **X Melanoma Antigen**

TABLE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION

FIGURE 1 : Voie de présentation endogène des antigènes sur les molécules du CMH de classe I.

FIGURE 2 : Les différents mécanismes possibles de la voie de présentation croisée par les cellules dendritiques.

FIGURE 3 : Voie de présentation d'antigènes exogènes dans les molécules du CMH de classe II.

FIGURE 4 : Représentation schématique du complexe TCR/CD3.

FIGURE 5 : Représentation schématique de la synapse immunologique.

FIGURE 6 : Marqueurs de différenciation des lymphocytes T

FIGURE 7 : Evènements précoces impliqués dans la différenciation des différentes sous-populations T CD4.

FIGURE 8 : Cytokines, voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans la différenciation Th1 et Th2.

FIGURE 9 : Modèles proposés pour la fonction des lymphocytes T CD4 dans la génération du pool de cellules T CD8 mémoires.

FIGURE 10 : Schéma récapitulatif des voies de signalisation et des gènes fréquemment mutés dans le mélanome.

FIGURE 11 : Concept de l'immunoediting.

FIGURE 12 : Facteurs de transcription tissu-spécifiques impliqués dans la différenciation mélanocytaire durant le développement embryonnaire.

FIGURE 13 : Implication du facteur de transcription PAX3 dans la régulation de l'expression du gène *dct*.

FIGURE 14 : Voie de signalisation de l' α -MSH induisant la transcription des gènes *mitf*, *Tyr* et *dct* dans les mélanocytes adultes.

FIGURE 15 : Organisation du nucléosome.

FIGURE 16 : Les différentes modifications possibles sur les histones.

FIGURE 17 : Modifications d'histone retrouvées dans le processus tumoral.

FIGURE 18 : Les principales enzymes responsables de la méthylation.

FIGURE 19 : Les différentes stratégies d'immunothérapies adoptives.

FIGURE 20 : Les différentes stratégies de vaccination peptidique.

TABLEAU 1 : Classification des mélanomes selon la 7^{ème} édition de l'AJCC.

OBJET DE L'ÉTUDE

FIGURE 21 : Localisation du gène *meloe* et structure de son transcrit.

RÉSULTATS

FIGURE 22 : Schéma récapitulatif des principaux résultats de l'article 1.

FIGURE 23 : Schéma récapitulatif des différents épitopes caractérisés dans l'article 2.

FIGURE 24 : Séquence des différents peptides utilisés dans l'étude.

FIGURE 25 : Fréquence de microcultures contenant des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope MELOE-1₃₆₋₄₄ selon la condition de stimulation.

FIGURE 26 : Pourcentage de lymphocytes T CD4 et T CD8 réactifs au pool d'épitopes T CD4 parmi les microcultures positives.

TABLEAU 2 : Fréquence de microcultures contenant des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope MELOE-1₃₆₋₄₄ selon les conditions de stimulation et chez l'ensemble des donneurs sains/patients testés.

TABLEAU 3 : Réactivité des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope MELOE-1₃₆₋₄₄.

DISCUSSION

FIGURE 27 : Facteurs de transcription impliqués dans l'activation du gène *meloe* et modes d'action envisagés.

FIGURE 28 : Représentation schématique des dinucléotides CpG, des îlots CpG présents dans le locus du gène *meloe* et statut de méthylation de la région promotrice étudiée.

FIGURE 29 : Avantages et inconvénients des différents types de SLP pour une vaccination thérapeutique.

ANNEXE

FIGURE 30 : schéma récapitulatif des différents épitopes caractérisés dans l'article 3.

PRÉAMBULE

Le système immunitaire est le mécanisme de défense de l'être humain contre toute attaque menée par un pathogène mais également contre toutes cellules du soi dont l'intégrité a été altérée comme c'est le cas lors de la tumorigénèse. L'altération de l'expression de certains gènes durant ce processus de transformation tumoral peut amener à l'expression de certains antigènes qui seront reconnus par les cellules du système immunitaire aboutissant à la destruction des cellules malignes reconnues.

Une des lignes de défenses mise en œuvre par le système immunitaire est l'immunité adaptative, qui a pour particularité d'être spécifique d'un antigène. Afin d'atteindre son objectif qui est la destruction de la cellule exprimant cet antigène, le système adaptatif fait intervenir de nombreux acteurs cellulaires dont les lymphocytes T cytotoxiques et les lymphocytes T « helper ».

Le mélanome est une tumeur essentiellement cutanée qui, à des stades avancés de la maladie, est réfractaire aux différents traitements conventionnels. Cependant, elle a pour particularité d'être fortement immunogène, c'est-à-dire que les cellules de mélanome expriment ou surexpriment ou de nombreux antigènes capables de stimuler le système immunitaire. Cette différence de profil d'expression des antigènes entre les cellules saines et leur équivalent tumoral est principalement causée par une régulation transcriptionnelle différentielle de ces gènes.

Ainsi, l'absence de traitements efficaces aux stades évolués de la maladie, mais également l'immunogénicité du mélanome ainsi que la découverte d'antigènes immunogènes exprimés par cette tumeur, font de ce cancer un bon candidat pour la mise en place de stratégies d'immunothérapie visant à rétablir une réponse immunitaire anti-tumorale efficace.

Mon travail de thèse a porté sur la caractérisation d'un antigène de mélanome, MELOE-1, cible potentielle pour des traitements d'immunothérapie. Les résultats présentés porteront d'une part sur l'étude des mécanismes contrôlant l'expression de cet antigène, prérequis pour l'utilisation d'un antigène en immunothérapie, et d'autre part sur l'étude de l'immunogénicité de cet antigène, en termes d'épitopes de classe II capables d'induire des réponses T CD4 helper.

L'introduction bibliographique qui va suivre vise à décrire dans un premier temps les mécanismes aboutissant à l'activation des cellules T du système immunitaire adaptatif ainsi que leur rôle dans un contexte tumoral. Nous décrivons ensuite le modèle d'étude qu'est le mélanome. Dans une deuxième partie nous aborderons la classification des antigènes de tumeur ainsi que leur régulation transcriptionnelle. Enfin, nous traiterons les différentes stratégies d'immunothérapies anti-tumorales élaborées et plus particulièrement la stratégie de vaccination peptidique, qui est une des stratégies visées pour l'utilisation de l'antigène MELOE-1.

INTRODUCTION

Le corps est protégé des agents infectieux et des dommages qu'ils génèrent, ainsi que d'autres substances comme les toxines des insectes, par diverses cellules effectrices et molécules qui, ensemble, constituent le système immunitaire.

Afin de protéger efficacement l'individu contre une maladie, le système immunitaire doit assurer plusieurs fonctions : la détection et l'élimination ou, du moins, le contrôle de l'infection, et la protection l'individu contre toute réinfection par le même pathogène. Cette dernière caractéristique est une propriété unique du système immunitaire adaptatif qui consiste à générer une mémoire immunologique, permettant à tout individu exposé une seule fois à un pathogène de réagir immédiatement lors d'un contact ultérieur avec ce même pathogène.

Les premières cellules à entrer en action sont les cellules phagocytaires capables d'ingérer et de tuer le pathogène. Cette première barrière de protection fait partie de l'immunité innée et survient peu après le contact avec l'agent infectieux. Chevauchant cette première phase, le système immunitaire adaptatif met plusieurs jours à se mettre en place, mais s'avère plus efficace dans l'élimination des infections que le système inné. Propre aux vertébrés, le système immunitaire adaptatif dépend de la reconnaissance spécifique des lymphocytes qui peuvent distinguer un pathogène particulier grâce à des récepteurs d'antigènes hautement spécialisés et diriger la réponse immune contre ce pathogène. Les lymphocytes sont également responsables de l'immunité à long terme qui est générée après le succès d'une réponse primaire par le système adaptatif, et qui est appelée réponse mémoire. Ainsi, même des années plus tard, le système immunitaire est apte à répondre de manière immédiate et puissante à tout pathogène déjà rencontré.

1. La réponse immune adaptative

1.1. L'activation lymphocytaire T

La réponse immune adaptative nécessite l'implication de plusieurs acteurs. Les premiers à intervenir sont les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Activées par leurs récepteurs de l'immunité innée qui reconnaissent des composés microbiens, elles sont capables de capter les antigènes du tissu infecté. Les cellules dendritiques (DC) sont les CPA

les mieux caractérisées et les plus efficaces. Activées, elles intensifient leur synthèse de molécule du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) et se mettent également à exprimer à leur surface des molécules de co-stimulation (CD80, CD83 et CD86). Ces CPA quittent ensuite le foyer infectieux et se dirigent *via* les vaisseaux lymphatiques vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS) où elles vont présenter sur les molécules du CMH des peptides issus des antigènes captés sur le foyer infectieux aux lymphocytes T naïfs circulants, deuxième acteur de la réponse immunitaire adaptative. Ces cellules T naïves sont capables de reconnaître le complexe CMH/peptide présenté à la surface des DC grâce à leur récepteur spécifique, le TCR (T Cell Receptor), et après reconnaissance, vont se diviser puis se différencier en cellules effectrices. Enfin, elles migrent vers le foyer infectieux pour y détruire le pathogène.

1.1.1. La présentation du peptide antigénique par les cellules présentatrices d'antigènes

Les lymphocytes T sont capables de reconnaître uniquement des antigènes étrangers présentés à la surface des cellules de l'organisme sous forme de fragments peptidiques. Ces peptides sont présentés à la surface cellulaire des CPA aux cellules T par des glycoprotéines cellulaires spécifiques de l'hôte, appelées molécules du CMH. Les lymphocytes T, quant à eux, reconnaissent ce complexe CMH/peptide par leur récepteur spécifique, le TCR.

a. Internalisation de l'antigène

Afin de présenter un peptide antigénique à sa surface, la DC doit commencer par internaliser l'antigène dont sera issu ce peptide. Différents modes d'internalisation de l'antigène par les DC ont été mis en évidence.

Ainsi, l'antigène peut être internalisé *via* des récepteurs de **phagocytose** tel que le récepteur mannose. Ce processus dépendant de l'actine permet l'internalisation de larges particules ou pathogènes ($\geq 1\mu\text{m}$). Les DC peuvent également utiliser un mécanisme d'**endocytose** qui, par la formation d'un réseau de chlatrine ou cavéoline, va former des vésicules permettant l'internalisation de macromolécules. Ce mécanisme utilise également des récepteurs spécifiques tels que les récepteurs aux fragments Fc, les récepteurs type

scavenger ou les récepteurs de type lectine. Enfin, la **macropinocytose**, également dépendante de l'actine, permet aux DC de concentrer et d'internaliser des antigènes solubles dans des vacuoles cytoplasmiques.

b. Apprêtement et présentation de l'antigène

Afin d'activer les lymphocytes T, la DC doit transformer l'antigène internalisé en un peptide antigénique qui sera alors présenté aux cellules T grâce aux molécules du CMH. Ce phénomène s'appelle l'apprêtement antigénique. Les complexes CMH-I/peptide et CMH-II/peptide seront respectivement reconnus par les TCR des lymphocytes T CD8 et CD4.

Voies d'apprêtement des antigènes sur les molécules de CMH de classe I

La cellule dendritique est capable de présenter des peptides antigéniques dans des molécules du CMH de classe I en utilisant deux voies d'apprêtement d'antigènes distinctes : la voie de présentation des antigènes endogènes et la voie de présentation exogène dite voie de présentation croisée.

La voie d'apprêtement classique des antigènes peut avoir lieu dans toutes cellules nucléées qui expriment les molécules du CMH-I et se divise en trois grandes étapes (**Figure 1**).

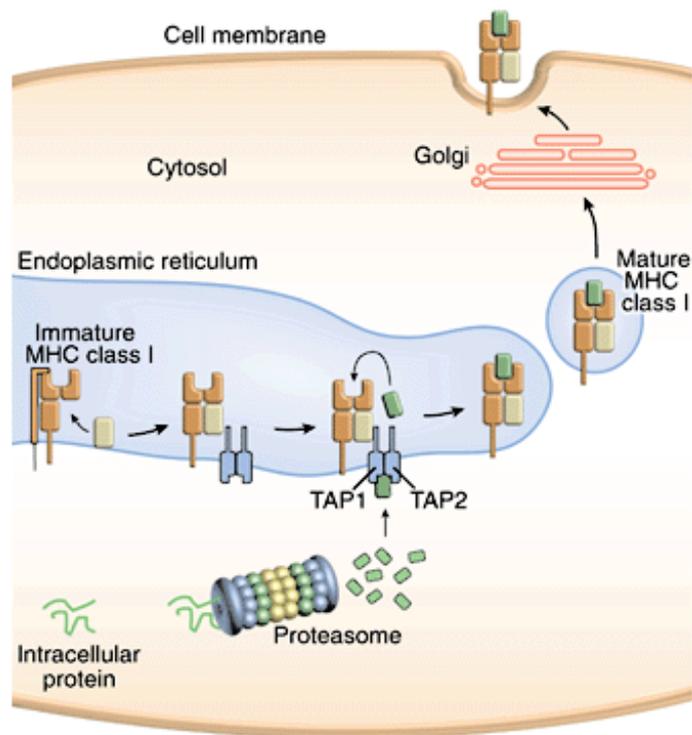


Figure 1 : La voie de présentation endogène des antigènes sur les molécules du CMH de classe I (Andersen et al., 2006)

La dégradation des protéines en peptides est réalisée par le protéasome qui dégrade majoritairement les protéines néo-synthétisées présentant des erreurs traductionnelles ou post-traductionnelles (Goldberg and Rock, 2002). L'adressage de ces protéines au protéasome se fait grâce à un signal de poly-ubiquitylation qui leur est ajouté. Le protéasome est un complexe multicatalytique possédant diverses activités protéolytiques qui dégradent uniquement les protéines ayant un signal poly-ubiquitine. Il existe deux types de protéasomes, le protéasome « standard » et l'immunoprotéasome, chacun se distinguant de l'autre par l'expression de certaines sous-unités qui les composent. L'immunoprotéasome est retrouvé exprimé uniquement par les cellules dendritiques immatures et matures et peut être induit dans les cellules tumorales sous l'action de l'IFN- γ (Interféron- γ). Si dans la majeure partie des cas les deux protéasomes sont capables de fournir les mêmes peptides antigéniques, certains épitopes semblent pouvoir être produits exclusivement soit par le protéasome standard (Morel et al., 2000) soit par l'immunoprotéasome (Chapiro et al., 2006). Dans tous les cas, les protéines captées par le protéasome sont libérées de leur signal

de poly-ubiquitylation puis linéarisées et dégradées. Les peptides générés font entre 2 et 30 acides aminés mais seuls ceux dont la taille est comprise entre 8 et 10 acides aminés peuvent être présentés par les molécules du CMH de classe I (Kisselev et al., 1999). Enfin, il existe d'autres protéases capables de générer des épitopes. Elles sont soit cytosoliques, soit situées dans le réticulum endoplasmique (RE).

Dans un deuxième temps, le **chargement des peptides dans les molécules du CMH de classe I** a lieu. La chaîne lourde du CMH-I ancrée dans la membrane du RE est associée transitoirement avec des protéines chaperonnes assurant sa stabilité et une conformation correcte afin de pouvoir se lier à la β 2-microglobuline (β 2m). Cet hétérodimère chaîne lourde/ β 2m va alors fixer un peptide issu de la dégradation par le protéasome entré dans le RE *via* le transporteur TAP (Transporter associated with Antigen Processing).

Enfin, la dernière étape consiste en **l'export des complexes CMH-I/peptide à la surface cellulaire**. Ces complexes sont relargués au niveau des sites de sortie du RE où ils sont transportés dans des vésicules à travers l'appareil de Golgi avant de rejoindre la membrane cellulaire.

La voie de présentation croisée permet aux CPA notamment professionnelles, comme les DC, de présenter des peptides issus d'antigènes exogènes dans des complexes CMH-I/peptide. Cette voie peut emprunter trois mécanismes distincts. Dans le premier dit «voie vacuolaire indépendante de TAP », les protéines exogènes sont dégradées par des protéases endo-lysosomales et les peptides qui en résultent sont chargés sur les molécules du CMH-I recyclées ou délivrées dans les compartiments endo-lysosomaux. Cependant, la majorité des études penche pour un mécanisme de présentation croisée dépendant du protéasome et de TAP (Ackerman et al., 2006; Norbury et al., 2004). Le deuxième modèle propose que la protéine internalisée rejoigne le cytosol où elle est dégradée en peptides qui seront ensuite transloqués dans le RE *via* TAP et rejoindront ainsi la voie de présentation classique. Enfin, dans le troisième modèle, les peptides issus d'une dégradation également cytosolique vont regagner les endosomes *via* TAP où ils seront chargés sur les molécules du CMH-I (**Figure 2**).

Dans tous les cas, ces mécanismes de présentation croisée permettent aux CPA de présenter aux lymphocytes T CD8 des peptides issus de corps apoptotiques (Albert et al., 1998), de cellules nécrotiques (Larsson et al., 2001), de protéines associées aux HSP (Heat

Shock Protein) (Arnold-Schild et al., 1999), ou de complexes immuns (Regnault et al., 1999) ou encore d'exosomes (Wolfers et al., 2001).

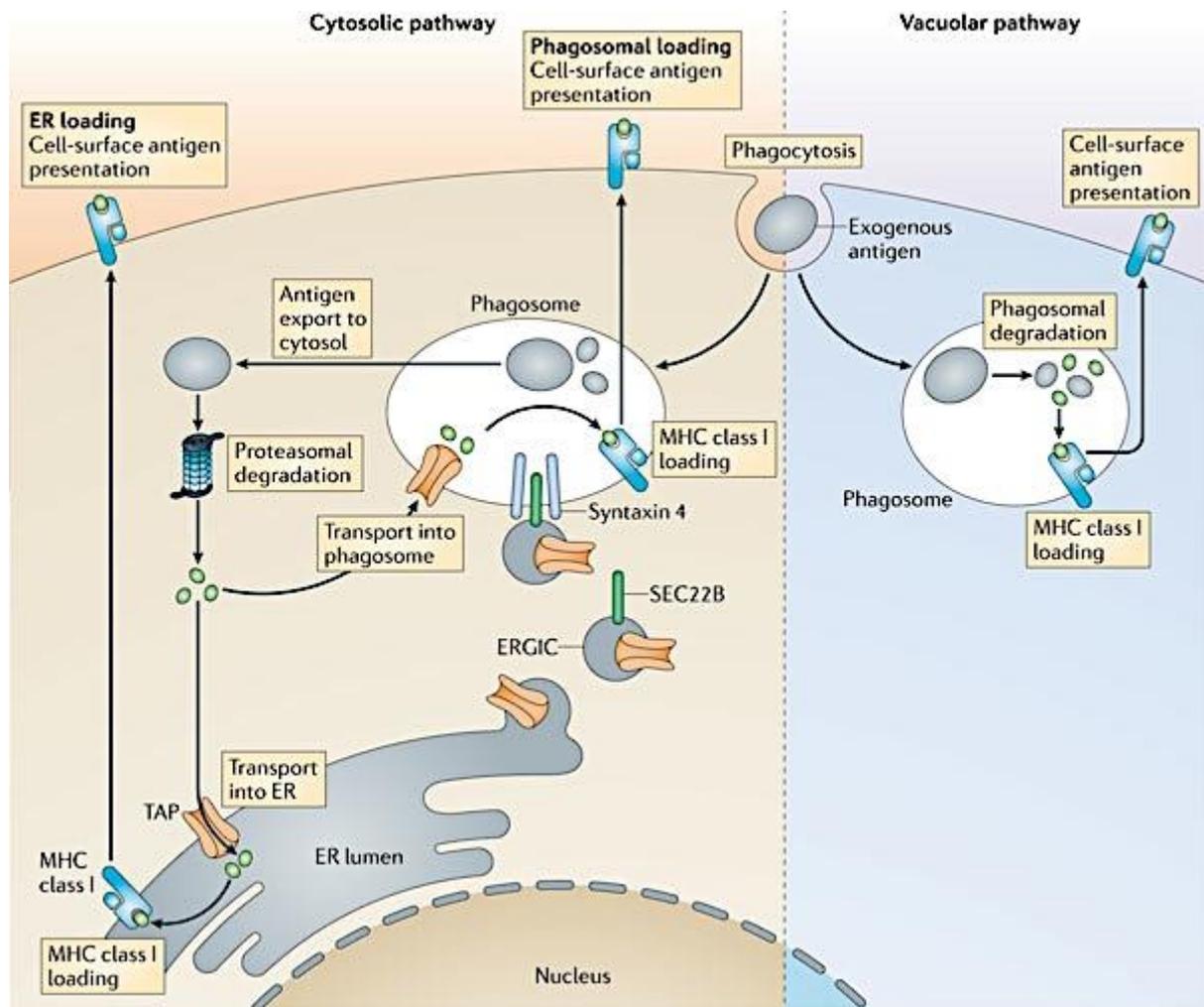


Figure 2 : Les différents mécanismes possibles de la voie de présentation croisée par les cellules dendritiques (Joffre et al., 2012)

Voie d'apprêtement des antigènes sur les molécules du CMH de classe II

Les molécules du CMH de classe II sont exprimées, en conditions physiologiques, essentiellement par les CPA (DC, macrophages, et lymphocytes B). Ces molécules peuvent fixer dans leur sillon peptidique un peptide antigénique d'une taille pouvant aller jusqu'à 20 acides aminés (Sant et al., 1999), bien que seulement neuf acides aminés soient présents

dans la poche peptidique. Les acides aminés en position 1, 4, 6 et 9 sont impliqués dans l'ancrage du peptide à la molécule du CMH.

La présentation exogène peut, elle aussi, se diviser en trois étapes. Les antigènes exogènes sont internalisés dans des compartiments endosomaux et lysosomaux et sont apprêtés afin de produire des peptides courts pouvant se fixer de manière optimale dans les molécules du CMH-II. L'apprêtement des antigènes correspond à une série complexe de réactions dont la dénaturation, la protéolyse et des phénomènes de réduction. Le pH acide retrouvé dans les compartiments endo-lysosomaux permet l'activation de protéases acides (Chapman, 1998) tout en favorisant le chargement des peptides sur les molécules du CMH-II (Jensen, 1993). Certains ponts disulfures notamment intramoléculaires doivent parfois être réduits pour que les antigènes qui les contiennent puissent être dégradés dans les endo-lysosomes. Une thiol-réductase induite par l'IFN- γ (GILT) présente dans le compartiment endosomique joue ce rôle dans la voie d'apprêtement de l'antigène.

A l'issue de leur transit par la voie sécrétoire vers la surface cellulaire, les peptides antigéniques générés progressivement pénètrent dans un organelle hautement spécialisé, le MIIC (MHC class II Compartment), où ils se chargent sur les molécules du CMH-II avant d'être présentés à la membrane cellulaire.

Dans le RE, les molécules du CMH-II composées d'une chaîne α et d'une chaîne β sont associées à une chaîne invariante Ii qui empêche toute fixation de peptides dans le sillon du CMH. La queue cytoplasmique de la chaîne invariante Ii comprend un signal d'adressage aux compartiments endo-lysosomaux. Une fois dans ces compartiments, la chaîne invariante va être découpée par différents clivages protéolytiques, générant ainsi un petit peptide nommé CLIP (Class II associated Invariant Peptide). Les complexes CMH-II/CLIP alors formés permettent de stabiliser les molécules du CMH-II. Une fois dans le compartiment MIIC, le peptide CLIP de faible affinité est remplacé par un peptide antigénique de plus forte affinité, issu de la dégradation exogène. Ce transfert est facilité par la protéine chaperonne HLA-DM.

Enfin, le mécanisme de transport à la surface cellulaire semble impliquer la transformation des MIIC en structures tubulaires qui sont dirigées directement au niveau de la synapse immunologique (Vyas et al., 2007) (**Figure 3**).

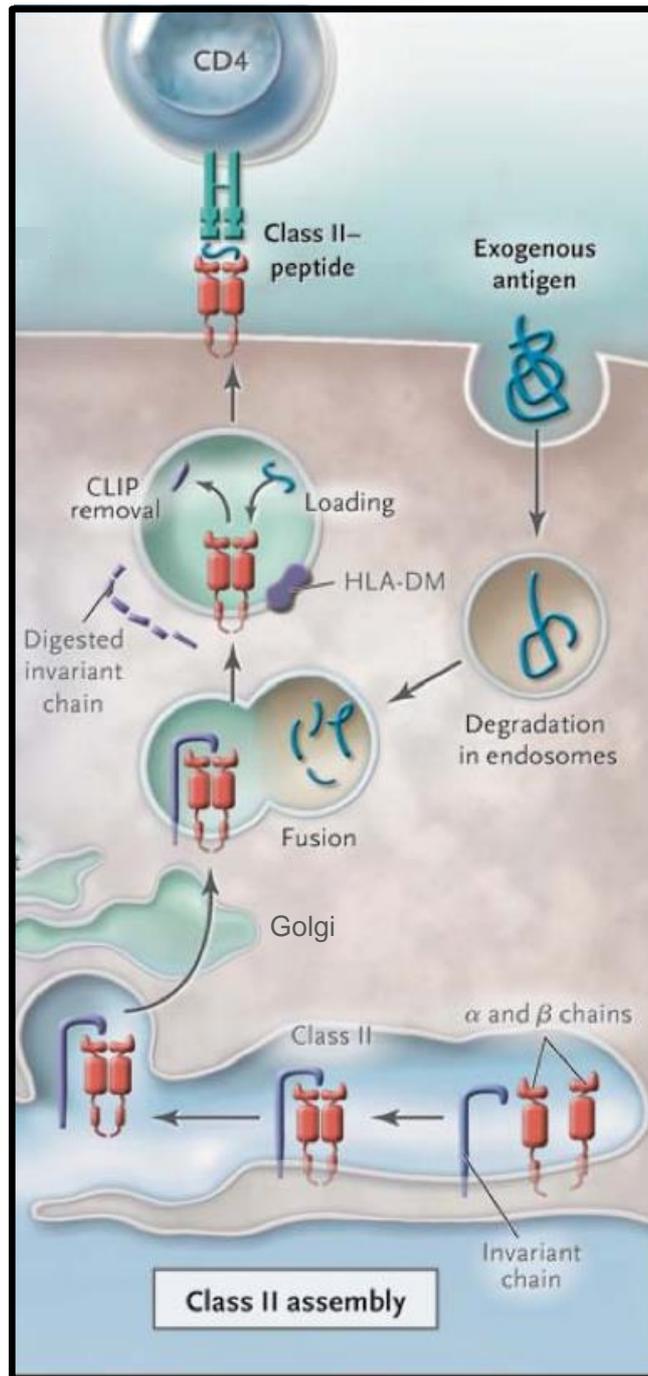


Figure 3 : Voie de présentation d'antigènes exogènes dans les molécules du CMH de classe II (Nankivell and Alexander, 2010)

1.1.2. La signalisation par le TCR

Chaque cellule T comporte à sa surface environ 30 000 molécules de récepteur antigénique identique. Chaque récepteur est constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β unies par un pont disulfure. Chaque chaîne du TCR est composée d'une partie extracellulaire

comprenant une région variable, une région constante et une courte région charnière contenant un résidu cystéine formant un pont disulfure intercaténaire ; d'une partie transmembranaire chargée positivement et d'une courte queue cytoplasmique intracellulaire.

L'hétérodimère $\alpha\beta$ est insuffisant pour constituer à lui seul un récepteur de surface complet et fonctionnel. En effet, le TCR interagit avec deux hétérodimères de chaînes protéiques CD3 ϵ /CD3 γ et CD3 ϵ /CD3 δ formant ensemble le complexe CD3, mais également avec la chaîne ζ qui se présente comme un homodimère relié par un pont disulfure. Les interactions entre le TCR et les complexes CD3, d'une part, et les chaînes ζ , d'autre part, se font grâce à la présence de charges opposées entre ces différents acteurs. La signalisation à partir du complexe du récepteur de cellule T est réalisée grâce à la présence, dans les parties intracellulaires des molécules du CD3 et des chaînes ζ , de motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), qui sont phosphorylés lorsque le récepteur interagit avec son ligand, fournissant ainsi un site de fixation à des protéines de signalisation (**figure 4**).

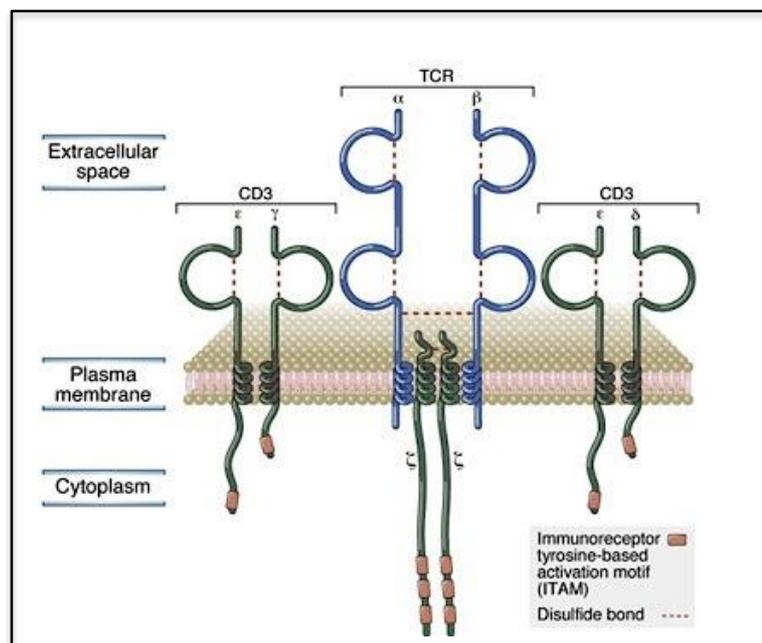


Figure 4 : Représentation schématique du complexe TCR/CD3 (www.focisnet.org)

Les gènes codant les parties variables des chaînes du TCR (deux régions variables CDR1 et CDR2 et une région hypervariable CDR3) sont structurellement semblables à ceux

des immunoglobulines. Ils contiennent de nombreux domaines V, D et J pour les chaînes β , et seulement V et J pour les chaînes α . Ces locus sont réarrangés pendant le développement des lymphocytes T, ce qui leur confère leur spécificité antigénique et offre une grande diversité de TCR (60 000 combinaisons possibles).

Les co-récepteurs CD4 et CD8, indispensables à la réponse lymphocytaire

En plus de la liaison du TCR au CMH-peptide, la cellule T nécessite d'autres liaisons avec la molécule du CMH pour stabiliser cette interaction et permettre ainsi une réponse efficace à la présentation de l'antigène.

Les lymphocytes T $\alpha\beta$ se divisent en deux classes majeures exerçant des fonctions effectrices différentes. Ces deux classes se distinguent par l'expression des protéines de surface cellulaire CD4 et CD8. La molécule CD8 est principalement portée par des cellules T cytotoxiques, tandis que la molécule CD4 est portée par des cellules T dont certaines, dites « helper », vont favoriser l'activation des lymphocytes T CD8 tandis que d'autres sont dites régulatrices. La protéine CD8 reconnaît spécifiquement la molécule du CMH-I alors que la molécule CD4 reconnaît la molécule du CMH-II. Lors de la reconnaissance du peptide antigénique, selon le type de cellules T, les molécules CD4 ou CD8 vont établir, en même temps que le TCR, une liaison avec une région invariable de la molécule du CMH, augmentant ainsi la stabilité de l'interaction.

1.1.3. Activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques : la synapse immunologique

Afin de développer une réaction immunitaire efficace, les lymphocytes T doivent être aptes à répondre à leur antigène spécifique même lorsqu'il est présent en quantité extrêmement faible. La synapse immunologique se forme autour du site de contact entre un lymphocyte T et la CPA (Norcross, 1984). Cette synapse a pour conséquence une réorganisation des protéines membranaires de la cellule T. Le TCR, les co-récepteurs et les protéines de signalisation se concentrent au site de contact tandis que les molécules inhibitrices de la signalisation, telles que les phosphatases CD45 et CD148, sont maintenues

en périphérie afin qu'elles n'interfèrent pas dans l'activation correcte des cascades de signalisation.

Cette synapse se compose de trois régions concentriques distinctes. La région centrale, appelée c-SMAC (central SupraMolecular Activation Complex), comprend toutes les molécules de signalisation importantes pour l'activation du lymphocyte T : les TCR, les corécepteurs CD4 ou CD8, le récepteur co-stimulateur CD28, la molécule d'adhérence CD2 et la protéine de signalisation PKC- θ (Protéine Kinase C- θ). La région élargie, appelée p-SMAC, comporte essentiellement l'intégrine LFA-1 et la taline, protéine du cytosquelette. Enfin, une région distale, dite d-SMAC, contient notamment la molécule CD45 qui, en déphosphorylant les molécules de transduction du signal antigénique, rend ces dernières à nouveau activables lors d'une activation ultérieure (**figure 5**).

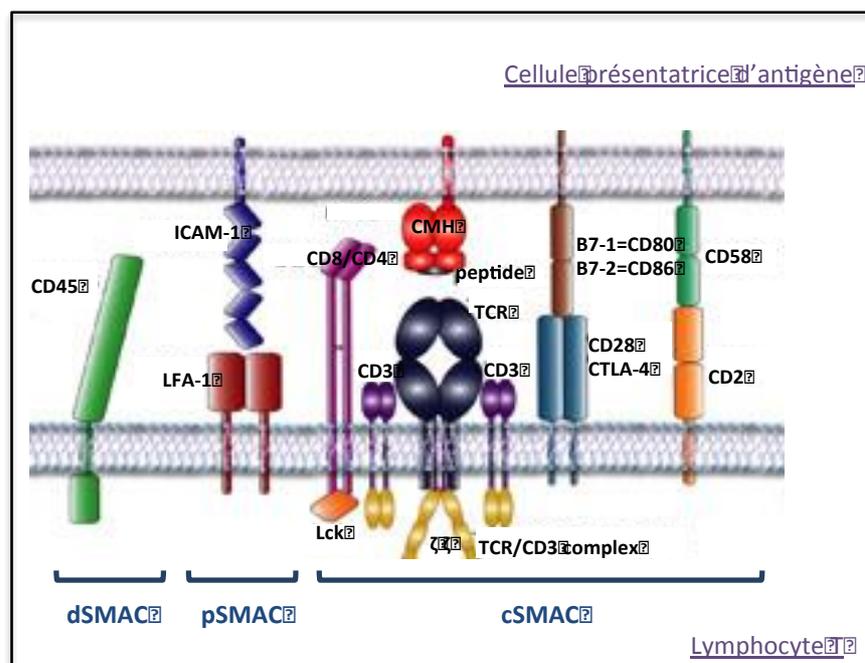


Figure 5 : Représentation schématique de la synapse immunologique (adaptée de Huang et al., 2012)

L'interaction du TCR avec l'antigène présenté à la surface d'une cellule entraîne la redistribution de différentes molécules et le déclenchement d'une cascade de réactions enzymatiques impliquant deux protéines tyrosine kinases de la famille Src, Lck et Fyn. L'activation de protéines Lck associées constitutivement aux domaines cytoplasmiques des molécules CD4 et CD8, d'une part, et l'activation d'une protéine Fyn associée faiblement aux domaines cytoplasmiques des chaînes ζ et des CD3, d'autre part, aboutit à la

phosphorylation des ITAM du complexe CD3 (Irving et al., 1993). Les ITAM phosphorylés deviennent alors des ligands de haute affinité pour la phospho-tyrosine kinase ZAP-70. Cette protéine va à son tour pouvoir recruter diverses protéines et ainsi activer plusieurs voies de signalisation aboutissant à la réorganisation du cytosquelette et à l'activation de nombreux gènes nécessaires à la différenciation, la prolifération cellulaire ainsi que l'acquisition des fonctions effectrices des lymphocytes T.

Enfin, il est important de signaler que l'interaction entre le CMH-peptide présenté par la DC d'une part et le TCR et les co-récepteurs CD4 et CD8 présents à la surface du lymphocyte T d'autre part, ne suffit pas pour déclencher une réponse T optimale. En effet, d'autres signaux de co-stimulation positifs apportés par interaction protéique entre les lymphocytes T et la DC, comme l'interaction de la molécule CD28 (portée par la cellule T) et les molécules CD80/CD86 (portées par la DC), sont indispensables à l'initiation d'une immunité efficace et leur absence résulte en une réponse T abortive par apoptose ou anergie des lymphocytes T (Harding et al., 1992; Noble, 2000).

1.2. Les lymphocytes T

1.2.1. La différenciation des lymphocytes T

Les lymphocytes T initient leur différenciation dans le thymus où des précurseurs lymphoïdes issus de la moelle osseuse viennent terminer leur maturation et donner ainsi naissance à des lymphocytes T matures dits « naïfs ». Ces lymphocytes T naïfs sortent alors du thymus et entrent dans la circulation lymphatique afin de rencontrer leur antigène.

Après un premier contact avec l'antigène dans les OLS, les lymphocytes T naïfs ($CD45RA^{high}$, $CD62L^{high}$, $CCR7^{high}$) prolifèrent et développent de nombreuses fonctions effectrices, dont la cytotoxicité, pour les cellules T CD8 principalement, et la production de cytokines. Ces lymphocytes T perdent dès lors l'expression du CD45RA (Michie et al., 1992), du CD62L et du CCR7, marqueurs phénotypiques de l'état naïf, et se mettent à exprimer faiblement le CD127 (récepteur à l'IL-7) (Huster et al., 2004) (**Figure 6**).

Après l'élimination de l'infection, la plupart de ces cellules T effectrices meurent et seule une fraction des cellules T répondeuses se différencie en cellules T mémoires. A

l'inverse des cellules T naïves qui migrent spécifiquement vers OLS, les lymphocytes T expérimentés ont une distribution plus large puisqu'ils peuvent migrer également dans les tissus non lymphoïdes. Ces lymphocytes représentent une population hétérogène comprenant au moins deux sous-types distincts : les centraux mémoires (T_{CM}) et les effecteurs mémoires (T_{EM}) (Sallusto et al., 2004; Sallusto et al., 1999). Les lymphocytes T mémoires sont caractérisés par une expression constitutive du CD127 (Stemberger et al., 2007) (**Figure 6**).

Les T_{CM} expriment le CD45RO, et ré-expriment le CCR7 et le CD62L, récepteurs nécessaires à l'extravasation des cellules T vers les OLS. Ils sont capables de produire une haute quantité d'IL-2 et sont plus sensibles aux stimulations antigéniques que les lymphocytes T naïfs. Ils ne présentent pas de fonctions effectrices immédiates mais ont la capacité, suite à une nouvelle stimulation antigénique, de proliférer rapidement et de se différencier en lymphocytes T effecteurs.

Les T_{EM} sont définis comme ne possédant pas les molécules de « homing » pour les OLS (CD62L) et donc recirculent dans les tissus non lymphoïdes. La plupart d'entre eux maintiennent des fonctions effectrices telles que l'activité cytotoxique et la production de cytokines qui peuvent être immédiatement exprimées sans nécessiter de période de re-différenciation.

Les proportions relatives de T_{CM} et de T_{EM} dans le sang varient dans les compartiments CD4 et CD8 : la population T_{CM} est prédominante parmi les lymphocytes T CD4 tandis que les lymphocytes T CD8 comportent majoritairement des T_{EM} (Sallusto et al., 2004).

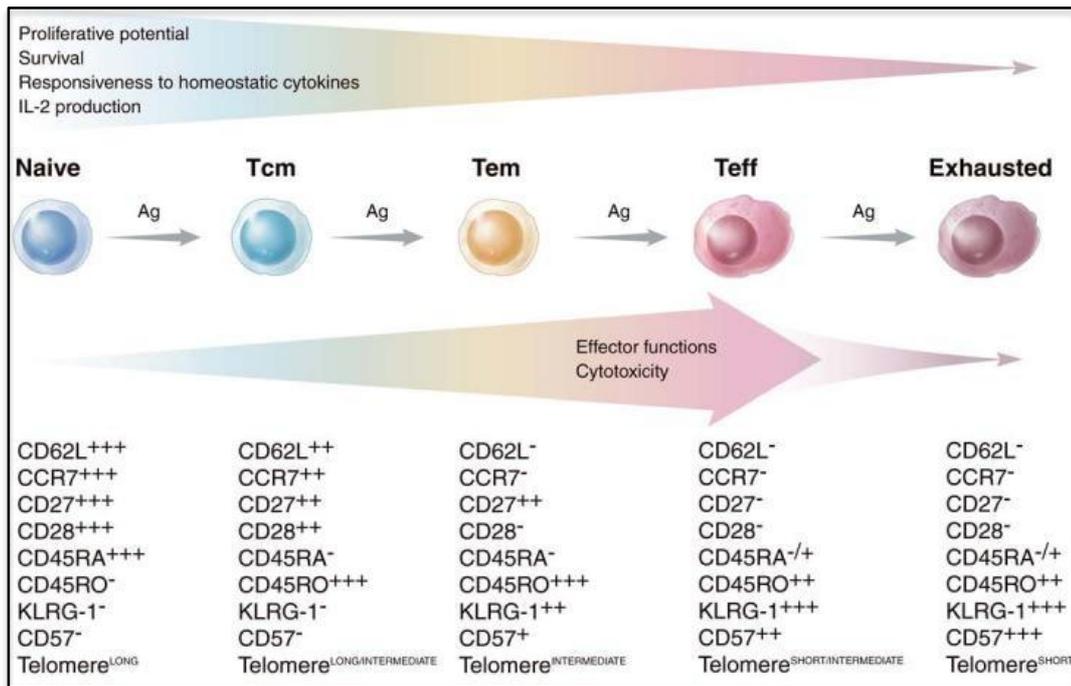


Figure 6 : Marqueurs de différenciation des lymphocytes T (Klebanoff et al., 2006)

1.2.2. Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques

L'activation des lymphocytes T CD8 naïfs suite à leur interaction avec un complexe CMH-I/peptide aboutit à la production d'IFN- γ . Cette cytokine stimule les macrophages et les recrute au site d'activation. Elle permet également l'augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe I et II à la surface des DC. Les cellules T CD8 activées produisent aussi du TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) qui agit à son tour sur l'activation des macrophages. Dans une moindre mesure, les lymphocytes T CD8 peuvent sécréter de l'IL-2, cytokine nécessaire à la prolifération des cellules T, capable d'une action autocrine positive sur les lymphocytes T CD8 activés qui surexpriment le récepteur à l'IL-2 (Sprent and Kishimoto, 2002).

Une des principales fonctions des lymphocytes T CD8 est de lyser les cellules reconnues comme anormales. Ces lymphocytes T CD8 cytotoxiques peuvent agir de différentes façons. La première consiste en l'exocytose de granules contenant des molécules lytiques telles que la perforine et les granzymes (Pasternack et al., 1986; Podack et al., 1985) au point de contact formé avec la cellule cible (Ma et al., 2007; Shen et al., 2006). La perforine permet la formation de pores dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire, laissant ainsi passer les granzymes. Le rôle de la perforine est central puisque des

souris déficientes en perforine sont incapables de se protéger contre certaines infections virales ou encore contre les progressions tumorales (Kagi et al., 1994; van den Broek et al., 1996). Les granzymes, quant à elles, médient l'apoptose des cellules cibles par des mécanismes dépendants ou non des caspases (Waterhouse et al., 2006).

Les lymphocytes T CD8 peuvent également induire la lyse de la cellule par interaction de la molécule FasL, présente à la membrane des cellules T activées, avec son récepteur Fas présent à la surface de la cellule cible. L'engagement de Fas enclenche une cascade de signalisation incluant les caspases aboutissant à la lyse de la cellule cible.

1.2.3. Les lymphocytes T CD4

a. Les différentes catégories de lymphocytes T CD4

La différenciation du lymphocyte T CD4 est plus diversifiée que celle du lymphocyte T CD8. Lorsque les cellules T CD4 naïves reconnaissent un complexe CMH-II/peptide antigénique présenté par les DC, elles prolifèrent de manière intensive et se différencient en un sous-type distinct. La polarisation des cellules T CD4 dépend de l'environnement cytokinique créé par les lymphocytes eux-mêmes mais aussi par les DC et tous types de cellules présents lors de la différenciation des cellules T CD4. Le nombre de sous-populations existantes est encore incertain à l'heure actuelle, mais quatre grandes populations ont été largement étudiées : les lymphocytes T helper de type 1 (Th1), helper de type 2 (Th2), helper de type 17 (Th17) et les T régulateurs (Treg). Chacune de ces populations est sous le contrôle de facteurs de transcription spécifiques et porte une signature cytokinique particulière.

La première démonstration de l'existence de plusieurs populations lymphocytaires T CD4 a été apportée par T. Mosmann et R. Coffman qui, en analysant différentes populations clonales de cellules T CD4 chez la souris, ont observé qu'elles pouvaient se classer en deux groupes selon les cytokines sécrétées et les marqueurs exprimés à leur surface cellulaire (Mosmann et al., 1986). Ainsi, deux populations distinctes de lymphocytes T CD4 ont émergé : les cellules Th1, ayant pour signature cytokinique la production d'IFN- γ , et les cellules Th2, caractérisées notamment par la sécrétion IL-4 et d'IL-5. En 2003, une troisième population de lymphocytes T CD4 a été découverte : les lymphocytes Th17, caractérisés par la production des cytokines IL-17A, IL-17F et IL-22 (Harrington et al., 2005). De plus, il a été

montré que des cellules T CD4 naïves pouvaient également être différenciées en cellules T régulatrices *in vitro* (Chen et al., 2003) appelées cellules T régulatrices induites (iTreg). Il existe également des iTreg *in vivo*, de phénotype FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺, qui se développent dans la périphérie des OLS après le priming par un antigène, à l'inverse des cellules T régulatrices naturelles (nTreg), considérées comme une sous-population de la même manière que les lymphocytes T CD8 et lymphocytes T CD4 puisqu'elles expriment déjà le facteur FOXP3 en sortant du thymus (**figure 7**).

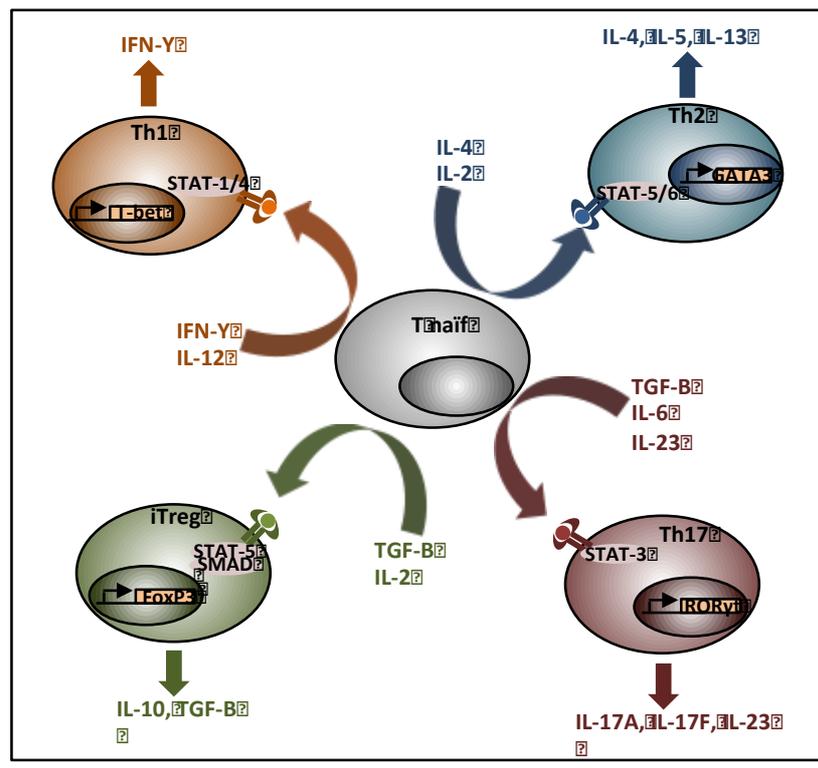


Figure 7 : Evènements précoces impliqués dans la différenciation des différentes sous-populations T CD4 (adapté à partir de (Povolero et al., 2013))

Les lymphocytes T CD4 helper de type 1

Les cellules T CD4 helper de type 1 sont les premières cellules T à avoir été décrites. Elles sont caractérisées par la production de la cytokine IFN- γ ainsi que de cytokines pro-inflammatoires tels le TNF- α et le TNF- β , pouvant dès lors aussi bien stimuler la réponse immunitaire innée qu'adaptative.

L'IL-12 et l'IFN- γ sont les cytokines critiques nécessaires à la polarisation des cellules Th1 (Trinchieri et al., 2003). L'IL-12, sécrétée majoritairement par les DC suite à leur

activation (Iwasaki and Medzhitov, 2004), permet l'expression du facteur de transcription T-bet par une voie dépendante de la protéine STAT-4 (Signal Transducer and Activator of Transcription 4) durant l'activation des cellules T naïves (Szabo et al., 2003) (**Figure 8**).

L'IFN- γ participe aussi à la différenciation Th1. En se fixant sur son propre récepteur présent à la surface des cellules T CD4 naïfs, l'IFN- γ active la protéine STAT-1 qui, à son tour, active la transcription du gène *t-bet* (Afkarian et al., 2002).

T-bet est le facteur de transcription indispensable à la polarisation Th1. Il est responsable non seulement de la surexpression de la sous-unité $\beta 2$ du récepteur à l'IL-12 (IL-12 β 2R) conférant ainsi aux cellules Th1 une réactivité à l'IL-12, mais il permet également sa propre surexpression (Lazarevic and Glimcher, 2011). De plus, T-bet induit l'expression non seulement d'IFN- γ par les cellules différenciées, provoquant ainsi un rétrocontrôle positif, mais aussi de gènes tels que ceux codant les récepteurs CXCR3 et CCR5 et les chimiokines CXCL2, CCL2, CCL3 et CCL4 qui sont responsables de la mobilisation des cellules Th1 vers le foyer infectieux. Il peut également inhiber la différenciation des autres sous-populations lymphocytaires T. En effet, T-bet inhibe la transcription du gène de l'IL-4, cytokine indispensable à la différenciation Th2, en se fixant sur son promoteur, mais peut aussi réprimer l'action du facteur de transcription spécifique de la polarisation Th2, le facteur GATA-3, en le liant directement, ce qui inhibe sa liaison aux promoteurs des gènes cibles (Djuretic et al., 2007; Hwang et al., 2005). La différenciation de la lignée Th17, quant à elle, est inhibée par la fixation de T-bet sur le promoteur *Rorc* qui code le facteur de transcription principal de la polarisation Th17, ROR γ t (RAR-related Orphan Receptor) (Lazarevic and Glimcher, 2011).

D'autres facteurs de transcription sont également impliqués dans la différenciation Th1. Parmi eux, on trouve Runx3 (Runt-related transcription factor) qui participe à l'activation du gène de l'IFN- γ et à l'inhibition du gène de l'IL-4 (Djuretic et al., 2007), ou Runx1 qui favorise la polarisation Th1 en réprimant la transcription du gène *GATA-3* indispensable à la différenciation Th2 (Komine et al., 2003) ou encore le facteur de transcription Hlx (H2.0-like homeobox), dont la coopération avec T-bet est indispensable à une production optimale d'IFN- γ (Mullen et al., 2002).

Les lymphocytes T CD4 helper de type 2

Les lymphocytes Th2 sont caractérisés par la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. Les deux cytokines impliquées dans la différenciation des cellules T CD4 naïves en Th2 sont l'IL-2 et l'IL-4 et les deux facteurs de transcription majeurs impliqués dans cette lignée sont STAT-6 et GATA-3 (Glimcher and Murphy, 2000; Kaplan et al., 1996; Zhu et al., 2001) (**Figure 8**).

GATA-3, dont la surexpression est induite par la voie de l'IL-4/STAT-6, est impliqué dans la voie de différenciation des lymphocytes Th2 de trois manières différentes : l'augmentation de la production de cytokines Th2, la prolifération sélective des Th2 par le recrutement de Gfi-1 qui favorise la prolifération des cellules exprimant fortement GATA-3 et l'inhibition de la différenciation Th1, probablement en réprimant l'expression des gènes codant T-bet et l'IFN- γ (Zhu et al., 2006).

De plus GATA-3 supprime la différenciation Th1 en inhibant la transcription de STAT-4 (Usui et al., 2003). Cependant, GATA-3 ne suffit pas à lui seul pour réguler l'ensemble des gènes nécessaires à la différenciation Th2, il doit collaborer avec STAT-6 (Horiuchi et al., 2011).

D'autres facteurs de transcription sont également impliqués dans la différenciation Th2. Parmi eux, on retrouve le facteur STAT-5, directement activé par la voie de signalisation dépendante de l'IL-2 (Zhu et al., 2003). La collaboration de GATA-3 et de STAT-5 est nécessaire à la production d'IL-4 (Zhu et al., 2003).

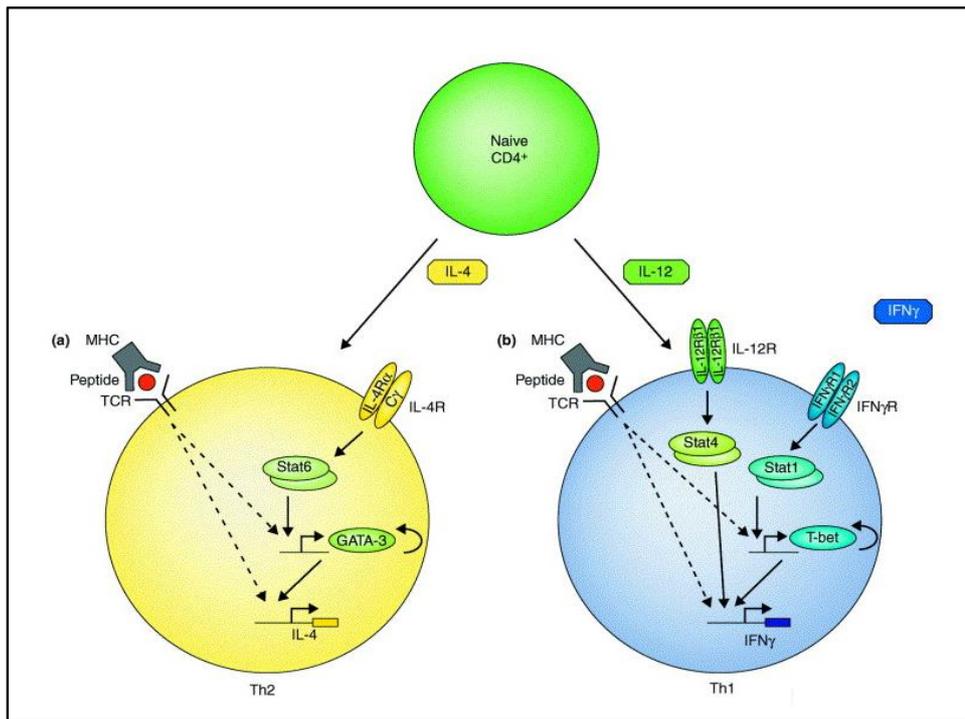


Figure 8 : Cytokines, voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans la différenciation Th1 et Th2 (Grogan and Locksley, 2002)

Les lymphocytes T CD4 helper de type 17

Comme leur nom l'indique, les lymphocytes Th17 sont caractérisés par la production d'IL-17. Les cytokines majoritairement impliquées dans leur différenciation sont les cytokines IL-6, IL-21, IL-23 et le TGF- β (Tumor Growth Factor- β) ainsi que le facteur de transcription ROR γ t. La différenciation peut se diviser en trois étapes : l'étape de différenciation médiée par le TGF- β et l'IL-6, l'amplification par l'IL-21 et la stabilisation par l'IL-23 (Korn et al., 2007).

Le TGF- β est une cytokine importante pour la différenciation des Th17 (Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2008). Pour induire la différenciation en Th17, le TGF- β doit être à faible concentration et en présence d'IL-6 (Bettelli et al., 2006). La voie de signalisation TGF β /IL-6 aboutit ainsi à l'expression du facteur de transcription ROR γ t (Ivanov et al., 2006), qui va permettre à son tour la production d'IL17-A et d'IL17-F.

STAT-3 participe aussi à ce processus de différenciation en induisant l'expression de ROR γ t et en favorisant la transcription de l'IL-17A et l'IL-17F (Chen et al., 2006). Enfin, la protéine ROR α semble également impliquée dans la différenciation Th17 (Yang et al., 2008). A l'inverse des cytokines IFN- γ et IL-4 qui participent à la différenciation des lignées Th1 et

Th2 respectivement, l'IL-17 ne participe pas à la différenciation et à l'amplification de la lignée Th17. C'est en revanche l'IL-21, produite en quantité importante par les cellules Th17 et en collaboration avec le TGF- β , qui favorise la différenciation Th17.

Les lymphocytes T régulateurs : iTreg

Les iTreg sont caractérisées par la production de TGF- β et l'expression constitutive du CD25 et de FOXP3. Néanmoins, si l'expression de FOXP3 est restreinte aux cellules Treg chez la souris, son expression transitoire est également retrouvée dans des lymphocytes T activés chez l'homme. A ce jour, le seul marqueur spécifique des iTreg humains est la déméthylation de l'intron 1 du gène *Foxp3* (Stockis et al., 2009).

La cytokine TGF- β est responsable de l'engagement des cellules T CD4 naïves dans le lignage des iTreg (Chen et al., 2003). Le facteur de transcription FOXP3 est exprimé par les cellules CD4⁺CD25⁺ régulatrices et est le facteur de transcription majeur impliqué dans la différenciation du lignage iTreg (Fontenot et al., 2003). La production du facteur FOXP3 est dépendante de la signalisation du TGF- β (Chen et al., 2003). Cette voie de signalisation passe par l'activation des facteurs de transcription SMAD2 et SMAD3, qui recrutent alors le facteur SMAD4. Ce complexe hétérodimérique est ensuite transloqué dans le noyau, où il va activer ses gènes cibles, dont celui du facteur FOXP3 (Takimoto et al., 2010). STAT-5, activé par la signalisation dépendante de l'IL-2, est également nécessaire à la différenciation des iTreg (Davidson et al., 2007). En effet, STAT-5, en se fixant sur des sites communs avec STAT-3, notamment dans le locus du gène de l'IL-17, empêche la fixation de STAT-3 et par conséquent favorise la différenciation des iTreg (Laurence et al., 2007).

b. Fonctions effectrices des lymphocytes T CD4 helper

Help CD4 sur la génération de réponses lymphocytaires T CD8 primaires

Beaucoup d'infections telles que le LCMV (Lymphocytic Choriomeningitis Virus), le VSV (Vesicular Stomatitis Virus) ou encore le HIV (Human Immunodeficiency Virus) sont capables d'induire une forte réponse T CD8 primaire en absence de help CD4 (Kundig et al.,

1996; Leist et al., 1987; Zimmerli et al., 2005). Ceci est sûrement dû à leur capacité à activer directement les CPA *via* la reconnaissance de motifs moléculaires conservés présents chez de nombreux pathogènes dont les virus, par les TLR (Toll Like Receptor) présents à la membrane des DC ; ou encore *via* la production de cytokines inflammatoires nécessaires à l'activation complète des DC (Bevan, 2004).

L'importance du help CD4 dans les réponses primaires des lymphocytes T CD8 *in vivo* a été mise en évidence par des immunisations menées dans des modèles murins avec des antigènes non-inflammatoires tels que l'antigène d'histocompatibilité mineur HY ou l'allo-antigène Qa-1 (Keene and Forman, 1982; Rees et al., 1990). Par la suite, des études ont montré que le help CD4 était nécessaire à l'induction de réponses T CD8 primaires optimales avec des antigènes solubles, des antigènes de tumeurs et des CPA chargées par un peptide antigénique (Bennett et al., 1997; Guerder and Matzinger, 1992; Husmann and Bevan, 1988). Il a alors été suggéré que, pour activer des réponses T CD8 primaires en absence d'inflammation, les DC devaient être activées par les cellules T CD4 *via* l'interaction CD40-CD40L (Bennett et al., 1998a; Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998) afin d'augmenter l'expression des molécules de co-stimulation CD80/CD86, des molécules du CMH, et la production de cytokines comme l'IL-12, cytokine indispensable à l'induction des réponses CTL (Cytotoxic T Lymphocyte) (Cella et al., 1996; Koch et al., 1996).

Le modèle simplifié d'activation primaire des lymphocytes T CD8 proposé dans le cadre d'antigènes « inflammatoires » a également été mis à l'épreuve par le fait que les réponses T CD8 primaires à certains virus tels que les adénovirus, le virus influenza, l'herpès simplex virus et le virus de la vaccine étaient compromises par l'absence de help CD4 (Smith et al., 2004; Tripp et al., 1995; Wiesel et al., 2010; Yang et al., 1995). Ainsi, ces résultats montrent que le help CD4 peut être nécessaire ou non pour lever une réponse CD8 primaire suite à une infection virale, soulevant par conséquent la question de l'existence de mécanismes différents mis en place par le pathogène pour échapper au système immunitaire de l'hôte.

De plus, des études ont montré dans un modèle murin que l'interaction directe entre le CD40L, exprimé par les lymphocytes T CD4, et le CD40, exprimé par les T CD8 activés spécifiques de l'antigène HY, favorisait leur différenciation en lymphocytes T CD8 mémoires fonctionnels (Bourgeois et al., 2002), suggérant un help CD4 direct sur les CTL. La preuve formelle d'une telle interaction dans la génération de lymphocytes mémoires n'a cependant

pas été confirmée dans d'autres modèles viraux et bactériens (Lee et al., 2003; Sun and Bevan, 2004), suggérant un rôle variable de cette interaction selon l'origine de l'antigène responsable de la réponse T CD8.

Help CD4 sur la génération de réponses lymphocytaires T CD8 mémoires

Le concept du help CD4 décrit précédemment a été profondément consolidé par la découverte que les cellules T CD4 helper étaient nécessaires à la génération de cellules T CD8 mémoires fonctionnelles et persistantes capables de répondre rapidement suite à une deuxième stimulation par un pathogène (Belz et al., 2002; Sun and Bevan, 2003). En effet, bien que des réponses T CD8 primaires puissent être induites en l'absence de help CD4 dans la plupart des infections virales et bactériennes, il apparaît que la génération de cellules T CD8 mémoires capables de prolifération suite à une restimulation ainsi que leur maintenance à long terme soient dépendantes du help CD4 dans bon nombre de modèles *in vivo* (Janssen et al., 2003; Shedlock and Shen, 2003; Sun and Bevan, 2003). Cependant, le moment où le help CD4 est nécessaire pour la génération de lymphocytes T CD8 fonctionnels reste controversé. En effet, il a été suggéré dans certaines études que le help CD4, durant les premiers jours de l'activation primaire du lymphocyte T CD8, permettait de délivrer les signaux nécessaires à une génération ultérieure d'un pool de cellules T CD8 mémoires totalement fonctionnelles (Bourgeois et al., 2002; Janssen et al., 2003; Shedlock and Shen, 2003). A l'inverse, d'autres études ont suggéré que les cellules T CD4 étaient nécessaires non pas pour « programmer » les cellules T CD8 à se différencier en effecteurs de bonne qualité, mais que le signal donné par les cellules T CD4 était requis pour la régulation de l'homéostasie des cellules T CD8 mémoires (Sun et al., 2004) (**Figure 9**).

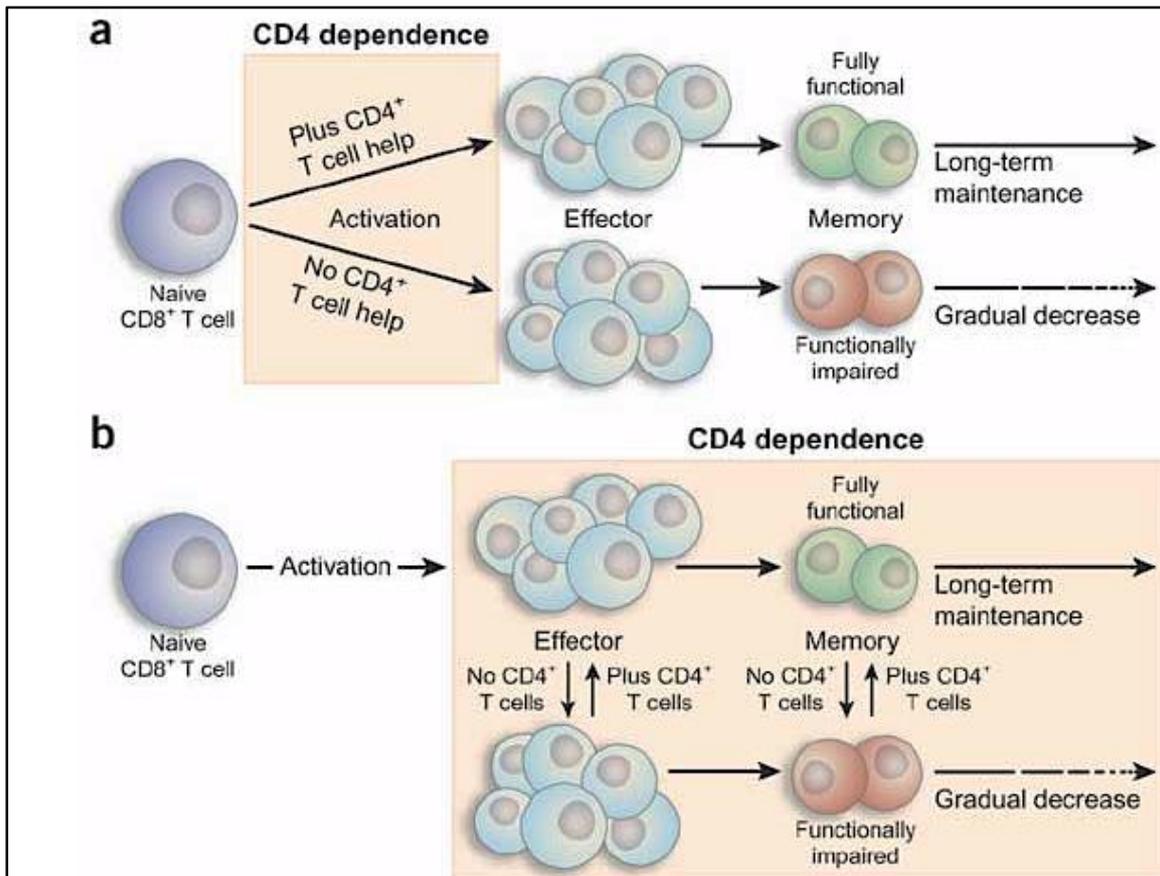


Figure 9 : Les deux modèles proposés pour la fonction des lymphocytes T CD4 dans la génération du pool de cellules T CD8 mémoire (Hamilton et al., 2004)
 (a) Le help CD4 est nécessaire durant la réponse primaire à l'antigène lymphocytes T CD8 pour programmer les cellules T CD8 à devenir des T mémoires fonctionnels. (b) Le help CD4 est nécessaire à la régulation de l'homéostasie des lymphocytes T CD8 mémoires.

Les mécanismes moléculaires intrinsèques impliqués dans l'échec de la stimulation secondaire des lymphocytes T CD8 en l'absence de help CD4 ne sont pas totalement élucidés. Il a néanmoins été montré que les lymphocytes T CD8, dans ces conditions, exprimaient des taux plus élevés de l'ARN messager (ARNm) TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) les rendant potentiellement plus sensibles à l'apoptose (Janssen et al., 2005). Cependant, d'autres études ont montré qu'une déficience en TRAIL était insuffisante pour expliquer le défaut de fonctionnalité des lymphocytes T CD8 mémoires n'ayant pas reçu de help lors de leur activation primaire (Badovinac et al., 2006; Sacks and Bevan, 2008).

Le rôle de l'IL-2 produite par les lymphocytes T CD4 helper semble également être un médiateur très important du help fourni par ces cellules (Wilson and Livingstone, 2008). En effet, bien que des cellules T CD8 déficientes pour le récepteur à l'IL-2 ne montrent qu'une

légère diminution de la réponse primaire après infection par le LCMV, la signalisation médiée par l'IL-2 semble nécessaire durant la phase primaire afin que les cellules T CD8 mémoires soient aptes par la suite à générer une réponse secondaire optimale (Bachmann et al., 2007; Williams et al., 2006). De plus, des études plus récentes ont montré que selon la dose d'IL-2 les lymphocytes T CD8 se dirigent plutôt vers un phénotype de lymphocytes mémoires (faible dose ou courte durée) ou un phénotype d'effecteur (forte dose ou stimulation persistante) (Kalia et al., 2010; Pipkin et al., 2010). Ainsi, bien que le rôle critique des lymphocytes T CD4 à délivrer l'IL-2 nécessaire au développement d'une réponse T secondaire CD8 correcte reste à démontrer, ces études montrent bien l'importance de l'amplitude et de la durée du signal apporté par l'IL-2 dans l'influence de la différenciation des lymphocytes T CD8.

c. Rôle des lymphocytes T CD4 helper dans la réponse anti-tumorale

De par leur fonction principale de lyse des cellules reconnues comme anormales, les lymphocytes T CD8 sont les effecteurs principaux de la réponse anti-tumorale. Néanmoins, comme explicité précédemment, la qualité de la réponse T CD8 est dépendante de la présence de lymphocytes T CD4 helper. Par conséquent, les cellules T CD4 helper semblent avoir également un rôle important dans la mise en place d'une réponse anti-tumorale efficace.

Dans des modèles murins, la réponse Th1 a été caractérisée comme participant et aidant l'élimination de tumeurs établies mais également comme freinant le développement tumoral et la susceptibilité à la carcinogénèse. Le rôle spécifique des lymphocytes Th1 a été initialement documenté grâce à un modèle de souris déficientes pour STAT-6 (facteur de transcription nécessaire à la différenciation Th2) où une augmentation de la polarisation Th1 était observée. Ainsi, suite à l'injection de cellules de mastocytome, les souris Stat6^{-/-} ont montré non seulement une augmentation de l'activité cytotoxique des CTL, mais également un rejet plus important des tumeurs faiblement immunogènes formées (Kacha et al., 2000). Chez l'homme, des études menées chez des patients atteints de différents types de cancers ont montré que la présence de cellules Th1 dans les infiltrats tumoraux corrélait avec un meilleur pronostic (Fridman et al., 2011).

En effet, les cellules Th1 participent au contrôle de la croissance tumorale, principalement par leur production d'IFN- γ , et de façon plus accessoire par une possible activité cytotoxique (Quezada et al., 2010). L'IFN- γ a un effet direct et indirect sur l'activation et la modulation de la réponse immunitaire (Mumberg et al., 1999; Zaidi and Merlino, 2011). En effet, cette cytokine peut induire non seulement une cascade d'évènements aboutissant à l'activation et la maturation des lymphocytes T CD8 cytotoxiques *via* l'activation des DC sur le site tumoral (Palucka and Banchereau, 2012), mais également l'élimination tumorale par l'activation des cellules NK (Natural Killer) et des macrophages de type 1 (Corthay et al., 2005). Il apparaît aussi qu'*in vitro*, la signalisation induite par l'IFN- γ provoque l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules Treg empêchant ainsi ces cellules de bloquer la réponse immune (Cao et al., 2009). A l'inverse, des souris déficientes pour l'IFN- γ ou pour le récepteur à l'IFN- γ ont tendance à développer plus facilement des sarcomes chimiquement induits (Kaplan et al., 1998), ou encore à développer spontanément des lymphomes et des adénocarcinomes du poumon (Street et al., 2002).

Un autre mode d'action de l'IFN- γ présent dans le microenvironnement tumoral est l'induction de la surexpression des molécules du CMH de classe I et II sur les cellules tumorales, favorisant ainsi leur reconnaissance par les cellules T et, par conséquent, l'élimination de la tumeur. Enfin, des études, aussi bien menées chez la souris que chez l'homme, ont montré que l'IFN- γ pouvait promouvoir l'apoptose des cellules tumorales *via* des actions sur l'expression des caspases, de FAS et de TRAIL (Chin et al., 1997; Takeda et al., 2002; Xu et al., 1998) et inhiber l'angiogenèse du microenvironnement tumoral (Coughlin et al., 1998).

Cependant, il est important de noter que l'IFN- γ semble à l'inverse pouvoir faciliter la contraction des populations T CD4 et induire le développement des cellules T régulatrices (Campbell and Koch, 2011; Liu et al., 2009), favorisant alors la progression tumorale. Néanmoins, l'action principale de l'IFN- γ est de favoriser la polarisation Th1, qui, dans le cadre tumoral, est associée au développement de réponses effectrices optimales, contrairement à la polarisation Th2 qui semble favoriser la croissance tumorale (Johansson et al., 2008).

En effet, la cytokine IL-4, majoritairement sécrétée par les lymphocytes Th2, semble agir comme un médiateur négatif dans la réponse anti-tumorale. Dans un modèle murin, il a

été montré que le transfert adoptif de cellules Th2 produisant de l'IL-4 ou encore l'administration d'IL-4 par voie intraveineuse favorisait la colonisation du poumon par des cellules de mélanome murin B16 injectées par voie intraveineuse (Kobayashi et al., 1998). Chez l'homme, des études menées chez des patients porteurs de cancers colorectaux ou de cancers de la vessie ont mis en évidence une fréquence plus élevée de lymphocytes Th2 sécrétant de l'IL-4 dans le sang périphérique par rapport à une cohorte de donneurs sains (Agarwal et al., 2006; Kanazawa et al., 2005). De même, une étude menée chez des patients porteurs de mélanome ou de carcinomes rénaux en progression a permis de documenter une fréquence accrue de lymphocytes Th2 spécifiques de l'antigène MAGE-6 (Melanoma-associated antigen) dans le sang périphérique par rapport à des patients porteurs de mélanome ou de carcinomes rénaux stabilisés ou encore de donneurs sains (Tatsumi et al., 2002).

Bien qu'une étude menée dans un modèle pré-clinique murin ait montré que les Th2 spécifiques de l'antigène OVA (Ovalbumine) aidaient à l'élimination de métastases pulmonaires de cellules de mélanome murin B16 en recrutant des éosinophiles (Mattes et al., 2003), les cellules Th2 semblent globalement avoir un rôle délétère avéré dans la réponse immune anti-tumorale.

En plus de l'IL-4, l'IL-10, sécrétée majoritairement par les sous-populations Th2 et Treg, joue aussi un rôle dans la régulation de la réponse anti-tumorale. En effet, l'IL-10 semble empêcher la présentation de l'antigène sur les CPA en inhibant l'expression des molécules de co-stimulation de la famille B7 (Steinbrink et al., 1997), en favorisant l'expression de molécules inhibitrices de cette même famille (Curiel et al., 2003), et en inhibant la production d'IL-12 et la maturation et la différenciation des cellules dendritiques (Moore et al., 2001). De plus, des études ont montré qu'*in vitro*, un traitement par l'IL-10 des cellules de mélanome conférait à ces dernières un phénotype résistant aux CTL en diminuant leur expression de molécules de classe I à la surface (Kurte et al., 2004; Petersson et al., 1998).

Bien que l'IL-10 soit généralement reconnue comme étant anti-inflammatoire et immunosuppressive, des résultats obtenus chez la souris suggèrent que l'IL-10 pourrait également favoriser l'immunité anti-tumorale. Ainsi, dans des souris dans lesquelles l'expression de l'IL-10 ou de son récepteur ont été invalidés, il a été montré que cette

cytokine médiait directement l'activation et l'expansion de lymphocytes T CD8 spécifiques de tumeurs sur le site tumoral, ralentissant ainsi la progression tumorale (Emmerich et al., 2012). Ces études montrent aussi que l'IL-10 entravait indirectement le développement, la croissance et la progression tumorale en empêchant le développement aussi bien des MDSC (Myeloid-derived suppressor cell) que des cellules Treg, connues pour favoriser la progression tumorale (Tanikawa et al., 2012).

Enfin, les lymphocytes Th17 semblent avoir un effet pro-tumoral. En effet, les cellules Th17 ont été retrouvées dans l'infiltrat tumoral à des proportions non négligeables allant jusqu'à 8 et 25% dans les cancers de la prostate et de l'ovaire respectivement (Miyahara et al., 2008; Sfanos et al., 2008), mais également dans des PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) de patients atteints de cancers gastriques où le pourcentage de cellules Th17 est augmenté par rapport aux donneurs sains (Zhang et al., 2008). La fréquence accrue de cellules Th17 dans l'infiltrat tumoral a été corrélée avec un mauvais pronostic pour les patients porteurs de carcinomes hépatocellulaires (Zhang et al., 2009b). De même, il a été montré chez des patients porteurs d'un cancer de la prostate hormono-résistant, une corrélation inverse entre la quantité de cellules Th17 circulantes et le délai avant le début de la progression tumorale (Derhovanessian et al., 2009). Enfin, dans des études utilisant des modèles tumoraux murins, il a été montré que l'IL-17 endogène pouvait promouvoir la croissance tumorale en induisant la vascularisation tumorale (Numasaki et al., 2003), mais également en favorisant sélectivement la production de chimiokines pro-angiogéniques par les cellules tumorales et les cellules épithéliales (Lee et al., 2008; Numasaki et al., 2005).

A l'instar des cellules Th2, l'effet pro-tumoral des cellules Th17 est controversé. En effet, des études pré-cliniques sur des tumeurs murines ont montré que le transfert adoptif de cellules spécifiques d'un antigène de mélanome polarisées en cellules Th17 *in vitro* induisait une régression tumorale (Muranski et al., 2008). De même, des études cliniques chez des patients porteurs de cancers de l'ovaire avancés ont montré que des fortes quantités de cellules Th17 dans l'infiltrat tumoral et des concentrations élevées d'IL-17 dans les ascites corrélaient avec une survie prolongée des patients (Kryczek et al., 2009; Wilke et al., 2011). Des résultats similaires ont été observés dans d'autres types de tumeurs suggérant un rôle bénéfique des cellules Th17 (Chen et al., 2011; Sfanos et al., 2008). Enfin, la présence de cellules Th17 a été observée comme négativement corrélée avec la présence

de cellules Treg et positivement corrélée avec celles de CTL, de NK et de lymphocytes Th1 (Kryczek et al., 2009; Wilke et al., 2011; Zou and Restifo, 2010).

En résumé, le rôle des cellules Th17 dans la progression tumorale reste assez controversé et ces observations contradictoires suggèrent une certaine plasticité dans leurs fonctions, probablement liée à l'environnement tumoral.

2. Le mélanome

2.1. Définition et Epidémiologie

Le mélanome malin est une tumeur maligne du système pigmentaire dont la forme la plus fréquente est le mélanome cutané. Ce dernier apparaît majoritairement (70-80%) sur peau saine mais il peut également se développer à partir d'un naevus préexistant. Bien que le mélanome cutané ne représente que 5% des cancers de la peau, il est la principale cause de décès par cancer cutané.

Le mélanome cutané se subdivise en quatre principaux types.

Le mélanome superficiel extensif, diagnostiqué dans 70% des cas. Il est le plus souvent localisé sur le tronc et le dos pour les hommes et sur les jambes et le tronc en ce qui concerne les femmes. Il est la première cause de décès par cancer chez les jeunes adultes.

Le mélanome acro-lentigineux représente, quant à lui, 5% des mélanomes cutanés. Il apparaît le plus fréquemment sur les ongles, la paume des mains ou la palme plantaire. Il est le mélanome le plus retrouvé dans la population afro-américaine et asiatique.

Le mélanome de Dubreuilh ou lentigo malin est retrouvé le plus souvent chez les personnes âgées, au niveau des zones exposées de manière chronique au soleil.

Le mélanome nodulaire représente 15% des mélanomes cutanés diagnostiqués. Il est le seul à avoir une progression verticale et horizontale simultanées. Ce caractère invasif fait de lui le mélanome cutané le plus agressif. Il est le plus fréquemment retrouvé chez les personnes âgées de plus de 60 ans et préférentiellement chez les hommes.

En 2008, 200 000 nouveaux cas de mélanomes cutanés ont été recensés à travers le monde (Source : GLOBOCAN, 2008) et la mortalité qui lui était imputable cette même année était de 46 000 décès. En ce qui concerne la France, les derniers chiffres donnés par la Haute Autorité de Santé annoncent une incidence du mélanome cutané de 9 784 cas en 2011 (dont la moitié chez l'homme) et ayant causé 1 618 décès.

Plusieurs facteurs de risques sont associés au mélanome. On retrouve des **facteurs environnementaux et/ou comportementaux** (exposition aux UV, antécédents de brûlures solaires, notamment pendant l'enfance), **certaines caractéristiques physiques** (peau/yeux/cheveux clairs, tâches de rousseur, multiples naevi ou naevi atypiques/dysplasiques), **une sensibilité importante au soleil** (brûlure systématique suite à une exposition au soleil même brève) et enfin **des antécédents personnels de cancers cutanés ou familiaux de mélanome**.

Le mélanome est un cancer qui, pris en charge à des stades peu avancés, se soigne relativement bien, mais sa capacité à métastaser rapidement rend le pronostic vital du patient très dépendant d'un diagnostic précoce.

La surveillance régulière de la peau en suivant la règle de l'ABCDE (A : Asymétrie ; B : bords irréguliers ; C : couleur non homogène ; D : diamètre en augmentation ; E : évolution), notamment chez les personnes présentant un ou plusieurs facteurs de risque, reste le meilleur moyen de détecter une lésion suspecte et ainsi de prévenir l'apparition d'un mélanome. La stabilisation, ou du moins la diminution, depuis les années 90 de son incidence dans certaines régions du globe (Etats-Unis, Australie et certains pays européens), notamment chez les adultes jeunes, est peut-être le reflet d'une prise de conscience et donc de l'évolution des comportements face à cette maladie (Erdmann et al., 2013).

2.2. Classification

L'American Joint Committee on Cancer (AJCC) fait actuellement référence en matière de classification des différents types de cancers. L'AJCC classe le mélanome cutané en quatre grands stades, chacun défini et sous-catégorisé selon des caractéristiques concernant la tumeur primaire (T), les ganglions régionaux envahis (N) et les métastases à distance (M)

(Tableau 1). La dernière édition (7^{ème}), en date de 2009, inclut de nouveaux critères par rapport à la version antérieure. Ainsi, en ce qui concerne la classification T, le taux mitotique de la tumeur primaire vient s'ajouter aux deux critères préexistants que sont la taille et l'ulcération de la tumeur primaire (Balch et al., 2009). Le nombre de mitoses est considéré comme le deuxième facteur pronostic indépendant le plus important après la taille de la tumeur primaire (Azzola et al., 2003) et remplace le niveau d'invasion de Clark comme premier facteur déterminant les mélanomes T1b. L'existence de métastases microscopiques ganglionnaires, quant à elle, peut dorénavant être validée par le marquage immunohistochimique de marqueurs associés aux mélanomes tel que Melan-A/MART1 (Balch et al., 2009).

Enfin, il s'avère que les patients atteints de mélanome dont la tumeur primaire est inconnue et qui présentent des métastases localisées soit au niveau des ganglions lymphatiques soit au niveau de la peau ou des tissus sous-cutanés, ont un pronostic plus proche des patients de stade III. Ils sont donc considérés dorénavant plutôt comme de stade III que de stade IV (Balch et al., 2009).

La mise à jour régulière de la classification du mélanome cutané par l'AJCC et la recherche continuelle d'outils pronostics peuvent aider à mieux situer les patients dans l'évolution de la maladie et également faciliter la mise en place de traitements plus personnalisés.

Stade	Critères
IA	- Tumeur inférieure à 1mm, sans ulcération et taux mitotique inférieur à 1/mm ² ; pas de ganglions envahis ; pas de métastases à distance
IB	- Tumeur inférieure à 1mm, avec ulcération ou taux mitotique supérieur ou égal à 1/mm ² ; pas de ganglions envahis ; pas de métastases à distance - Tumeur entre 1,01 et 2mm d'épaisseur, sans ulcération ; pas de ganglions envahis ; pas de métastases à distance
IIA	- Tumeur entre 1,01 et 2mm d'épaisseur, avec ulcération ; pas de ganglions envahis ; pas de métastases à distance - Tumeur entre 2,01 et 4mm d'épaisseur, sans ulcération ; pas de ganglions envahis ; pas de métastases à distance
IIB	- Tumeur entre 2,01 et 4mm d'épaisseur, avec ulcération ; pas de ganglions envahis ; pas de métastases à distance - Tumeur supérieure à 4mm d'épaisseur, sans ulcération ; pas de ganglions envahis ; pas de métastases à distance
IIC	- Tumeur supérieure à 4mm d'épaisseur, avec ulcération ; pas de ganglions envahis ; pas de métastases à distance
IIIA	- Tumeur sans ulcération ; 1 à 3 ganglions régionaux envahis par des métastases microscopiques; pas de métastases à distance
IIIB	- Tumeur avec ulcération ; 1 à 3 ganglions régionaux envahis par des métastases macroscopiques; pas de métastases à distance - Tumeur sans ulcération ; 1 à 3 ganglions régionaux envahis par des métastases macroscopiques ou métastases « en transit »; pas de métastases à distance
IIIC	- Tumeur avec ulcération ; 1 à 3 ganglions régionaux envahis par des métastases macroscopiques ou métastases « en transit »; pas de métastases à distance - Tumeur avec ou sans ulcération ; au moins 4 ganglions régionaux envahis par des métastases ou métastases « en transit » ; pas de métastases à distance
IV	- Tumeur, avec ou sans ulcération ; au moins une métastase à distance

Tableau 1 : Classification des mélanomes selon la 7^{ème} édition de l'AJCC

2.3. Les mutations dans le mélanome

Le mélanome comme d'autres cancers, présente un grand nombre de mutations somatiques dont plusieurs d'entre elles ont lieu au sein d'une même voie biologique (**Figure 10**).

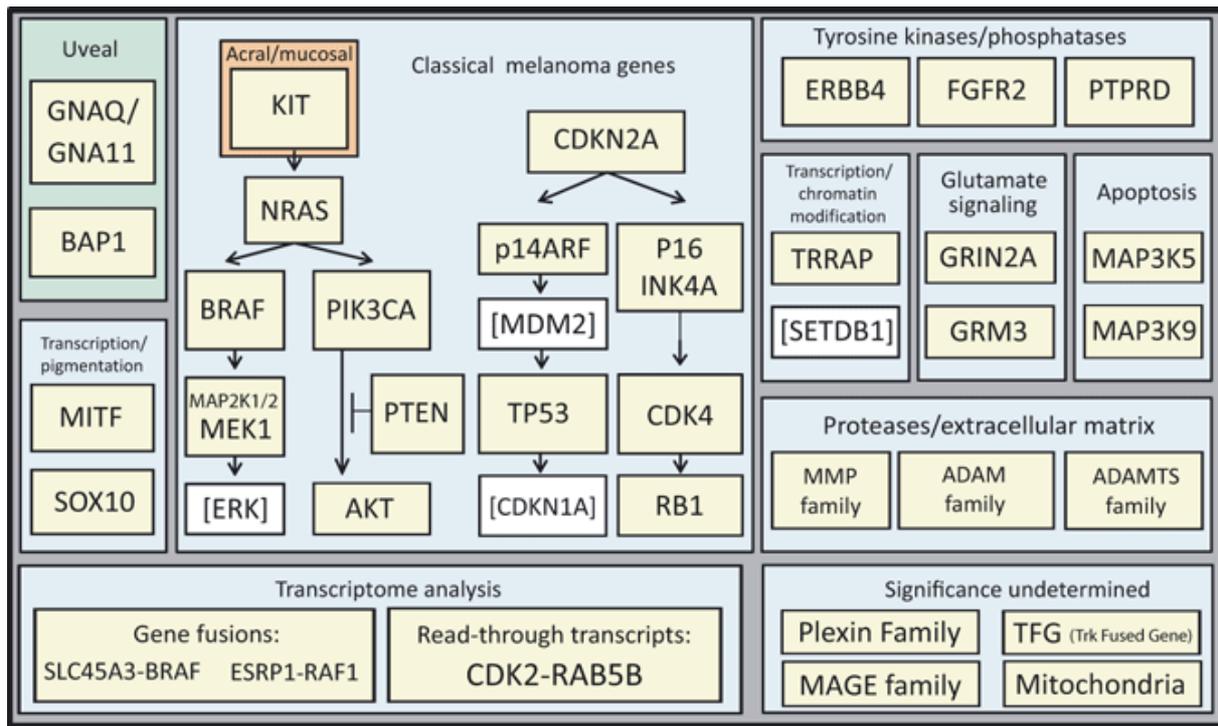


Figure 10 : Schéma récapitulatif des voies de signalisation et des gènes fréquemment mutés dans le mélanome. Les gènes entre parenthèses n'ont pas encore été montrés comme étant mutés dans le mélanome mais contribuent à la mélanomagenèse à travers des mécanismes alternatifs (amplification) (Dutton-Regester and Hayward, 2012).

Il est important d'identifier ces mutations afin de comprendre leur rôle éventuel dans l'altération de certains mécanismes cellulaires ou encore dans l'acquisition de certaines propriétés propres aux cellules cancéreuses telles que la capacité à métastaser, afin de mettre en place des thérapies ciblant les facteurs mutés. L'une des voies les mieux caractérisées dans les mélanomes est la voie de signalisation des MAPK (Mitogen-activating protein kinase) impliquée dans les mécanismes de croissance et de survie cellulaires. Parmi les différents membres de cette voie de signalisation, la kinase BRAF est une des protéines dont le gène est très fréquemment muté. En effet, environ 60% des mélanomes portent une mutation du gène *BRAF* qui est dans, 90% des cas, une substitution de l'acide glutamique en position 600 par une valine (V600E). Ces mutations, conduisant à l'activation constitutive de la voie des MAPK, ont pour conséquence une augmentation de la prolifération cellulaire, de l'angiogenèse, et du pouvoir métastatique (Bradish et al., 2013).

Des essais cliniques utilisant des inhibiteurs (Vemurafenib) de la forme mutée de BRAF V600E chez des patients porteurs de cette mutation ont conduit à une augmentation aussi bien la survie sans rechute que de la survie globale (Sosman et al., 2012). Ainsi,

l'utilisation de ce type de molécules inhibitrice dans le traitement de mélanomes est une option intéressante à considérer.

Néanmoins, le Vemurafenib ne peut être administré qu'aux patients porteurs de la mutation BRAF car il est inefficace, voire délétère chez les patients exprimant la forme sauvage de cette protéine. De plus, même si le Vemurafenib prolonge significativement la survie des patients, les progressions après 6 à 8 mois de traitement sont très fréquentes. Ces résistances sont dues dans la plupart des cas à la réactivation de la voie des MAPK *via* des néo-mutations (des gènes *c-kit* ou *N-ras* ou *MEK*), ou à l'activation d'autres voies de signalisation comme la voie des PI3K (Phosphoinositide 3-kinase). D'autres protéines mutées doivent donc être ciblées pour les patients qui ne portent pas la mutation BRAF^{V600E}, ainsi que pour prévenir les mécanismes de résistance secondaires. Des essais cliniques sont notamment en cours ciblant la protéine MEK, en aval de la protéine BRAF dans la voie des MAPK.

3. Le concept d'immunosurveillance / immunoediting

L'idée d'une surveillance par le système immunitaire a pour la première fois été énoncée par Paul Ehrlich au début du XX^{ème} siècle. Il pensait que le cancer aurait une fréquence plus élevée si les mécanismes de défense de l'organisme n'étaient pas là pour le contrôler. Il faudra attendre les années 50 et la découverte de l'existence d'antigènes de tumeur pour que cette idée soit reprise par M. Burnet et L. Thomas. Ils émettent alors l'hypothèse d'immunosurveillance, qui consiste en l'existence d'une immunité naturelle responsable de la prévention du développement de cancers chez des organismes immunocompétents (Burnet, 1970). Cette hypothèse sera longtemps controversée, notamment par des études qui n'avaient montré aucune différence de l'incidence tumorale entre des souris de type sauvage et des souris nude, aussi bien pour des modèles de tumeurs spontanées que chimio-induites (Stutman, 1974).

Avec l'apparition dans les années 90 des modèles murins génétiquement modifiés, le groupe de Schreiber a initié le regain d'intérêt pour ce concept en mettant en évidence le rôle central de l'IFN- γ dans le contrôle de l'expansion tumorale en favorisant la reconnaissance des cellules néoplasiques par le système immunitaire (Kaplan et al., 1998). Des études similaires ont ensuite été menées concernant la perforine dans un modèle de

lymphome spontané, montrant ainsi que la cytotoxicité médiée par les lymphocytes (NK, NKT et T CD8) était impliquée dans la prévention du développement tumoral (Shankaran et al., 2001; Smyth et al., 2000). De même, des études menées chez des souris déficientes en cellules T ont montré que ces souris étaient plus susceptibles au développement de tumeurs spontanées ou induites chimiquement (Shankaran et al., 2001).

Chez l'homme, plusieurs arguments sont en faveur de l'existence d'une immunosurveillance : (i) l'existence de cas de régressions spontanées chez plusieurs patients atteints de cancers dont le mélanome (Kalialis et al., 2009) ; (ii) la corrélation entre un infiltrat intra-tumoral de lymphocytes T comme facteur de bon pronostic pour la survie des patients porteurs de mélanome (Clemente et al., 1996; van Houdt et al., 2008) ; (iii) la propension des patients immunodéprimés suite à une greffe ou suite à une infection HIV à développer des cancers (Frisch et al., 2001; Penn, 1996).

Par la suite, il a été montré que le système immunitaire ne jouait pas qu'un rôle protecteur vis-à-vis de la progression tumorale mais qu'il participait également à la sélection de cellules tumorales moins immunogènes (Shankaran et al., 2001). Le concept princeps étant incomplet et par conséquent erroné, le terme d'immunosurveillance a alors été abandonné au profit du terme immunoediting ou de la théorie des trois E : Elimination-Equilibre-Echappement (Dunn et al., 2004).

La phase d'élimination correspond à la phase d'immunosurveillance proprement dite au cours de laquelle les systèmes immunitaires inné et adaptatif s'associent pour détruire les cellules malignes avant qu'elles ne deviennent cliniquement détectables. Les cellules de l'immunité innée (NK, NKT, gamma/delta, macrophages) vont détruire les cellules tumorales et ainsi libérer des antigènes de tumeurs. Ces derniers seront internalisés par les cellules dendritiques qui, une fois leur migration achevée dans les ganglions lymphatiques drainants, vont à leur tour activer les lymphocytes T CD4 helper et T CD8 cytotoxiques. Suite à leur activation, ces derniers vont migrer vers le site tumoral et participer à la lyse des cellules cancéreuses.

La phase d'équilibre survient lorsque certaines cellules tumorales survivent à la phase d'élimination. Le système immunitaire exerce sur les cellules tumorales une pression suffisante pour bloquer l'évolution tumorale sans néanmoins détruire les cellules malignes résiduelles. Cette phase est considérée comme la plus longue et peut durer chez certains

individus plusieurs années voire toute la vie (Aguirre-Ghiso, 2007). Les interactions perpétuelles entre le système immunitaire et les cellules tumorales amènent ces dernières à générer petit à petit des variants tumoraux de moins en moins immunogènes qui finissent par échapper au système immunitaire.

La dernière phase appelée **échappement** correspond au stade où les cellules tumorales ont produit des variants tumoraux qui échappent totalement au système immunitaire et qui se mettent à proliférer. L'échappement tumoral peut utiliser différents mécanismes tels qu'une diminution de la reconnaissance immunitaire (par perte d'antigènes ou diminution de l'expression des molécules du CMH de classe I), ou une augmentation de la résistance à la lyse (mécanismes anti-apoptotiques). Dans tous les cas, la tumeur devient « invisible » aux yeux du système immunitaire et peut ainsi se développer librement. De ce fait, elle devient détectable cliniquement (**figure 11**).

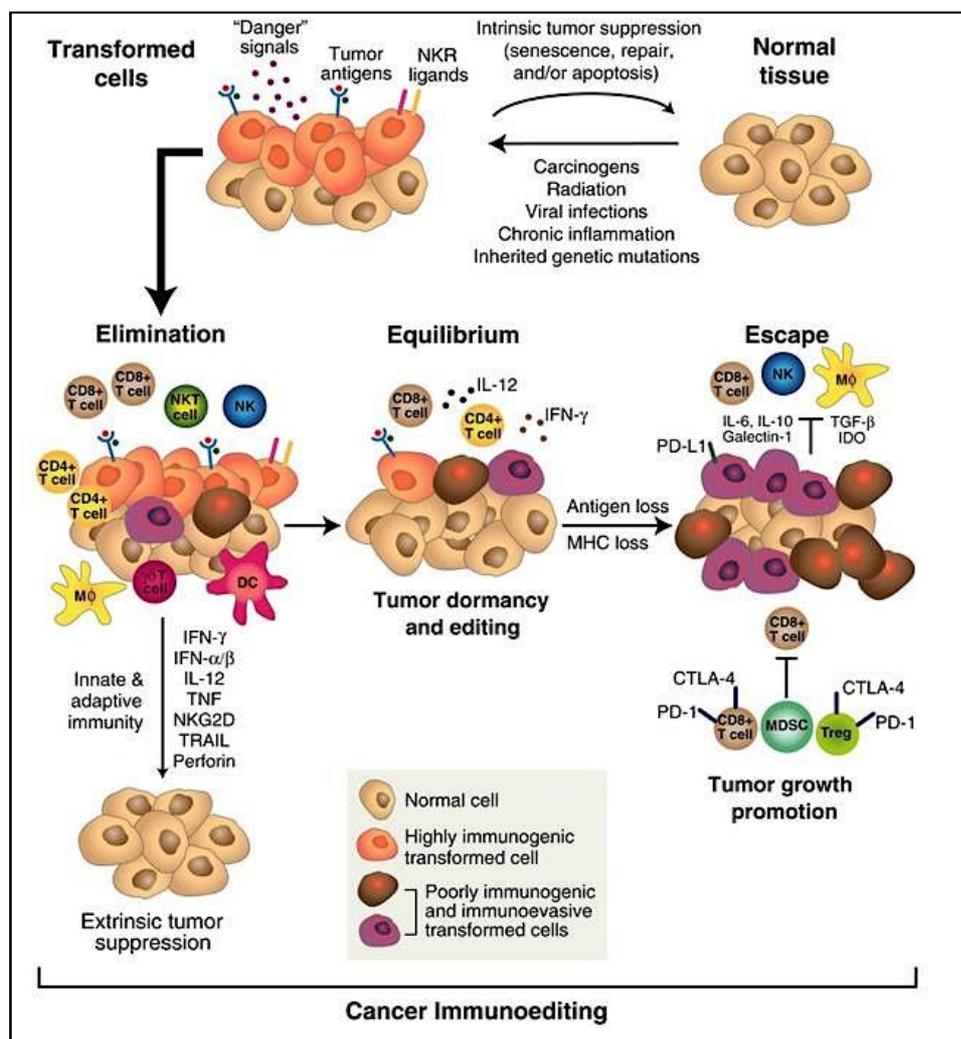


Figure 11 : Concept de l'immunoediting (Schreiber et al., 2011)

4. La Classification des antigènes de tumeur

A partir des années 90, avec l'apparition de nouvelles méthodes comme le criblage de banques d'expression issues de cellules tumorales à l'aide d'anticorps ou de lymphocytes T CD8 cytotoxiques dérivés de patients, de nombreux antigènes de tumeurs ont été identifiés. Cette abondance d'antigènes a amené les chercheurs à les classer selon leur profil d'expression en quatre catégories différentes.

4.1. Les antigènes « cancer germline »/« cancer testis »

Dans les années 90, T. Boon et ses collègues ont été les premiers à cloner un antigène, MAGE-A1, responsable d'une réponse lymphocytaire T cytotoxique spontanée chez un patient porteur de mélanome (van der Bruggen et al., 1991). En utilisant la même stratégie, ils ont ensuite identifié MAGE-A3, appartenant à la famille des gènes MAGE-A (Gaugler et al., 1994), mais également deux autres familles d'antigènes, la famille BAGE (B Melanoma Antigen) (Boel et al., 1995) et la famille GAGE (G Melanoma Antigen) (Van den Eynde et al., 1995). Par la suite, de nombreuses nouvelles familles de gènes de même type furent découvertes telles que NY-ESO-1 (New York Eosopagal Squamous cell carcinoma) (Chen et al., 1997) et SSX (Synovial Sarcoma X chromosome breakpoint) (Tureci et al., 1996).

Les antigènes « cancer-germline » sont exprimés, en ce qui concerne les tissus sains, exclusivement dans les cellules germinales mâles et, pour une partie d'entre eux, dont certains membres de la famille XAGE (X Melanoma Antigen) (Zendman et al., 2002) et MAGE (De Plaen et al., 1994), dans le placenta. Une expression aberrante de ces gènes est retrouvée dans bon nombre de cancers, avec des taux de transcription variables d'un type de cancer à l'autre. Parmi eux, les cancers de l'ovaire, du poumon et les mélanomes sont connus comme ayant les plus hautes fréquences d'expression de ces gènes. Néanmoins, pour un cancer donné, il existe une corrélation entre l'évolution de la maladie et l'augmentation du taux d'expression de ces antigènes, comme cela a été montré pour NY-ESO-1 dans le cancer de la vessie (Kurashige et al., 2001) ou dans le mélanome avec l'antigène MAGE-A1 (Brasseur et al., 1995). Actuellement, environ 110 gènes ou familles de gènes sont identifiés comme appartenant aux antigènes « cancer-germline » (<http://www.cta.lncc.br/>).

Ces gènes ou familles de gènes sont majoritairement localisés sur le chromosome X. Le regroupement particulier de ces gènes a abouti à une classification des gènes « cancer-testis » en deux groupes, les gènes CT-X (gènes situés sur le chromosome X) et les gènes CT non-X (gènes situés sur un autre chromosome que le chromosome X) (Simpson et al., 2005).

La transcription de bon nombre des gènes « cancer-germline » semble être régulée par des mécanismes épigénétiques. En effet, les régions promotrices de ces gènes contiennent de nombreux îlots CpG qui, dans les cellules tumorales et les cellules germinales masculines exprimant ces gènes, s'avèrent être hypométhylés tandis que, dans les autres types de tissus sains, ils sont hyperméthylés (De Smet et al., 1999; Sigalotti et al., 2004).

Bien que la fonction biologique de ces antigènes ne soit pas clairement établie, il semblerait que certains d'entre eux soient impliqués dans la tumorigénèse. C'est le cas de la famille MAGE qui protègerait les cellules du programme de mort cellulaire et contribuerait au développement de tumeurs malignes en favorisant la survie cellulaire (Yang et al., 2007). La surexpression des antigènes GAGE semble, quant à elle, conférer une chimiorésistance aux cellules tumorales, en altérant les taux intracellulaires des acteurs clés du programme de mort cellulaire induit par l'IFN- γ (Kular et al., 2009), et serait donc un facteur de mauvais pronostic (Duan et al., 2003).

De par leur expression partagée par de nombreux types de cancers, ces antigènes sont des cibles attractives pour une utilisation en immunothérapie anti-tumorale. De plus, leur expression dans les tissus sains étant restreinte aux cellules germinales mâles, qui n'expriment pas de molécules HLA (Human Leucocyte Antigen) à leur surface membranaire et qui sont séparées de l'organisme par la barrière hémato-testiculaire, aucune réaction auto-immune n'est attendue en ciblant ces antigènes.

4.2. Les antigènes surexprimés

Les antigènes surexprimés sont des protéines qui sont exprimées de façon ubiquitaire dans les cellules saines. Cependant, le taux endogène de ces protéines est trop faible pour entraîner une activation du système immunitaire. En revanche, dans un contexte tumoral, ces antigènes peuvent être surexprimés, notamment suite à des modifications épigénétiques. La quantité de peptides issus de ces protéines atteint alors un seuil qui

permet une présentation de complexes HLA/peptide à la surface des cellules tumorales suffisante pour activer le système immunitaire.

Parmi ces antigènes, l'antigène HER-2/neu (Human Epidermal growth factor Receptor 2) est un des plus étudié. Cette protéine est surexprimée dans 25 à 30% des cancers du sein invasifs où une corrélation entre sa surexpression et un mauvais pronostic a été établie (Slamon et al., 1987). Il est retrouvé également dans les cancers colorectaux, les cancers de l'ovaire, les cancers du pancréas et les cancers de la prostate.

hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase), quant à lui, est un antigène dont la surexpression est retrouvée dans plus de 85% des cancers, tandis que son expression est très faiblement détectable dans les tissus sains (Shay and Bacchetti, 1997). La surexpression de la télomérase dans les cellules tumorales permet le maintien de la longueur des télomères et ce malgré le nombre de divisions cellulaires, ce qui contribue à rendre les cellules tumorales immortelles.

Les antigènes correspondant à cette classe sont tous des antigènes du soi. Il existe donc une tolérance du système immunitaire vis-à-vis de ces protéines afin d'éviter tout risque d'auto-immunité. L'élimination des lymphocytes T de haute affinité spécifiques de ces antigènes lors de la sélection thymique risque d'empêcher la mise en place d'une réponse immunitaire lors d'essais de vaccination thérapeutique. Néanmoins, certains d'entre eux, à l'image de hTERT, sont capables d'induire une réponse lymphocytaire T témoignant ainsi de leur immunogénicité (Zanetti et al., 2005), ce qui ouvre dès lors une fenêtre thérapeutique à exploiter. Cependant, le ciblage de ce type d'antigène peut s'avérer risqué dans la mesure où il existe une expression résiduelle dans de nombreux tissus sains. Il convient donc de manier les différentes stratégies d'immunothérapie ciblant les antigènes surexprimés avec prudence.

4.3. Les antigènes de différenciation tissulaire

Les antigènes de différenciation tissulaire ont pour particularité d'être exprimés exclusivement par un type tissulaire donné, aussi bien dans leur composante normale que leurs composantes tumorales.

Parmi eux, on retrouve l'antigène spécifique de la prostate, autrement appelé PSA (Prostate Specific Antigen). Cet antigène est sécrété par les cellules épithéliales prostatiques et son taux sérique est largement augmenté chez des patients porteurs d'un cancer de la prostate (Kuriyama et al., 1980). Actuellement, son dosage est utilisé pour le diagnostic, mais également pour suivre la présence ou non d'une récurrence de la maladie après traitement (Pound et al., 1999).

Plusieurs antigènes appartenant à cette catégorie ont été décrits dans le mélanome, on parle alors d'antigènes de différenciation mélanocytaire. Plusieurs épitopes dérivés de ces protéines, telles que MLANA/Melan-A/MART-1 (Coulie et al., 1994), Tyrosinase (Brichard et al., 1993) et GP100 (Bakker et al., 1994), ont été identifiés comme étant la cible de lymphocytes T CD8 cytotoxiques.

De par leur expression dans le tissu pigmentaire, on peut s'attendre à des réactions auto-immunes lors d'immunothérapies ciblant ces antigènes, ou même en l'absence de traitement. Ainsi, des vitiligos ont été décrits chez des patients porteurs de mélanome dont des régressions spontanées ont été signalées (Arpaia et al., 2006), mais également chez des patients traités par transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques de ce type d'antigènes (Verdegaal et al., 2011). Des effets secondaires plus graves ont été également reportés comme des réactions auto-immunes ophtalmiques après transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques de l'antigène MLANA (Yeh et al., 2009), car une expression de ce gène est également détectée dans les cellules de la rétine (Heegaard et al., 2000). Néanmoins, le rapport bénéfice/risque pour le patient reste favorable à l'utilisation de ces antigènes en immunothérapie.

4.4. Les antigènes mutés - Les antigènes d'expression aberrante

Le développement tumoral est caractérisé par une suite de modifications génomiques isolées qui aboutit à une véritable instabilité génétique. L'activation de certains gènes peut se faire par différents mécanismes comme des mutations ponctuelles, des translocations, des délétions, des duplications, des amplifications et des modifications épigénétiques et peut donner naissance à des protéines particulièrement immunogènes.

Une mutation, même ponctuelle, peut entraîner la modification de la séquence d'acides aminés d'une protéine. La protéine mutée peut alors être à l'origine d'une réponse immunitaire T, soit par l'apparition d'un nouvel agrétope (modification des acides aminés d'ancrage au CMH, apparition d'un site de clivage du protéasome), soit par la modification de la séquence d'acides aminés d'un épitope préexistant reconnu par le lymphocyte T (nouvel épitope). Ainsi, de nombreuses mutations modifiant la séquence peptidique des épitopes T sont à l'origine de protéines beaucoup plus immunogènes que la protéine non mutée comme c'est le cas de la protéine CDK4 (Cyclin Dependent Kinase) (Wolfel et al., 1995) ou de la protéine suppressive de tumeur P53 (Vierboom et al., 1997).

Suite à une mutation dans leur gène, certains antigènes mutés acquièrent une fonction pro-oncogénique. Il en va ainsi pour les acteurs de la cascade de signalisation RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK, qui promeuvent la prolifération cellulaire, la survie, la différenciation, la mobilité et le métabolisme. La mutation d'un ou de plusieurs de ces gènes conduit à l'activation constitutive de cette voie dans les cellules tumorales. Particulièrement touché, le mélanome montre des mutations fréquentes du gène *B-RAF* dans 50 à 60% des cas (Davies et al., 2002), ou encore du gène N-Ras (Goydos et al., 2005).

Enfin, certains antigènes dits d'expression aberrante sont exprimés *de novo* suite à des modifications de nature génétiques telles que la transcription de régions introniques de certains gènes comme *MUM-1* ou *NA17-A* (Coulie et al., 1995; Guilloux et al., 1996), la transcription du brin reverse, comme pour le gène *RU2AS* (Van Den Eynde et al., 1999), la transcription d'un pseudo-gène comme *NA88-A* (Moreau-Aubry et al., 2000), ou encore des modifications épigénétiques qui seront détaillées dans la section [5.2]. Enfin, il existe des modifications traductionnelles responsables de l'apparition de certains antigènes comme la traduction d'un ORF alternatif dans le cas de l'antigène GP75 (Wang et al., 1996b), mais également des modifications post-traductionnelles comme l'épissage peptidique, qui consiste en l'excision post-traductionnelle d'un segment polypeptidique d'une protéine, suivie de la ligature de la nouvelle extrémité carboxy-terminale avec l'extrémité amino-terminale, comme c'est le cas de la protéine FGF-5 (Fibroblast Growth Factor) dans le cancer du rein (Hanada et al., 2004).

Sur le plan des immunothérapies anti-cancéreuses, ces antigènes semblent être des cibles idéales car l'expression de ces antigènes étant restreinte aux tissus cancéreux, le risque de réactions auto-immunes est quasi inexistant.

5. La régulation de la transcription des antigènes de mélanome

La régulation de la transcription des gènes de tumeurs peut dépendre aussi bien de facteurs de transcription tissu-spécifiques que de mécanismes épigénétiques (modifications d'histones et méthylation de l'ADN).

5.1. La régulation par les facteurs de transcription tissu-spécifiques

Certaines protéines impliquées dans la mélanogénèse des mélanocytes s'avèrent être des protéines immunogènes reconnues par des TIL (Tumor Infiltrating Lymphocytes) de patients porteurs de mélanome. Elles font donc partie de la classe des antigènes de différenciation tissulaire décrite dans la section [4.3]. Parmi elles, on retrouve les enzymes pigmentaires Tyrosinase (Kang et al., 1995), Tyrosinase related protein-1 (Tyrp1) (Wang et al., 1995) et dopachrome tautomérase (DCT/Tyrp2) (Wang et al., 1996a), mais également certaines protéines impliquées dans l'architecture du mélanosome, organe cellulaire spécifique du mélanocyte spécialisé dans le transport de la mélanine, comme la protéine GP100/SILV/PMEL17 (Bakker et al., 1994) et la protéine MLANA (Coulie et al., 1994). Ces protéines spécifiques de la lignée mélanocytaire sont produites aussi bien aux premiers stades de l'embryogénèse que chez l'adulte et leur expression est régulée par des facteurs de transcription eux-mêmes tissu-spécifiques.

5.1.1. Les facteurs de transcription tissu-spécifiques et la différenciation mélanocytaire

Le facteur de transcription MITF (Microphthalmia-Associated Transcription Factor) est une protéine qui fait partie de la super-famille des b-HLH-LZ (basic-helix-loop-helix-leucine zipper) et qui est exprimée majoritairement dans les mélanocytes dérivés de la crête neurale et du cerveau (**Figure 12**).

Il a été décrit dix isoformes de MITF dont la région C-terminale, conservée entre les isoformes, reconnaît le site de fixation à l'ADN ayant pour séquence consensus « CANNTG » et qui est appelé E-box. L'isoforme spécifique du lignage mélanocytaire, M-MITF, reconnaît la séquence consensus M-box « CA(T/C)GTG » (Lowings et al., 1992; Yasumoto et al., 1995), mais la fixation du facteur sur ce site est largement potentialisée par la présence de résidus thymidine flanquant le côté 5' de ce motif (Aksan and Goding, 1998).

MITF entre en jeu très tôt dans le développement embryonnaire et est indispensable au développement de la lignée mélanocytaire (Opdecamp et al., 1997). Ainsi, ce facteur de transcription est considéré à l'heure actuelle comme le régulateur clé du développement mélanocytaire, activant toute la cascade de la mélanogénèse.

En effet, il a été démontré aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* que MITF régule la transcription des enzymes pigmentaires Tyrosinase (Bentley et al., 1994; Galibert et al., 2001; Yasumoto et al., 1994), Tyrp1 (Bertolotto et al., 1998; de la Serna et al., 2006; Yasumoto et al., 1997) et DCT (Bertolotto et al., 1998; Lang et al., 2005) en se fixant sur les M-box présentes dans les régions promotrices de ces gènes.

MITF est également responsable de la régulation des protéines structurales nécessaires à la formation du mélanosome GP100 et MLANA (Du et al., 2003). Enfin, MITF active la transcription du gène OA1 (Ocular Albinism 1), glycoprotéine de la membrane des mélanosomes, capable de générer une réponse T spécifique chez des patients porteurs de mélanome (Touloukian et al., 2003) et dont la forme mutée est impliquée dans l'albinisme oculaire. Sa transcription est activée suite à la fixation du facteur MITF sur la M-box « CATGTG » présente sur le brin anti-parallèle de son promoteur (Vetrini et al., 2004). Ainsi, la régulation de ces protéines montre qu'outre son rôle primordial dans la synthèse de la mélanine, MITF est aussi un régulateur de la biogénèse des mélanosomes.

Enfin, l'antigène Absent In Melanoma-1 (Aim-1), capable de générer une réponse T spécifique chez des patients porteurs de mélanome (Harada et al., 2001), est prédit comme ayant une fonction dans la mélanogénèse puisqu'il est situé dans la membrane des mélanosomes. De plus, la mutation de son gène entraîne une forme d'albinisme (Newton et al., 2001). Ce gène possède également une M-box dans sa séquence promotrice, bien qu'aucune preuve directe n'ait été à ce jour fournie pour démontrer que MITF régule directement ce gène (Du and Fisher, 2002).

Bien que l'expression des antigènes de différenciation mélanocytaire soit régulée positivement par le facteur de transcription MITF, ce dernier n'est pas l'unique facteur tissu-spécifique à être indispensable à l'activation de leur transcription. Ainsi, des expériences de transfection de cellules de mélanome murin B16 avec des adénovirus codant la protéine MITF-sauvage ou MITF-dominant négatif menées par R. Balotti et ses collègues ont montré que le facteur MITF était nécessaire mais non suffisant pour conduire à l'activation de la transcription des gènes *tyrosinase* et *tyrp1* endogènes (Gaggioli et al., 2003).

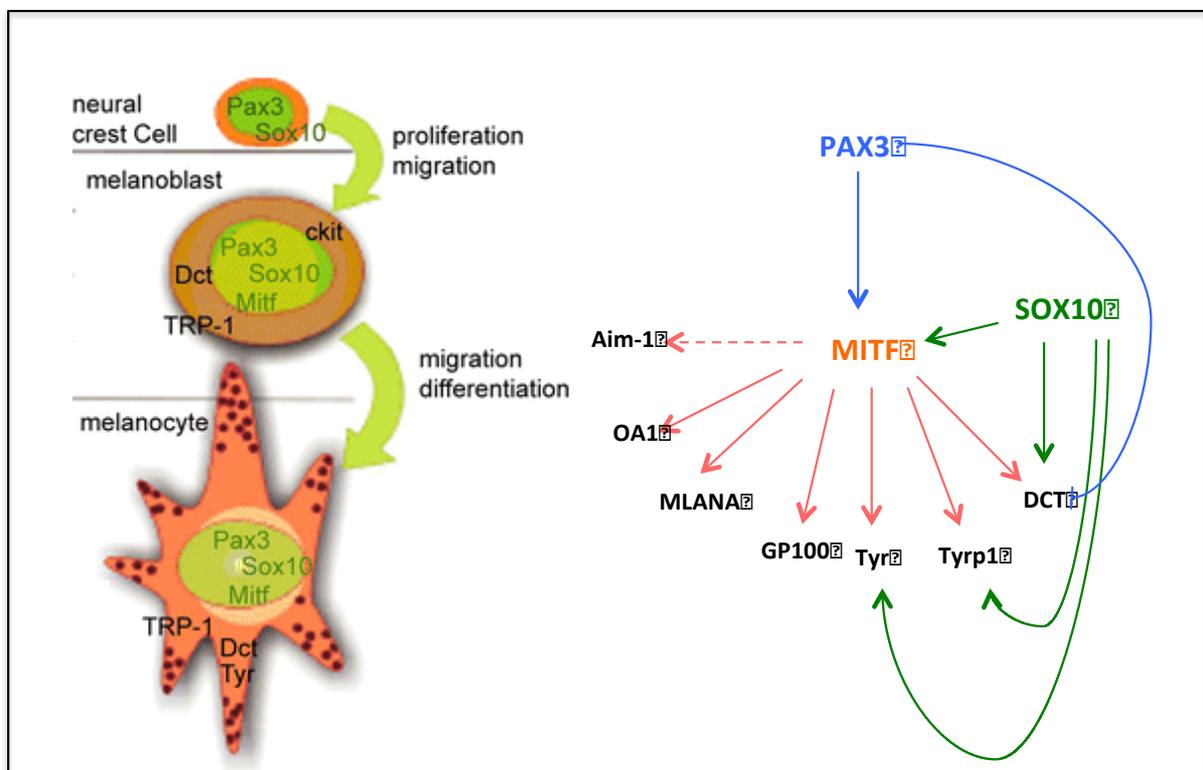


Figure 12 : Les facteurs de transcription tissu-spécifiques impliqués dans la différenciation mélanocytaire durant le développement embryonnaire adaptée de (Medic and Ziman, 2009)

En effet, d'autres facteurs de transcription tissu-spécifiques semblent impliqués dans l'activation de ces gènes comme **le facteur SOX10**. Ainsi, il a été montré, par des expériences de gène-rapporteur, que la protéine SOX10 était capable de fixer et d'activer les promoteurs des gènes *tyrosinase*, *tyrp1* et *dct* (Murisier et al., 2006, 2007; Potterf et al., 2001). En ce qui

concerne le gène *dct*, plusieurs études *in vitro* montrent que SOX10, par sa fixation au niveau du promoteur proximal, co-régule la transcription de ce gène avec le facteur MITF (Jiao et al., 2004; Ludwig et al., 2004). Les gènes *tyrosinase* et *tyrp1*, quant à eux, peuvent être activés notamment par la fixation de SOX10 sur des séquences « enhancers » distales situées à environ 15kb du site d'initiation de la transcription (Murisier et al., 2006, 2007).

Chez les mammifères, la famille des protéines SOX comprend vingt membres répartis en neuf groupes : A, B1, B2, C-H (Schepers et al., 2002). Le facteur de transcription SOX10, appartenant au groupe E, joue un rôle crucial dans la migration et la survie de toutes les cellules dérivées de la crête neurale, y compris les mélanocytes (**Figure 12**).

Ces protéines, appelées « Sry-related HMG box », possèdent toutes un domaine HMG (High Mobility Group) qui leur permet de se fixer à l'ADN sur une séquence consensus 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3'. Dans certains cas, deux protéines SOX peuvent se lier à deux sites de fixation adjacents et ainsi coopérer entre elles pour activer le gène ciblé (Peirano et al., 2000). Si cette configuration particulière n'est pas systématique, on retrouve néanmoins souvent, dans les régions promotrices ciblées par ces facteurs, la présence de plusieurs sites de fixation putatifs pour les protéines SOX. Après fixation, les facteurs de transcription SOX peuvent interagir directement ou par le biais de co-activateurs avec la machinerie transcriptionnelle afin d'activer la transcription d'un gène.

En plus de son action synergique avec le facteur MITF pour la transcription du gène de différenciation mélanocytaire *dct*, il semblerait que SOX10 régule également la transcription du gène *mitf* lui-même dans de nombreuses espèces (Bondurand et al., 2000) (Lang and Epstein, 2003; Lee et al., 2000; Potterf et al., 2001). Chez la souris, il existe au moins deux sites de fixation pour le facteur SOX10 dans le promoteur du gène *mitf* capables de fixer la protéine SOX10, tandis qu'ils sont au nombre de quatre chez le poisson zèbre (Jiao et al., 2004; Lee et al., 2000). La démonstration de l'activation du gène *mitf* par SOX10 a été initialement faite chez des souris portant une mutation du gène *SOX10* aboutissant à la production d'une protéine SOX10 agissant comme un dominant négatif, ce qui conduisait à une diminution importante de la transcription du gène *mitf* (Lee et al., 2000). En agissant à différents niveaux, SOX10 apparaît donc comme un régulateur complexe de la mélanogénèse.

Un niveau de complexité supérieur dans cette régulation a été atteint avec la mise en évidence de l'implication du facteur de transcription PAX3 dans l'activation du gène *mitf* et dans la régulation de son activité.

PAX3 fait partie de la famille des facteurs de transcription hautement conservés, PAired-boX (PAX), qui comprend neuf membres. Ce facteur possède deux domaines de fixation à l'ADN, appelés « Paired-domain » et « Homeo-domain », qui peuvent être utilisés seuls ou combinés pour fixer des gènes cibles conduisant ainsi à la régulation d'un grand nombre de gènes (Corry and Underhill, 2005). PAX3 est exprimé très tôt durant le développement embryonnaire des cellules de la crête neurale, participant ainsi à la formation de certains tissus qui en dérivent comme les tissus nerveux, les os du crâne et du visage mais aussi les mélanocytes. Plus précisément, PAX3 joue un rôle dans la spécialisation des mélanoblastes et dans leur maintien dans un état indifférencié, mais également dans leur prolifération et dans leur migration vers la peau où ils se différencient en mélanocytes (Lang et al., 2007; Robson et al., 2006).

Le gène *PAX3* a été particulièrement étudié dans le cadre du syndrome de Waardenburg, qui provoque notamment une surdité et des perturbations de la pigmentation. Plusieurs mutations du gène *PAX3* ont été mises en évidence chez des patients porteurs de ce syndrome, conduisant à une absence de mélanocytes dans certaines zones de la peau, des cheveux et de l'oreille interne. De plus, des mutations dans les gènes *mitf* et *SOX10* ont également été rapportées dans certains sous-types de ce syndrome (Pingault et al., 2010).

A l'inverse de MITF et SOX10, aucune séquence consensus n'a formellement été décrite pour la fixation de PAX3, bien que certains motifs communs aient été retrouvés dans plusieurs gènes. Le motif retenu dans certaines bases de données (5'-CGTCACG(C/G)CTT-3') a été décrit et validé à partir des sites de fixation présents dans le promoteur humain du gène *c-Met* décrit par Epstein et coll (Epstein et al., 1996), cependant d'autres séquences permettant la fixation de PAX3 ont été décrites, comme par exemple au niveau du promoteur du gène *mitf* (Watanabe et al., 1998).

En effet, il a été montré que PAX3 régule l'expression du gène *mitf* en se fixant sur une séquence située entre la position -244 et -260 du promoteur proximal (Watanabe et al.,

1998). Par la suite, l'équipe de M. Goossens a décrit un deuxième site de fixation pour PAX3 dans les cellules cancéreuses épithéliales du col utérin HeLa, situé entre les positions -26 et -40 et à proximité du site de fixation SOX10 (Bondurand et al., 2000). Toujours dans ce modèle cellulaire, il semblerait que les deux protéines SOX10 et PAX3 aient une action synergique sur l'activation du gène *mitf*, qui pourrait s'expliquer par la proximité des deux sites de fixation. Néanmoins, ayant une origine embryonnaire différente de celle des mélanocytes, les cellules HeLa ne représentent pas un modèle pertinent dans le cadre de la différenciation mélanocytaire. D'ailleurs, dans des cellules de mélanome, cette coopération entre SOX10 et PAX3 n'a pas été confirmée (Lee et al., 2000; Verastegui et al., 2000) et reste donc encore débattue.

D'une façon générale, en activant la transcription du gène *mitf*, PAX3 contribue à diriger les cellules vers la différenciation mélanocytaire. Cependant, simultanément, il entre en compétition avec le facteur MITF lui-même pour occuper le promoteur d'un gène cible du facteur MITF dans les précurseurs des mélanocytes, le gène *dct*. En effet, en formant un complexe avec le co-répresseur Groucho et la protéine LEF, capable de se fixer sur le promoteur du gène *dct*, PAX3 inhibe la transcription de ce dernier (Yasumoto et al., 2002). Cependant, en présence de β -caténine nucléaire, PAX3 et Groucho se dissocient du complexe et de l'ADN, laissant ainsi la possibilité à MITF de se fixer et d'activer la transcription du gène *dct*. Ainsi, PAX3 pourrait participer à la différenciation des mélanocytes à partir des cellules de la crête neurale tout en inhibant, sous certaines conditions, leur différenciation terminale (Lang et al., 2005) (**Figure 13**).

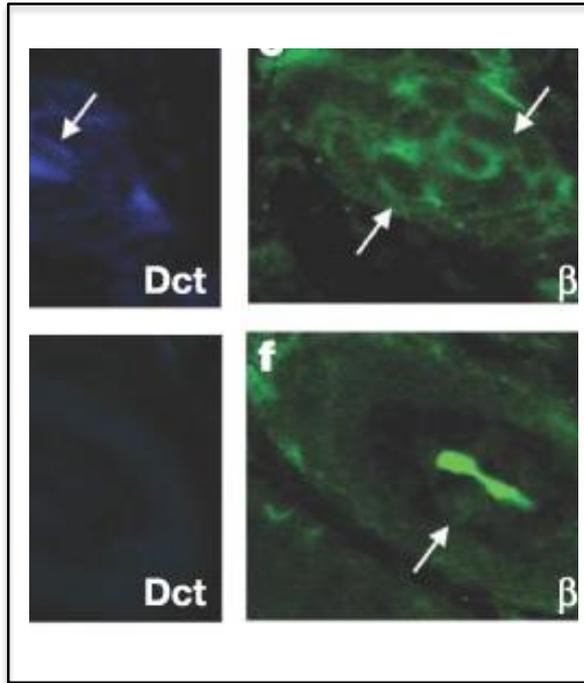


Figure 13 : Implication du facteur de transcription PAX3 dans la régulation de l'expression du gène *dct* (Lang et al., 2005)

Enfin, PAX3 peut également fixer et activer le gène de différenciation mélanocytaire *tyrp1* (Galibert et al., 1999).

A l'instar de SOX10, PAX3 peut donc réguler les gènes de la différenciation mélanocytaire à la fois directement en régulant la transcription des gènes *tyrp1* et *dct*, mais également indirectement *via* la régulation du gène *mitf* (Corry and Underhill, 2005).

5.1.2. Les facteurs de transcription tissu-spécifiques et les mélanocytes adultes

Chez l'adulte, les mélanocytes continuent à exprimer les gènes responsables de la mélanogénèse afin de produire de la mélanine, pigment responsable de la couleur de la peau mais également de sa protection contre les agressions extérieures. Suite à une irradiation par les rayons ultra-violet (UV), les kératinocytes, cellules voisines des mélanocytes dans l'épiderme, produisent une hormone, l' α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH). Cette hormone va se fixer sur le récepteur à protéines G MC1R (Melanocortin 1 Receptor) présent à la membrane des mélanocytes de la peau, et ainsi

activer la voie de signalisation Adénylate Cyclase/AMPc/PKA (Protéine Kinase A). La PKA va alors phosphoryler le facteur de transcription CREB (AMPc Response Element binding protein) qui va pouvoir se fixer sur le promoteur du gène *mitf* et ainsi en activer la transcription (**figure 14**). Le facteur MITF va alors pouvoir, comme durant l'embryogénèse, activer l'expression des gènes de la pigmentation cellulaire et de la formation des mélanosomes (Levy et al., 2006). L'implication du facteur de transcription ubiquitaire CREB dans la régulation de l'expression du gène *mitf* (Bertolotto et al., 1998; Huber et al., 2003) met l'accent sur le fait que la régulation de la transcription des antigènes de différenciation mélanocytaire ne relève pas exclusivement d'une régulation par des facteurs tissu-spécifiques.

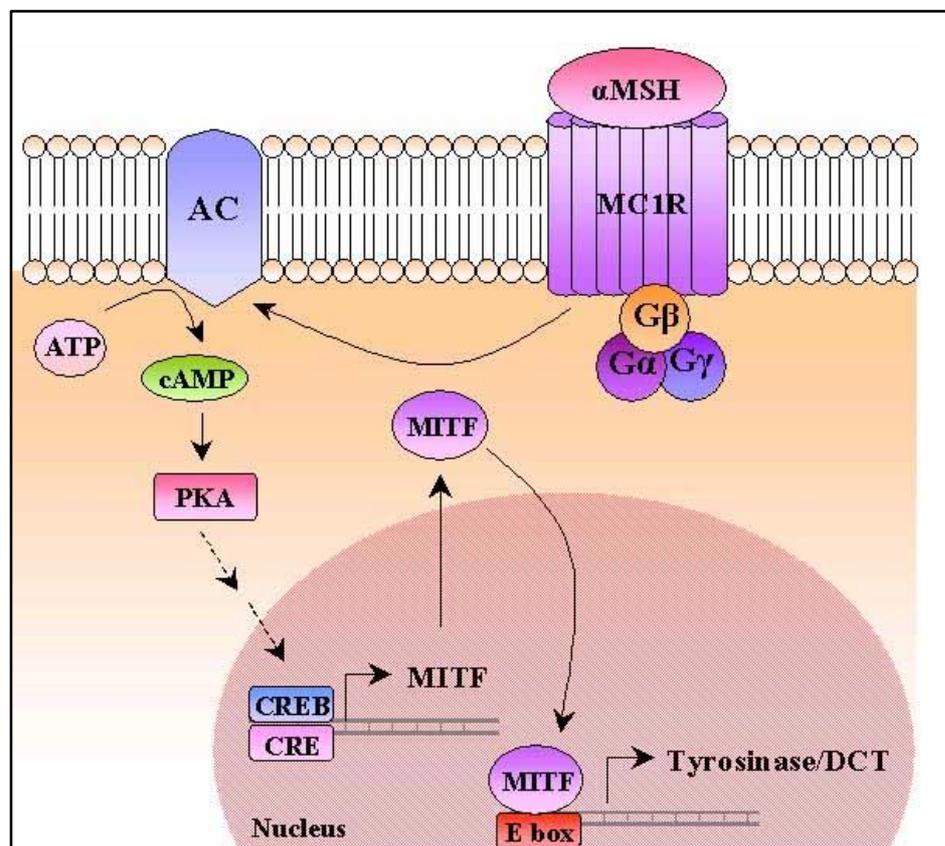


Figure 14 : Voie de signalisation de l'α-MSH induisant la transcription des gènes *MITF*, *Tyr* et *Dct* dans les mélanocytes adultes (Kabbarah and Chin, 2006)

De la même façon, suite à un stress causé par les UV, le facteur de transcription ubiquitaire USF-1 (Upstream Stimulatory Factor-1), autre membre de la super-famille des facteurs b-HLH-LZ, peut être phosphorylé par la protéine kinase P38 et par conséquent peut

également se fixer sur la E-box du gène *tyrosinase* et ainsi activer sa transcription (Corre et al., 2004; Galibert et al., 2001).

La stimulation des mélanocytes par les UV-B entraîne également l'augmentation du facteur de transcription **SOX9** appartenant au même groupe que le facteur SOX10. Cette surexpression semble passer aussi par la voie de l'adénylate-cyclase/AMPC/PKA (Passeron et al., 2007), suggérant que le gène *SOX9* lui-même est régulé, au moins en partie, par le facteur CREB, comme c'est le cas dans les chondrocytes (Piera-Velazquez et al., 2007). De plus, SOX9 semble également participer à la régulation de la pigmentation en se fixant dans les mélanocytes sur les promoteurs de *mitf*, *dct* et *tyrosinase* (Passeron et al., 2007).

Ainsi, le rôle de la protéine SOX9 dans la peau adulte semblerait être identique à celui de SOX10 durant l'embryogénèse. En effet, durant la différenciation des mélanoblastes en mélanocytes *in vitro*, l'expression du facteur SOX10 diminue *a contrario* de celle de SOX9 qui augmente (Cook et al., 2005). De plus, la production de SOX9 par les mélanocytes *in vivo* a longtemps été seulement suggérée par la présence d'anticorps dirigés contre cette protéine dans le sérum de patients atteints de vitiligo (Hedstrand et al., 2001) et ce n'est que récemment que l'expression de SOX9 dans les mélanocytes a été formellement démontrée par immuno-histochimie (Passeron et al., 2007).

Enfin, l'expression du facteur de transcription PAX3 dans les mélanocytes humains adultes n'a été rapportée que récemment (Cook et al., 2005; Gershon et al., 2005; Medic et al., 2011) et, par conséquent, son implication dans l'expression des gènes de la mélanogénèse dans les mélanocytes adultes reste peu documentée.

5.1.3. Les facteurs de transcription tissu-spécifiques et le mélanome

Sachant que les cellules de mélanomes expriment des gènes de différenciation mélanocytaires, il n'est pas surprenant que les facteurs de transcription tissu-spécifiques soient exprimés durant les différents stades de progression du mélanome.

Exprimé dans la plupart des mélanomes (King et al., 1999), le facteur de transcription MITF est considéré comme oncogénique dans les mélanomes humains depuis que Garraway et *coll* ont montré des altérations chromosomiques au niveau du locus du gène *mitf* dans des

cellules de mélanomes. En effet, le gène *mitf* est amplifié par duplication dans 10 à 20% des cas, avec une plus forte incidence parmi les mélanomes métastatiques (Garraway et al., 2005). En ce qui concerne les protéines SOX, SOX9 comme SOX10, sont retrouvées surexprimées dans les mélanomes (Passeron et al., 2009; Ronnstrand and Phung, 2013; Shakhova et al., 2012). De plus, une corrélation entre l'évolution du mélanome et l'augmentation du taux protéique de SOX10 a été mise en évidence (Bakos et al., 2010; Passeron et al., 2009; Ronnstrand and Phung, 2013). Enfin, PAX3 est exprimé aussi bien dans les tumeurs primaires que dans les lignées cellulaires de mélanome (Plummer et al., 2008; Scholl et al., 2001).

Bien que l'expression de certaines protéines telles que GP100 et MLANA soit corrélée avec celle de MITF dans des cellules de mélanome en culture (Du et al., 2003), et bien que les facteurs de transcription régulant leur expression soient exprimés, voire surexprimés, dans la plupart des mélanomes, ces antigènes de différenciation mélanocytaire présentent néanmoins une très forte hétérogénéité dans leur expression protéique *in vivo* (de Vries et al., 1997; Reinke et al., 2005). Ceci suggère l'implication d'autres mécanismes de régulation liés au statut tumoral des cellules.

TYRP1, quant à lui, est largement exprimé dans la plupart des mélanocytes et des mélanomes. De plus, son expression est plus importante aux stades précoces qu'aux stades métastatiques (Bolander et al., 2008), suggérant encore une fois l'existence de mécanismes de régulation propres à la cancérisation.

Un mécanisme possible permettant d'expliquer l'expression hétérogène des antigènes de différenciation dans les mélanomes, ou du moins leur expression diminuée à des stades métastatiques, serait la présence, dans les mélanomes, de répresseurs de la transcription de ces gènes. C'est le cas du facteur de transcription BRN2/POU3F2 qui serait capable de se fixer sur le promoteur du gène *mitf* et de réprimer son expression exclusivement dans des cellules de mélanome car cette protéine est absente des mélanocytes normaux (Kobi et al., 2010).

Ainsi, les antigènes de différenciation mélanocytaires voient leur expression largement contrôlée par des facteurs de transcription tissu-spécifiques, aussi bien dans les mélanocytes que dans les mélanomes. D'autres mécanismes peuvent également entrer en

jeu pour expliquer une telle hétérogénéité dans l'expression de ces antigènes dans les mélanomes, comme les mécanismes épigénétiques.

5.2. La régulation épigénétique

Après l'élucidation du code génétique à la fin des années cinquante, il fut considéré que l'information codée par le matériel génétique ne changeait pas et que, à l'exception des mutations génétiques, elle était transmise fidèlement d'une cellule à une autre et d'une génération à une autre. En 1942, Conrad Waddington a cependant introduit le terme « épigénétique » pour parler « des relations de causes à effets entre les gènes et leur produit, faisant apparaître un phénotype ». En introduisant ce concept, C. Waddington proposait que la diversité biologique ne soit pas uniquement imputable à la séquence nucléotidique. Par la suite, l'épigénétique a été définie comme toute information modulant l'expression de gènes sans altérer la séquence nucléotidique. Autrement dit, toutes les modifications affectant l'ADN ou les protéines qui lui sont associées sans changer à la séquence nucléotidique et qui se transmettent à travers les divisions cellulaires sont considérées comme marques épigénétiques (Feinberg and Tycko, 2004).

Le génome eucaryote est enroulé étroitement autour d'octamères de protéines d'histones formant ainsi le nucléosome, unité de base de la chromatine. Les nucléosomes doivent être compactés pour réussir à contenir l'ensemble du génome dans le petit volume que représente le noyau cellulaire, mais ils doivent également être accessibles pour permettre aux protéines responsables de la transcription, de la réplication et de la réparation de l'ADN d'accéder à l'ADN génomique. La méthylation de l'ADN, les modifications d'histones, les ARN non codant et toutes autres formes de remodelage de la chromatine affectent la manière dont l'ADN est compacté dans la chromatine et, par conséquent, l'accessibilité de l'ADN à la machinerie transcriptionnelle (Jaenisch and Bird, 2003).

L'épigénome est stable mais également flexible et peut changer rapidement durant le développement cellulaire et en réponse à des signaux environnementaux. Ainsi, le statut épigénétique d'un gène est plus dynamique que sa séquence nucléotidique. Les changements épigénétiques sont cruciaux pour le développement normal, et des

perturbations dans le programme épigénétique peuvent entraîner des processus pathologiques. Ainsi, en 1983, les cellules cancéreuses furent les premières à être décrites comme ayant des marques épigénétiques altérées. Par exemple, il a été montré que les cancers colorectaux présentaient une perte globale de la méthylation du génome par rapport au colon sain (Feinberg and Vogelstein, 1983). Plus tard, d'autres mécanismes épigénétiques ont été décrits comme étant dérégulés dans les cancers, telles que certaines modifications d'histones (désacétylation, déméthylation) (Fraga and Esteller, 2005). Des désordres dans l'expression de certains gènes impliqués dans la machinerie épigénétique, tels que certaines enzymes épigénétiques, pourraient avoir un rôle dans la pathogénèse des cancers et autres maladies.

5.2.1. Les Modifications des histones

Un des mécanismes majeurs impliqués dans la régulation épigénétique est la modification des histones. Les histones se regroupent en 8 protéines (2 histones H2A, 2 histones H2B, 2 histones H3 et 2 histones H4) formant le nucléosome, sur lequel s'enroule environ 146 paires de bases. L'histone H1 est, quant à elle, adossée au nucléosome et participe à la stabilisation de ce dernier (Fullgrabe et al., 2011) (**figure 15**).

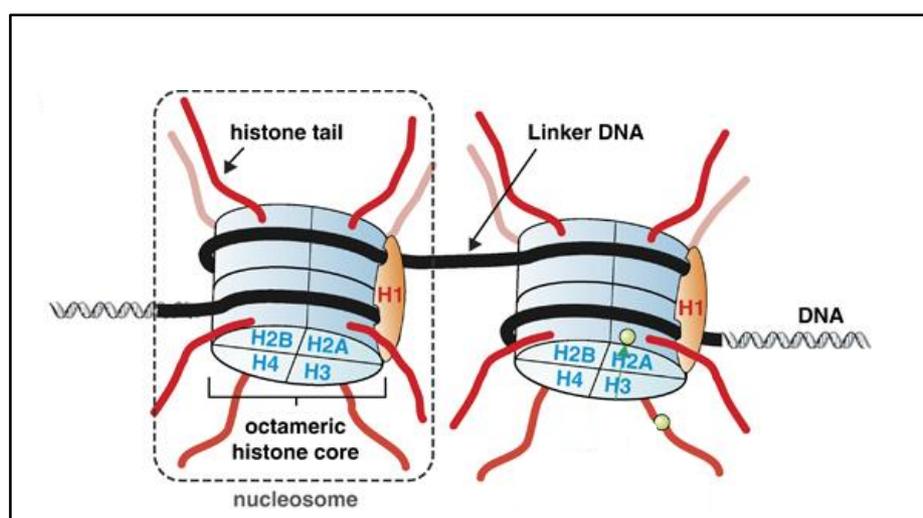


Figure 15: Organisation du nucléosome (Fullgrabe et al., 2011)

Elles n'ont pas seulement un rôle structural puisqu'elles affectent également la fonction de la chromatine. En effet, les queues d'histones (région N-terminale) dépassent du nucléosome et les différents résidus qui les composent sont accessibles à des modifications post-traductionnelles dont les deux plus fréquentes sont l'acétylation régulée par le couple d'enzymes HAT/HDAC (Histone Acetyl-Transférase/Histone deacetylase) et la méthylation régulée par le couple d'enzymes KMT/KDM (Lysine Methyl-Transférase/Lysine DéMéthylase) (Kouzarides, 2007) (**figure 16**). Les deux histones H3 et les deux histones H4 sont les histones majoritairement concernées par ces modifications.

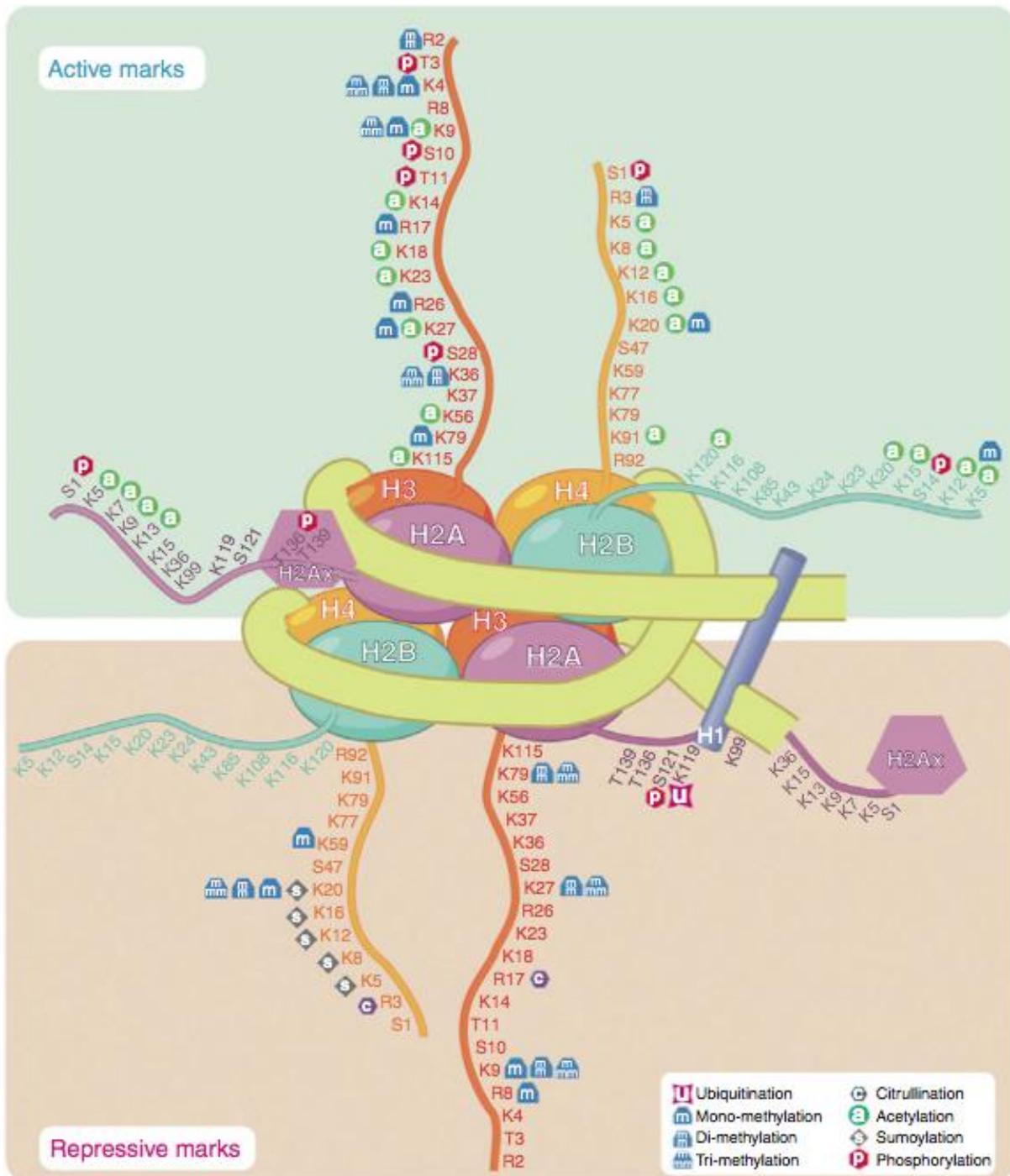


Figure 16 : Les différentes modifications possibles sur les histones (Sawan and Herceg, 2010)

Ces modifications jouent sur la structure de la chromatine, qui elle-même influe sur l'expression des gènes. Par conséquent, l'expression des gènes peut être altérée par les modifications des histones. Ces modifications, catalysées par un groupe d'enzymes spécifiques qui ajoute un groupement chimique particulier sur un résidu spécifique de la queue d'histone, sont des processus dynamiques. Ils sont également réversibles puisque chaque groupement chimique peut être éliminé par un groupe d'enzymes antagonistes.

L'intérêt pour les modifications des histones a crû de manière importante depuis qu'il a été découvert que les histones associées avec les gènes hautement transcrits sont hyperacétylées (Allfrey et al., 1964). Dans les cinquante années suivantes, une centaine de modifications d'histones distinctes a été décrite, dont la méthylation des lysines, l'acétylation des lysines, la phosphorylation des sérines/thréonines et d'autres moins étudiées comme la crotonylation des lysines (Kouzarides, 2007; Tan et al., 2011). Avec l'arrivée des techniques d'immunoprécipitation de chromatine sur génome entier couplée à de l'analyse par microarrays (Chip-chip) ou à du séquençage haut débit (Chip-seq), la cartographie des modifications d'histone globales a été réalisée dans beaucoup d'organismes (Kharchenko et al., 2011; Liu et al., 2005; Wang et al., 2008).

Compte tenu de l'importance des modifications d'histones durant les processus biologiques cellulaires, il n'est pas étonnant qu'une dérégulation de ces modifications soient retrouvées dans plusieurs pathologies dont les cancers (Sharma et al., 2010) (**figure 17**).

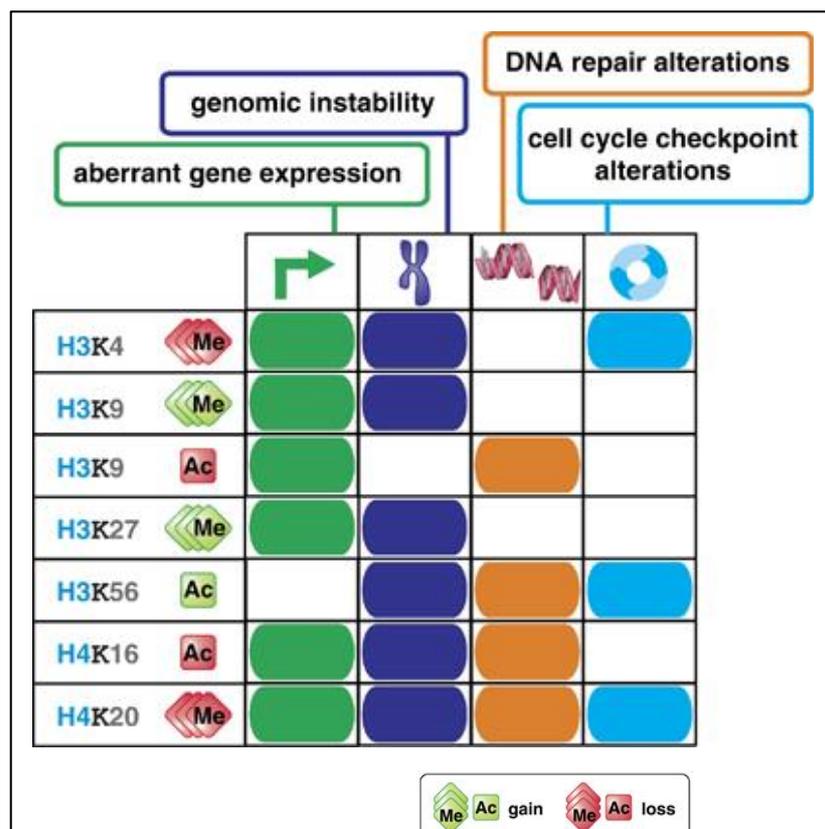


Figure 17 : Modifications d'histone impliquées dans le processus tumoral. Sont représentées les modifications d'histone impliquées dans l'expression aberrante de gènes (en vert), l'instabilité génomique (en violet), la réparation de l'ADN (en orange) et l'altération des points de contrôle du cycle cellulaire (en bleu). ac, acétylée ; H, histone ; K, lysine ; me, méthylée (Fullgrabe et al., 2011).

5.2.2. La Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN du carbone 5 des résidus cytosines précédant une guanine (dinucléotides CpG) est la modification épigénétique la plus étudiée et la mieux connue des modifications épigénétiques chez les mammifères. Cette modification est catalysée par une famille d'enzymes, les DNA méthyltransférases (DNMT), qui ajoute un groupement méthyle sur le carbone 5 des cytosines en utilisant la S-adenosyl-méthionine comme donneur de méthyle aboutissant ainsi à une 5-méthylcytosine.

Chez les mammifères, trois DNMT ont été décrites : l'enzyme DNMT1, l'enzyme DNMT3A et l'enzyme DNMT3B (Robertson, 2001). L'enzyme DNMT1 est une méthyltransférase de maintenance qui reconnaît préférentiellement l'ADN hemi-méthylé et est donc responsable du maintien du profil de méthylation après la réplication de l'ADN. Les enzymes DNMT3B et DNMT3A sont, quant à elles, des méthyltransférases dites *de novo*, qui modifient le profil de méthylation de l'ADN en méthylant des cytosines de l'ADN jusque là déméthylées. Elles reconnaissent aussi bien des séquences ADN hemi-méthylées que non méthylées et sont impliquées dans la méthylation de l'ADN durant le développement embryonnaire (**Figure 18**) (Chen and Riggs, 2011). La déméthylation est généralement passive et est la conséquence de la non méthylation du brin d'ADN néosynthétisé pendant la réplication. L'existence d'une déméthylation active, catalysée par une ou plusieurs enzymes, est plus controversée. Certaines études annoncent qu'il existe une déméthylation active dans certains types cellulaires comme les neurones (Ma et al., 2009) ou encore les lymphocytes T (Bruniquel and Schwartz, 2003). Plusieurs voies impliquant les protéines TET (Ten Eleven Translocation) conduisant l'hydroxylation des 5-méthylcytosines peuvent aboutir à la déméthylation de l'ADN. Cependant, l'implication de ces mécanismes dans la régulation de la transcription des gènes doit être encore démontrée (Pastor et al., 2013).

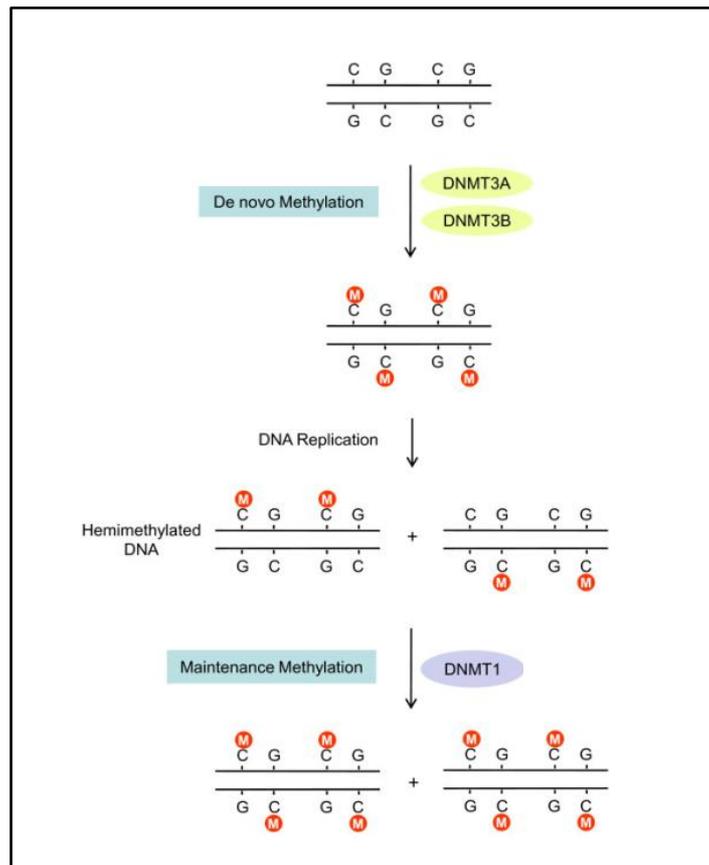


Figure 18 : Les principales enzymes responsables de la méthylation de l'ADN

Chez l'Homme, la majorité des dinucléotides CpG a été éliminée du génome au cours de l'évolution, par désamination de la cytosine et conversion en thymine, aboutissant ainsi à une répartition non aléatoire. Ainsi, il existe des régions riches et des régions pauvres en dinucléotides CpG. Les régions du génome riches en dinucléotides CpG, appelées alors « îlots CpG », sont localisées dans la région promotrice d'environ 60% des gènes chez l'homme et couvrent quelques centaines de paires de bases. Cette empreinte de méthylation peut être dépendante du type tissulaire (Ehrlich et al., 1982).

Dans les cellules saines, les îlots CpG retrouvés dans les régions promotrices des gènes exprimés sont hypométhylés, permettant ainsi à la machinerie transcriptionnelle d'accéder à l'ADN. A l'inverse, les régions non codantes, les séquences répétées ou encore le corps même des gènes sont, quant à eux, hyperméthylés et ainsi inaccessibles à la transcription. Dans certains cas, des régions promotrices peuvent montrer une

hyperméthylation, comme c'est le cas des gènes d'un des deux chromosomes X chez la femme, de certains gènes ayant une expression restreinte à un type tissulaire comme les gènes « cancer germline » dans la lignée germinale mâle ou encore des gènes soumis à empreinte génomique parentale (Esteller and Herman, 2002). L'empreinte parentale est un processus qui implique l'hyperméthylation d'un des deux allèles d'un gène très tôt dans la lignée germinale mâle et femelle aboutissant ainsi à une expression mono-allélique.

Un cas plus discuté concerne les gènes tissus spécifiques, pour lesquels certains d'entre eux possèdent des îlots CpG dans leur région promotrice tandis que d'autres ne présentent que quelques dinucléotides CpG. Il a été proposé que la méthylation soit l'un des mécanismes impliqués dans la répression de ces gènes dans les cellules où ils ne doivent pas être exprimés. Un exemple est donné par la régulation de l'expression restreinte au foie de la méthionine adénosyltransférases 1A chez les rongeurs (Torre et al., 2000). Cependant, il n'est pas clairement établi si la régulation par méthylation est le principal mécanisme impliqué dans la répression tissulaire de certains gènes ou bien si l'absence d'expression du gène est due au manque de certains facteurs de transcription tissu-spécifiques.

Des altérations du profil de méthylation de l'ADN sont souvent associées à des pathologies comme les cancers (Feinberg and Tycko, 2004; Jones and Baylin, 2002), et les mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement de méthylations de l'ADN aberrantes représente un champ d'investigation en plein développement.

5.2.3. La régulation épigénétique de la transcription des antigènes de mélanome

Des variations dans le profil de méthylation de l'ADN ont lieu dans quasiment tous les types de tumeurs. Aussi bien des pertes (hypométhylation) que des gains (hyperméthylation) de marques épigénétiques sont observés au sein du génome de la même cellule tumorale. Une hyperméthylation dans les cellules tumorales touche souvent les promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur et est donc associée à une perte de fonction anti-oncogénique (Esteller, 2008). L'hypométhylation de l'ADN, en revanche, contribue à la progression tumorale en favorisant l'instabilité génomique et la transcription d'oncogènes (Gaudet et al., 2003; Nishigaki et al., 2005). D'une manière générale, la perte de la méthylation est le phénomène prédominant (Ehrlich, 2002; Gama-Sosa et al., 1983), et c'est la raison pour laquelle on parle d'une hypométhylation globale de l'ADN dans les tumeurs.

L'hypométhylation globale observée dans les cancers semble toucher les promoteurs des gènes « cancer-germline ». En effet, alors que dans la plupart des tissus sains, dont les mélanocytes, l'expression de ces antigènes est réprimée par une forte méthylation de leur région promotrice, une hypométhylation aberrante de leur promoteur conduisant à leur expression est retrouvée dans le mélanome, mais également dans d'autres types tumoraux (De Smet et al., 1999).

La première démonstration du rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression de ces antigènes a été apportée par des expériences de transfections transitoires de gène rapporteur, montrant que les cellules qui n'exprimaient pas le gène *MAGE-A1* endogène possédaient néanmoins les facteurs de transcription capables d'activer la transcription de ce gène (De Smet et al., 1995). Cette étude a ainsi montré l'existence d'un mécanisme de régulation de la transcription empêchant l'activation de ces gènes par ces facteurs de transcription. Par la suite, d'autres études ont montré que des traitements hypométhylants, réalisés sur des cellules de mélanome n'exprimant pas l'antigène *MAGE-A1*, induisaient l'expression de cette protéine (De Smet et al., 1996; Weber et al., 1994). A l'inverse, des expériences de gène-rapporteur ont démontré que la méthylation *in vitro* du gène *MAGE-A1* exogène était suffisante pour empêcher sa transcription dans des cellules capables de l'exprimer de manière endogène (De Smet et al., 1999). Par la suite, ce même mécanisme de régulation par hypométhylation dans les cellules tumorales a également été mis en évidence pour plusieurs autres antigènes de la famille *MAGE* tels que *MAGE-A2*, *-A3* et *-A4* (Sigalotti et al., 2002), *MAGE-B2* et *-C1* (Furuta et al., 2004) ou encore pour le gène *NY-ESO-1* (Coral et al., 2013).

Bien que ces antigènes soient capables de générer une réponse immunitaire, l'importance de leur expression dans le développement tumoral reste peu comprise. En effet, on ne sait pas si ces antigènes ont une pertinence quelconque dans le développement de la tumeur ou bien si leur expression n'est qu'opportuniste et donc la simple conséquence de l'hypométhylation globale inhérente à l'état tumoral.

D'autre part, les mécanismes menant à l'hypométhylation de l'ADN des gènes « cancer-germline » dans les tumeurs restent mal compris. Une des possibilités est que la déméthylation de ces gènes soit la conséquence d'altérations au niveau des histones. Parmi elles, certaines modifications semblent pouvoir agir sur le statut de méthylation de l'ADN (Kouzarides, 2007). Ainsi, dans des modèles de cancers du colon et d'adénocarcinomes

pulmonaires, il a été montré que la déméthylation suivie de l'activation de la transcription de certains gènes « cancer-germline » étaient consécutives à la perte des marques d'histones répressives et un gain de marques d'histone activatrices (Link et al., 2009; Rao et al., 2011). Cependant, une étude récente menée par C. De Smet et ses collègues a montré que bien qu'il existait une relation entre la méthylation de la séquence promotrice du gène *MAGE-A1* et des modifications d'histones dans des cellules de mélanome, la modification des histones est, dans ce modèle cellulaire, consécutive à la méthylation de l'ADN (Cannuyer et al., 2013).

Un mécanisme également proposé comme participant à l'hypométhylation des gènes « cancer-germline » dans les cancers implique la protéine BORIS ("Brother Of the Regulator of Imprinted Sites" ou encore CTCFL). BORIS est un facteur de transcription activateur dont l'expression est restreinte à la lignée germinale masculine et dont la transcription est régulée par la méthylation de son gène (Martin-Kleiner, 2012). Des études ont montré que l'expression forcée du facteur de transcription BORIS dans des cellules de fibroblastes *in vitro* semblait corrélérer avec la déméthylation et la transcription de certains gènes « cancer-germline » (Vatolin et al., 2005). Ainsi, de par la déméthylation de la région promotrice du gène *boris* et par conséquent sa transcription dans bon nombre de cancers dont les mélanomes (Klenova et al., 2002; Vatolin et al., 2005) et de par sa potentielle implication dans la déméthylation des gènes « cancer-germline » dans un modèle cellulaire, il a été suggéré que BORIS participait à l'hypométhylation des gènes « cancer germline » dans les cancers. Cependant, des études ont montré que, bien que traduite dans les mélanomes, il n'existe pas de corrélation entre le niveau d'expression de BORIS et celui de l'antigène *MAGE-A1* ou encore d'autres antigènes « cancer-germline ». De plus, l'expression forcée de la protéine BORIS dans des cellules de mélanome n'aboutit pas à l'activation de gènes « cancer-germline » (Kholmanskikh et al., 2008). Ainsi, BORIS est peut-être nécessaire à l'activation de la transcription de ces gènes mais ne suffit apparemment pas à lui seul pour expliquer leur transcription.

Hormis la régulation par la méthylation de l'ADN de la transcription des antigènes cancer-germline, peu d'antigènes de mélanome ont été décrits à ce jour comme étant régulés par des mécanismes épigénétiques.

Concernant les antigènes de différenciation mélanocytaire, il a été montré qu'un traitement par un inhibiteur d'HDAC, le depsipeptide, conduisait à une surexpression de la

protéine PMEL17 dans un modèle de mélanome murin B16 (Murakami et al., 2008). Il a de plus été montré que l'utilisation de divers inhibiteurs d'HDAC sur des lignées de mélanomes et de sarcomes à cellules claires provoquait la diminution de l'expression du facteur de transcription spécifique de la lignée mélanocytaire M-MITF mais également du facteur SOX10 (Yokoyama et al., 2008), suggérant que l'acétylation des histones peut, de manière indirecte, jouer sur la régulation des antigènes de différenciation mélanocytaire.

6. Les immunothérapies dans le mélanome

Actuellement, le traitement de première intention concernant le mélanome consiste en l'exérèse totale de la tumeur primaire par chirurgie couplée ou non à un traitement par IFN- α selon le stade de la maladie. Bien que le taux de survie soit élevé à des stades précoces, il chute dramatiquement aux stades les plus avancés (mélanome métastatique). Aux stades métastatiques, le traitement conventionnel de référence est une chimiothérapie par Dédicène, mais les résultats sont très insuffisants. Grâce à son caractère fortement immunogène, le mélanome est un candidat pertinent pour la mise en place de stratégies alternatives d'immunothérapie. Ces immunothérapies peuvent se diviser en deux grands types : l'immunothérapie passive, ou transfert adoptif, qui consiste en l'injection au patient de lymphocytes T autologues spécifiques de la tumeur préalablement amplifiés *ex vivo* (**Figure 19**) et l'immunothérapie active, ou vaccination thérapeutique, qui consiste à stimuler le système immunitaire du patient *in vivo* dans le but d'éradiquer les cellules tumorales.

Nous détaillerons ici brièvement et de manière non exhaustive les immunothérapies adoptives et nous nous concentrerons sur la vaccination thérapeutique peptidique, qui est l'objectif ultime de mes travaux de thèse.

6.1. Les immunothérapies passives ou adoptives

6.1.1. Transfert de Lymphocytes Infiltrant la Tumeur (TIL)

Les premiers essais de transfert adoptif de TIL dans le mélanome métastatique datent des années 80 où des régressions tumorales avaient été observées chez environ un tiers des patients traités par des injections de TIL amplifiés *ex vivo* sans évaluation préalable de leur réactivité (Rosenberg et al., 1988; Rosenberg et al., 1994). Les analyses rétrospectives menées par la suite sur les nombreux essais réalisés ont montré que les réponses cliniques observées corrélaient avec la réactivité des TIL vis-à-vis de la tumeur autologue, mais également avec la longueur de leurs télomères (Zhou et al., 2005) et leur capacité proliférative et de migration sur les sites tumoraux. Bien que des résultats objectifs aient été observés au cours des différents essais cliniques, la plupart des réponses cliniques sont partielles et de courte durée. En revanche, des réponses durables ont été observées lorsque l'injection de TIL se faisait en situation adjuvante, autrement dit en prévention de la rechute, après exérèse des métastases ganglionnaires (Dreno et al., 2002; Khammari et al., 2007; Labarriere et al., 2002). La génération de TIL sélectionnés sur la base de leur activité anti-tumorale, ainsi que les traitements lymphodéplétants préalables au transfert adoptif, ont permis d'améliorer les résultats de ces essais (Dudley et al., 2002; Dudley et al., 2008). Néanmoins, cette pré-sélection des TIL ne permet l'amplification des TIL spécifiques seulement pour environ 2/3 des patients, ce qui reste un inconvénient majeur pour ce type d'approche.

6.1.2. Transfert de lymphocytes T spécifiques issus de PBMC

Le principe consiste à injecter au patient des populations T fortement enrichies en lymphocytes T spécifiques ou des clones de lymphocytes T CD4 et /ou T CD8 autologues préalablement sélectionnés et amplifiés *in vitro* à l'aide de multiples stimulations des PBMC autologues. Un certain nombre d'essais cliniques avec des clones T CD8 spécifiques de MLANA et GP100 ont été réalisés depuis une dizaine d'années. Cependant, les résultats obtenus restent modestes, avec des taux de réponses relativement faibles et seulement

quelques observations de rémissions prolongées (Khammari et al., 2009; Mackensen et al., 2006; Vignard et al., 2005; Yee et al., 2002). Néanmoins, un essai clinique plus récent, utilisant la transfusion d'une population polyclonale de lymphocytes T CD4 et T CD8 spécifiques de la tumeur générée *in vitro* à l'aide de stimulations répétées par des cellules tumorales irradiées, a montré une rémission totale, une réponse partielle et trois stabilisations de la maladie sur les dix patients inclus (Verdegaal et al., 2011). Malgré ces résultats encourageants, la génération et l'amplification de lymphocytes T spécifiques de tumeur restent un processus long et complexe nécessitant du personnel qualifié. De plus, les stimulations répétées nécessaires pour atteindre un nombre de cellules T spécifiques suffisamment élevé pour envisager un effet thérapeutique peuvent conduire à l'obtention de cellules T proches de la sénescence et incapables de persister à long terme *in vivo*.

6.1.3. TCR transgéniques/ Récepteurs d'antigènes chimériques (CAR)

L'impossibilité d'obtenir des TIL systématiquement réactifs à la tumeur chez certains patients a conduit au développement de stratégies alternatives. L'une d'elles consiste à faire exprimer aux lymphocytes T du sang périphérique un TCR de forte affinité spécifique d'un antigène de tumeur, donnant ainsi accès rapidement à une grande quantité de lymphocytes T spécifiques de la tumeur ayant subi peu de divisions. Les premiers essais cliniques utilisant des lymphocytes T transduits avec des TCR spécifiques des antigènes MLANA et NY-ESO-1 ont montré des résultats très encourageants avec parfois des réponses totales (Johnson et al., 2009; Robbins et al., 2011). Cependant, dans une étude réalisée chez la souris, un effet délétère dû à l'appariement des chaînes du TCR transduit avec les chaînes du TCR endogène a été observé, conduisant à l'expression de TCR auto-réactifs (Bendle et al., 2010). De plus, de par leur haute affinité, les TCR transgéniques eux-mêmes peuvent être responsables de réactions auto-immunes. En effet, chez l'homme, il a été montré que des TCR transgéniques pouvaient cross-réagir avec un épitope présentant des similarités avec l'épitope ciblé et exprimé par des tissus vitaux (Linette et al., 2013).

Une autre approche consiste à faire exprimer par les cellules T du sang périphérique une molécule chimérique comportant la partie hypervariable d'un anticorps spécifique d'un antigène membranaire et les domaines intracellulaires de transduction du signal TCR.

L'avantage de ce système est que la reconnaissance des cellules cibles n'est pas dépendante de la restriction par le CMH ce qui permet ainsi de contourner les mécanismes d'échappement tumoral dus à la sous-expression des molécules du CMH par les cellules cancéreuses. Les premières générations de CAR ont montré une faible capacité de prolifération, de survie et de persistance des cellules transduites, sûrement due au manque de molécules de co-stimulation (Brocker and Karjalainen, 1995). Les 2^{ème} et 3^{ème} générations de CAR, incluant des domaines de co-stimulation, ont permis d'augmenter l'efficacité de ce système, dans des proportions parfois trop importantes. En effet, le ciblage d'un antigène exprimé à bas bruit par des tissus sains peut conduire à une activation incontrôlée des lymphocytes T transduits par des CAR de 3^{ème} génération. C'est le cas de l'antigène Her2/neu, ciblé dans le cadre d'un essai réalisé chez un patient atteint de cancer colique. L'injection des lymphocytes T transformés a été très rapidement suivie d'une « tempête cytokinique » ayant entraîné le décès, probablement provoquée par la reconnaissance d'un faible niveau d'antigène exprimé sur les cellules de l'épithélium pulmonaire (Morgan et al., 2010).

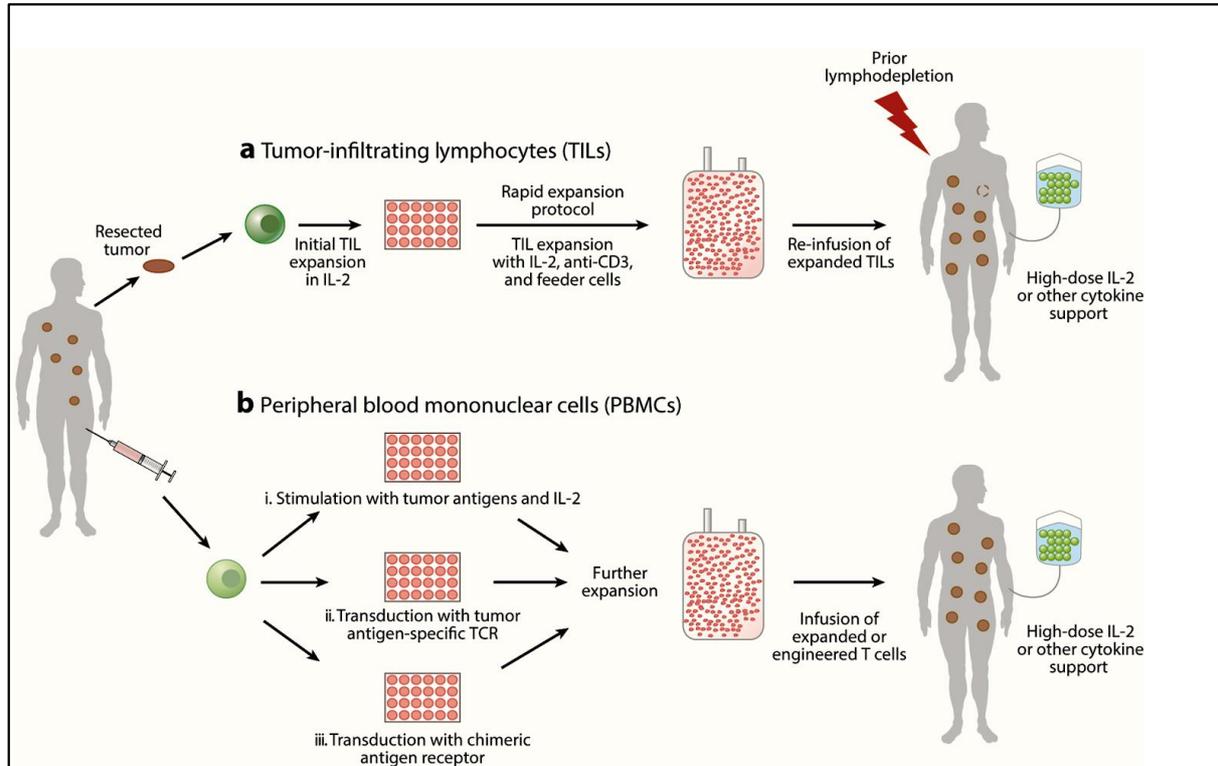


Figure 19 : Les différentes stratégies d'immunothérapies adoptives (Lizee et al., 2013)

6.2. Immunothérapie active : la stratégie de vaccination peptidique

La vaccination thérapeutique, à l'inverse de la vaccination prophylactique, vise à induire des réponses T chez des patients dont la maladie est déclarée. Chez les patients porteurs de cancers, la vaccination thérapeutique consiste à utiliser des antigènes associés aux tumeurs suffisamment immunogènes afin d'induire une réponse T spécifique de la tumeur assez efficace pour éradiquer la tumeur. Il existe de nombreuses approches de vaccination thérapeutique, allant des cellules tumorales irradiées aux vaccins ADN, en passant par les vaccinations à base d'antigènes sous différentes formes, seuls ou présentés par des cellules dendritiques autologues. Nous développerons ici les vaccins peptidiques, qui constituent l'approche vaccinale la plus pertinente sur laquelle pourrait déboucher les résultats de mes travaux de thèse.

6.2.1. Vaccination par peptides courts

La vaccination de patients porteurs de cancers à l'aide de vaccins peptidiques a commencé par l'utilisation de peptides courts correspondant à des épitopes de classe I capables de générer des réponses T CD8 spécifiques d'antigènes de tumeur. La preuve de concept de l'efficacité de ce type de vaccination a été obtenue en 1993 par des régressions tumorales chez des souris présentant une tumeur transformée par le papillomavirus (HPV) dans lesquelles l'injection d'un épitope T CD8 spécifique de la protéine E7 de l'HPV a généré des réponses T CD8 spécifiques capables de lyser les cellules tumorales (Feltkamp et al., 1993). Par la suite, le même type de réponses a été retrouvé dans différents modèles murins présentant des tumeurs induites chimiquement, ou encore sur des métastases de cancer du poumon (Mandelboim et al., 1995; Noguchi et al., 1994).

Cependant, les premiers essais menés chez l'homme ont montré que la vaccination avec des peptides courts était loin d'être optimale puisqu'elle peut conduire à une tolérance immunologique vis-à-vis des antigènes ciblés plutôt qu'à l'induction de réponses immunes efficaces (Bijker et al., 2007; Toes et al., 1996). En effet, la vaccination par des peptides courts contenant des épitopes T CD8 conduit à la fixation exogène des peptides *in vivo* sur les molécules du CMH-I présentées par tous les types cellulaires, même les cellules non

professionnelles, telles que les cellules T. Or ces cellules, ne sont pas capables de présenter, en plus du complexe CMH/peptide, les molécules de co-stimulation requises pour générer une réponse T effectrice optimale (**Figure 20**). Ainsi, ce type de vaccination, même s'il peut permettre l'induction de réponses T effectrices ne parviendrait pas à induire la constitution d'un pool de lymphocytes T mémoires (Rosenberg et al., 2004; Schwartzentruber et al., 2011).

Néanmoins, la vaccination de souris infectées par le LCMV par un épitope minimal de classe I a permis d'inhiber la réplication du virus par l'induction de réponses T CD8 spécifiques (Schulz et al., 1991). Dans cette étude, le peptide utilisé contenait également un épitope T CD4 chevauchant capable d'induire une réponse T helper en même temps qu'une réponse T CD8 (Fayolle et al., 1991). Il est donc probable que l'efficacité de cette vaccination soit liée à la co-activation de lymphocytes T CD4. En effet, l'activation de lymphocytes T CD4 helper permet une activation correcte de la DC *via* l'interaction CD40-CD40L et donc la présentation à la surface de la DC des molécules de co-stimulation nécessaires à la génération de réponses T CD8 effectrices optimales. L'activation des cellules T CD4 conduit également à la sécrétion d'IL-2 par ces lymphocytes, cytokine nécessaire à la prolifération des cellules T CD8.

En prenant appui sur ces résultats, des injections de peptides tumoraux minimaux de classe I et II ont été menées dans des modèles murins et ont montré que la vaccination par un mélange d'épitopes T CD4 et TCD8 augmentait l'amplitude de la réponse T CD8 (Bijker et al., 2007) et était capable de protéger la souris immunisée contre une injection de cellules tumorales ultérieure (Casares et al., 2001; Ossendorp et al., 1998). Par la suite, des essais de vaccination utilisant des cocktails d'épitopes T CD8 et T CD4 ont été menés chez l'homme (Slingluff et al., 2013; Slingluff et al., 2011). Cependant, ces études n'ont pas montré les résultats espérés puisque les réponses T CD8 spécifiques obtenues sont même diminuées par rapport à la vaccination avec uniquement des peptides de classe I. Des explications ont été avancées comme l'induction de réponses T régulatrices spécifiques des antigènes de tumeur ciblés, la modulation de l'expression des récepteurs de « homing » ou encore la composition de l'adjuvant. De plus, bien que l'activation des cellules cytotoxiques soit de meilleure qualité, la fixation des épitopes de manière exogène sur les CPA non professionnelles présentant des molécules du CMH-I est toujours existante et donc, par

conséquent, la réponse T CD8 spécifique générée demeure faiblement persistante (Bennett et al., 1998b) (**Figure 20**).

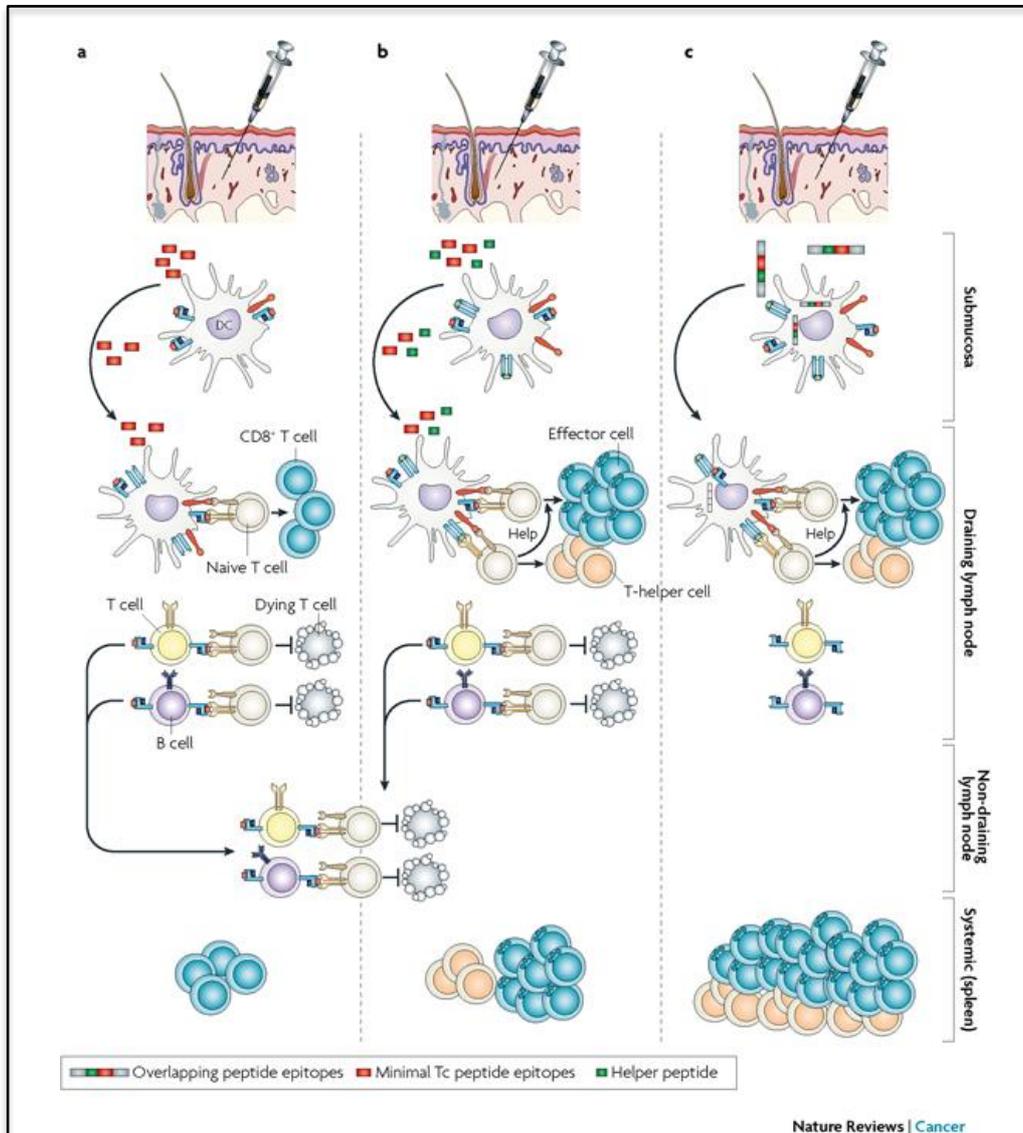


Figure 20 : Les différentes stratégies de vaccination peptidique

(a) Vaccination par des peptides courts contenant uniquement des épitopes T CD8 (b) Vaccination par des peptides courts contenant soit des épitopes T CD8 ou T CD4 (c) Vaccination par des longs peptides synthétiques contenant des épitopes T CD8 et T CD4 (Melief and van der Burg, 2008)

6.2.2. Longs Peptides Synthétiques (SLP)

La potentielle tolérance ou anergie des lymphocytes T induite suite à une vaccination par peptides courts a conduit au développement d'une stratégie alternative afin d'éviter ces phénomènes délétères. Ainsi, l'utilisation de SLP semble apporter plusieurs solutions à la vaccination thérapeutique. En effet, la longueur de ces longs peptides (entre 25 et 35 acides aminés) permet de leur conférer une structure tertiaire qui peut les protéger contre la dégradation par des exopeptidases extracellulaires, mais également empêcher leur fixation exogène dans les molécules du CMH. Ils doivent donc être internalisés par les CPA professionnelles comme les DC et apprêtés pour être présentés aux cellules T (Bijker et al., 2008; Zwaveling et al., 2002) (**Figure 20**).

Les premiers résultats obtenus par vaccination à l'aide de SLP sont plutôt encourageants. En effet, dans des modèles murins, il a été montré que la vaccination à l'aide de SLP pouvait induire des réponses T mémoires capables de contrôler efficacement la croissance de tumeurs transplantées (Zwaveling et al., 2002).

Plus récemment, une vaccination utilisant un SLP issu de l'HPV-16 chez des patientes atteintes de lésions pré-néoplasiques vulvaires a induit des régressions cliniques chez la plupart des patientes, montrant ainsi pour la première fois des réponses cliniques chez l'homme (Kenter et al., 2009). Les SLP contiennent aussi bien des épitopes de classe I et II, ce qui conduit à l'activation simultanée de réponses T spécifiques CD4 et CD8 comme l'ont montré des études *in vitro* ciblant l'antigène NY-ESO-1 (Zeng et al., 2002), mais également dans un modèle murin ciblant l'antigène Her-2/neu (Knutson et al., 2001). Chez l'homme, un autre essai de vaccination a été mené chez des patients porteurs de cancers de l'œsophage, gastrique ou encore du poumon avec un SLP (20mer) recouvrant une partie de la protéine NY-ESO-1. Ce SLP s'avère capable de générer *in vivo* des réponses T spécifiques CD8 et CD4 ainsi que de stimuler la production d'anticorps anti-NY-ESO-1 sous-entendant également une activation de cellules B. Cependant, aucune réponse clinique significative ne corrèle avec ces réponses immunologiques (Kakimi et al., 2011).

L'utilisation de SLP chevauchants recouvrant la totalité d'une protéine antigénique permet la présentation potentielle de tous les épitopes présents dans l'antigène natif, ce qui

représente la possibilité de vacciner tous les patients sans restriction liée à un contexte HLA particulier. Des études menées chez des patients porteurs de cancers colorectaux (Speetjens et al., 2009) et ovariens (Leffers et al., 2009) utilisant des SLP chevauchants recouvrant la totalité de la protéine P53 ont montré uniquement l'induction de réponses T CD4 spécifiques de P53 chez la majorité des patients, malgré la présence d'un épitope T de classe I potentiellement capable d'induire des réponses T CD8. Une autre étude menée chez des patients porteurs de cancers rénaux vaccinés avec des 30mer chevauchants recouvrant la protéine NY-ESO-1 a montré également l'induction de réponses immunes T CD4 et T CD8 spécifiques ainsi qu'une production d'anticorps dirigée contre la protéine NY-ESO-1 (Sabbatini et al., 2012). Il est intéressant de noter que la fréquence de la réponse T générée aussi bien CD8 que CD4 varie selon l'adjuvant utilisé. Malgré ces résultats encourageants obtenus dans ces différentes études, aucune réponse clinique n'est associée aux réponses immunes observées (Leffers et al., 2012; Sabbatini et al., 2012). L'absence de réponses T CD8 observée dans certains cas peut suggérer des problèmes d'apprêtement antigénique. En effet, l'existence potentielle d'épitopes chevauchants au sein des longs peptides peut amener à une présentation sous-optimale d'un des épitopes, aboutissant potentiellement à une réponse T sous-optimale, lié à un défaut de présentation de l'un ou l'autre de ces épitopes.

Une des dernières générations de SLP utilisés en vaccination correspond à des longs peptides hybrides composés de la fusion de deux peptides. Par exemple, la protéine li est indispensable au chargement d'épitopes dans les molécules de classe II et le 4mer issu de cette protéine, li-key, correspond à la plus petite séquence active de cette protéine. Des études *in vitro* ont montré que le priming de PBMC issus de patients porteurs de cancer du sein avec un long peptide AE37 (long peptide hybride contenant un épitope T CD4 issu de la protéine Her-2/neu et la séquence li-key) induisait la prolifération de lymphocytes T CD4 capables de reconnaître des cellules tumorales exprimant la protéine Her-2/neu native (Sotiriadou et al., 2007). Ce peptide hybride AE37 est utilisé depuis 2005 dans des essais cliniques chez l'homme, aussi bien dans le cadre du cancer du sein que du cancer de la prostate. Les premiers résultats sont très prometteurs puisque dans les deux essais, une réponse immune à long terme dirigée contre l'épitope T CD4 natif a été mise en évidence chez les patients vaccinés (Holmes et al., 2008; Perez et al., 2010), ainsi qu'une diminution

de la proportion de cellules T régulatrices circulantes (Gates et al., 2010; Perez et al., 2010). De manière intéressante, l'analyse des réponses T obtenues dans l'essai mené chez des patients porteurs de cancers de la prostate a montré la présence de réponses T CD4 spécifiques de l'épitope présent dans le long peptide hybride, mais également des réponses T CD8 spécifiques d'un épitope T absent du long peptide mais existant dans la protéine native Her-2/neu. Ainsi ces résultats suggèrent que les réponses T CD4 ont favorisé la génération des réponses T CD8 spécifiques de l'antigène Her-2/neu (Perez et al., 2010).

Enfin, Takahashi *et coll* ont montré que la vaccination d'un patient atteint d'un cancer de la prostate métastatique avec un peptide hybride composé d'un épitope T CD8 et d'un épitope T CD4 issu de l'antigène MAGE-A4, induisait une augmentation des réponses helper et cytotoxique spécifiques de MAGE-A4, mais également une augmentation de la production anticorps anti-MAGE-A4. De plus, les réponses immunologiques observées corrélaient avec les régressions tumorales (Takahashi et al., 2012).

Les résultats obtenus avec l'utilisation de longs peptides dans le cadre d'une vaccination anti-tumorale sont très encourageants puisqu'aussi bien dans des modèles précliniques murins que chez l'homme, des réponses T anti-tumorales sont induites. Cependant, hormis dans le cadre d'un cancer induit par infection virale, les résultats cliniques obtenus sur des tumeurs solides sont loin d'être optimaux. Cela soulève la nécessité d'optimiser ces vaccins en sélectionnant en amont des épitopes de classe II immunogènes et capables de se lier à différentes molécules HLA, en travaillant sur l'association d'un épitope immunodominant de classe I et d'un ou plusieurs épitopes de classe II dans le cadre d'un long peptide hybride, mais également en recherchant le meilleur adjuvant possible.

OBJET DE L'ÉTUDE

Malgré les progrès réalisés depuis 25 ans dans la conception des protocoles d'immunothérapie anti-tumorale, les résultats cliniques restent encore insuffisants malgré l'induction avérée de réponses immunes. Il est donc important de continuer à optimiser les protocoles d'immunothérapie anti-tumorale. Quelque soit le type d'immunothérapie envisagée, un point central est la définition de la cible antigénique la plus pertinente, tant du point de vue de son profil d'expression tissulaire que de son immunogénicité.

L'efficacité thérapeutique de ces antigènes peut être évaluée par l'analyse de différents essais cliniques de vaccination thérapeutique ou de transfert adoptif de lymphocytes T.

Par une analyse rétrospective portant sur la spécificité antigénique de populations de TIL injectées à des patients porteurs de mélanome, notre équipe a caractérisé un nouvel antigène de mélanome, nommé MELOE-1, dont un épitope T est reconnu par les TIL de mélanomes dans le contexte HLA-A*0201 (Godet et al., 2008). Une forte corrélation entre le transfert de lymphocytes T CD8 spécifiques de cet épitope et la survie sans rechute de patients traités par injection de TIL a également été démontrée. En effet, alors que 5 des 9 patients HLA-A2 toujours en rémission depuis plus de 15 ans ont reçu des TIL contenant des lymphocytes T spécifiques de l'antigène MELOE-1, aucun des patients ayant rechuté (n=21) n'a reçu de tels lymphocytes (Godet et al., 2008).

Ainsi, l'antigène de mélanome MELOE-1 semble impliqué dans l'immunosurveillance du mélanome. Par ailleurs, le répertoire de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'antigène MELOE-1 affiche une fréquence relativement élevée de l'ordre de 10⁻⁵ parmi les lymphocytes T CD8⁺ totaux du sang périphérique et ce, aussi bien chez les donneurs sains que chez les patients porteurs de mélanome (Godet et al., 2010b). Cette fréquence élevée est relativement rare pour des lymphocytes T spécifiques d'antigènes de mélanome (à l'exception des lymphocytes T spécifiques de l'antigène Melan-A), et est un argument supplémentaire pour l'utilisation de cet antigène dans des stratégies d'immunothérapie.

Plus récemment, l'existence d'épitopes de classe II issus de la protéine MELOE-1 capables d'induire une activation de lymphocytes T CD4 a été mise en évidence. Ainsi deux nouveaux épitopes MELOE-1₂₄₋₃₇ et MELOE-1₃₂₋₄₄, reconnus dans les contextes HLA-DRβ1*1101 et HLA-DQβ1*0603 respectivement, ont été caractérisés. Ces deux épitopes T de classe II se situent dans la région C-terminale de la protéine, à proximité de l'épitope T de

classe I déjà décrit et sont apprêtés de manière naturelle par les cellules dendritiques à partir de la protéine MELOE-1 entière (Rogel et al., 2011). L'existence d'épitopes de classe II sur l'antigène MELOE-1 permet d'envisager l'utilisation de cet antigène dans des approches vaccinales, permettant de stimuler à la fois des réponses T CD8 et CD4 helper.

D'un point de vue transcriptionnel, l'ARN messenger *meloe* est surexprimé dans les mélanomes et les mélanocytes. Cependant, seules les lignées de mélanomes sont reconnues par des clones T spécifiques de MELOE-1, suggérant également un contrôle post-traductionnel de l'antigène MELOE-1 (Godet et al., 2008). A l'inverse, le gène *meloe* sous-exprimé dans toutes les autres lignées tumorales et tissus sains testés. Cet ARN messenger est issu de la transcription du brin inverse de l'intron 3 du gène de l'HDAC-4 (**Figure 21**).

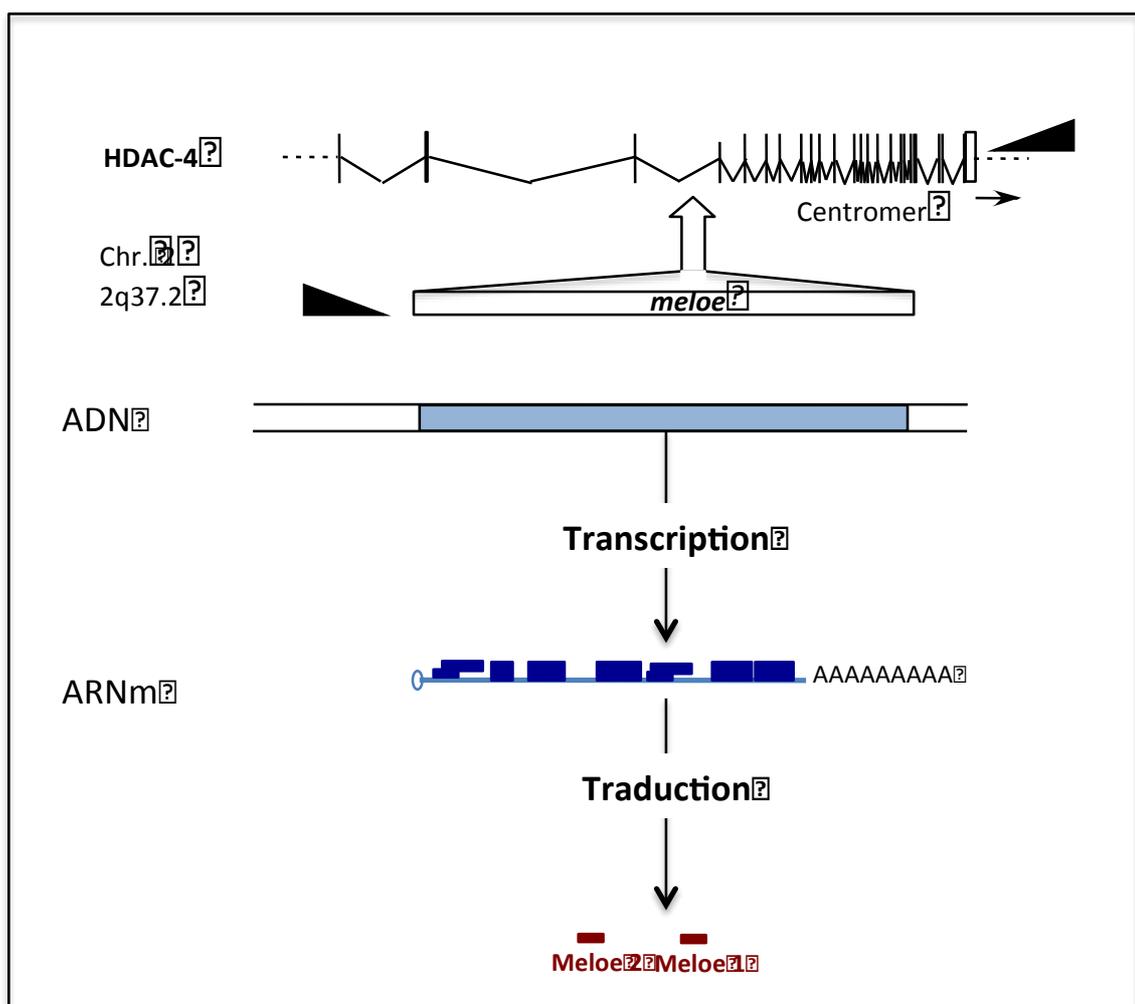


Figure 21 : Localisation du gène *meloe* et structure de son transcrit.

Bien qu'il possède les caractéristiques des longs ARNm non codants (coiffé et polyadénylé), aucune corrélation n'a été mise en évidence entre son expression et celle du gène HDAC-4, suggérant donc que le transcrit n'a pas un rôle de contrôle dans l'expression du gène HDAC-4. De plus, l'ARNm *meloe* n'est pas un ARN conventionnel, dans le sens où il ne subit pas d'épissage et où il est porteur non pas d'un mais de plusieurs petits cadres ouverts de lecture (ORF) dont un code l'antigène MELOE-1 (Godet et al., 2008) et un autre l'antigène MELOE-2 dont est issu également un épitope T de classe I reconnu par les TIL d'un patient porteur de mélanome dans le contexte HLA-A*0201 (Godet et al., 2010a).

Ainsi, le profil d'expression de l'antigène MELOE-1, la reconnaissance d'un épitope dans le contexte HLA-A*0201 par les TIL de certains patients, la corrélation entre l'injection de ces lymphocytes T et la prévention de la rechute et l'existence d'épitopes de classe II sur cet antigène, font de ce dernier une cible prometteuse pour l'immunothérapie du mélanome.

L'objectif de mes travaux de thèse était d'une part d'élucider les mécanismes conduisant à sa surexpression dans les mélanomes, et d'autre part de définir de façon plus exhaustive son potentiel immunogène dans le contexte classe II.

RÉSULTATS

Article 1 : Overexpression of *meloe* gene in melanomas is controlled both by specific transcription factors and hypomethylation

Bobinet M, Vignard V, Florenceau L, Lang F, Labarriere N, Moreau-Aubry A

PLoS One. 2013 Sep 25;8(9):e75421

Le premier objectif de ma thèse a été d'identifier les mécanismes transcriptionnels impliqués dans la surexpression du gène *meloe* dans la lignée mélanocytaire. Par une analyse qPCR, nous avons documenté l'expression du gène *meloe* dans un large panel de mélanocytes et de lignées cancéreuses de diverses origines. Nous avons ensuite déterminé le promoteur minimal fonctionnel du gène *meloe*. Pour cela, nous avons utilisé la technique de « gene reporter assay » qui permet de tester l'activité promotrice d'une séquence génomique de manière indirecte. A partir d'un vecteur contenant un gène rapporteur (Firefly Luciférase), nous avons cloné en amont de ce gène luciférase des séquences d'ADN correspondant à la région promotrice du gène *meloe* de plus en plus tronquée en 5'. Nous avons ensuite co-transfecté ce vecteur avec un plasmide d'expression servant de contrôle interne de l'efficacité de la transfection (codant pour le gène de la Renilla Luciférase sous le contrôle du promoteur fort du CMV), dans des cellules de mélanome. Après 48 heures d'incubation les cellules sont lysées et les activités luciférases sont mesurées à l'aide d'un lecteur de luminescence. L'activité du gène rapporteur « expérimental » est ensuite normalisée sur l'activité du gène rapporteur « contrôle ».

Dans un second temps et en utilisant toujours l'approche de gène rapporteur, nous avons montré par mutagenèse dirigée du promoteur minimal fonctionnel préalablement défini l'implication de différents sites de fixation pour le facteur de transcription CREB et pour les membres de la famille SOX, dans l'activité de ce promoteur.

L'expression protéique des facteurs potentiellement impliqués dans l'activité du promoteur *meloe* : P-CREB (forme activée de CREB), SOX9 et SOX10 (membres de la famille SOX connus comme étant exprimés dans la lignée mélanocytaire) a été mesurée par western blot dans trois types de lignées cellulaires différentes (une lignée de mélanome surexprimant le gène *meloe* et une lignée de mésothéliome et de cancer colorectal sous-

exprimant le gène *meloe*). Nous avons ensuite validé leur implication dans l'activation de la transcription du gène *meloe* à l'aide de deux types d'approches.

La première a consisté à réaliser une immunoprécipitation de chromatine à partir des trois lignées tumorales (mélanome, mésothéliome et cancer colorectal) en utilisant des anticorps spécifiques des trois facteurs de transcription, suivie d'une PCR spécifique de la région de fixation de ces facteurs sur le promoteur *meloe*. La deuxième technique que nous avons utilisée pour valider l'implication du facteur SOX10, est basée le système « gene reporter assay » utilisé précédemment auquel nous avons ajouté la transfection de la forme « dominante négative » de ce facteur de transcription. Les résultats obtenus nous ont permis de montrer que le facteur de transcription ubiquitaire CREB, ainsi que les facteurs spécifiques de la lignée mélanocytaire, SOX9 et SOX10, étaient nécessaires et indispensables à l'activation de la transcription du gène *meloe*.

L'absence de fixation de la protéine P-CREB sur le promoteur *meloe* dans les lignées de mésothéliome et de cancer colorectal malgré sa présence au sein de ces cellules a soulevé l'hypothèse d'un deuxième mécanisme de régulation de la transcription. L'absence d'activité transcriptionnelle après mutation du dinucléotide CG dans le site de fixation du facteur P-CREB nous a mené à considérer le statut de méthylation de cette région promotrice au sein des différentes lignées. Ainsi, une conversion au bisulfite de l'ADN génomique sur diverses lignées cancéreuses et sur des mélanocytes a été réalisée. Cette technique permet de discriminer les dinucléotides CG méthylés de ceux non méthylés (conversion en uracile uniquement des cytosines non méthylées). Afin d'avoir une image statistique de la méthylation aux sites étudiés, un minimum de 10 allèles par lignée a été cloné et analysé. Les résultats ont montré que, dans des lignées de mélanome et les mélanocytes, la région promotrice du gène était hypométhylée tandis que dans les lignées de mésothéliome et de cancers colorectaux, cette région s'avérait être hyperméthylée, empêchant ainsi la fixation potentielle des facteurs de transcription, et participant ainsi au contrôle de l'expression de ce gène.

Ainsi, la transcription du gène *meloe* dépend aussi bien de la fixation de facteurs de transcription tissu-spécifiques sur son promoteur que de l'hypométhylation de la région promotrice (**figure 22**). Les perspectives de cette étude sont de déterminer si d'autres facteurs de transcription sont impliqués dans l'expression du gène et d'étendre l'étude du

profil de méthylation à une région élargie, ainsi que de caractériser le statut d'acétylation des histones dans cette région.

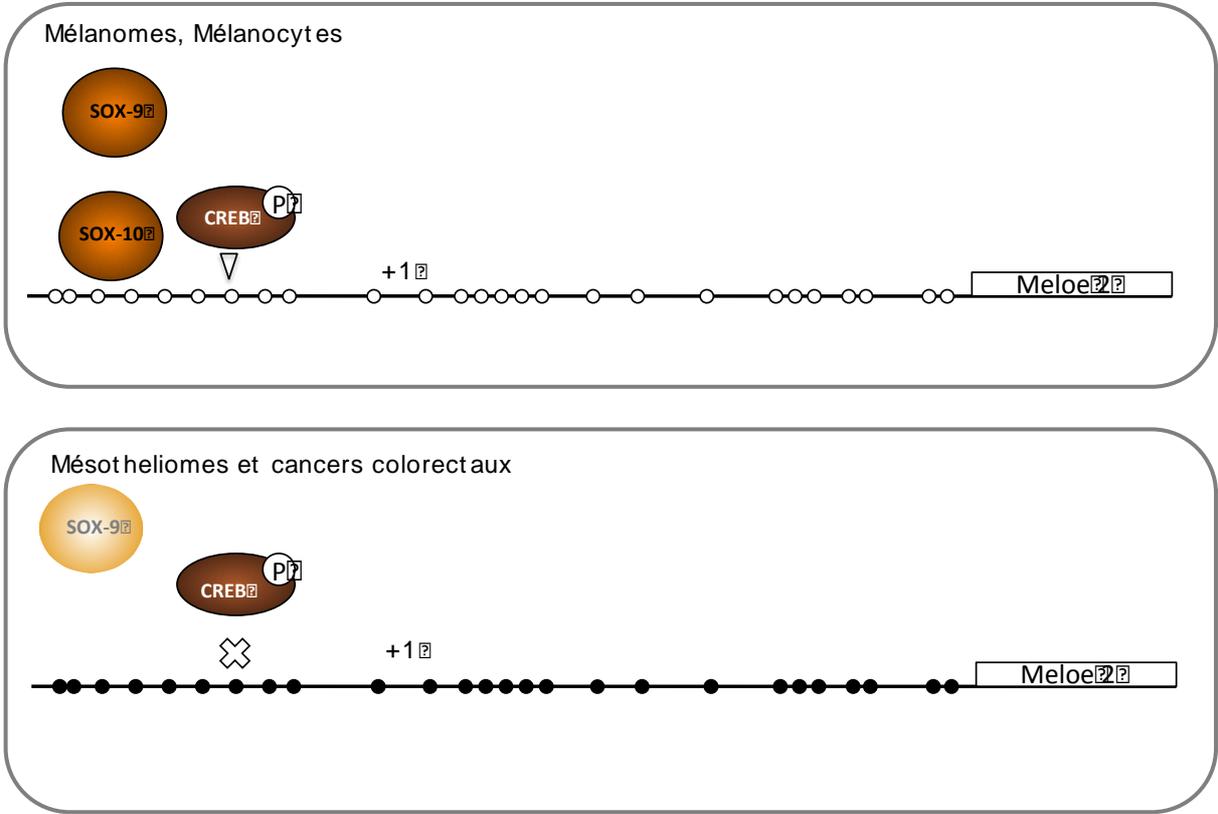


Figure 22 : Schéma récapitulatif des principaux résultats de l'article 1. Chaque rond représente un dinucléotide CG non méthylé (en blanc) ou méthylé (en noir).

Article 2 : MELOE-1 Antigen Contains Multiple HLA Class II T Cell Epitopes Recognized by Th1 CD4+ T Cells from Melanoma Patients

Bobinet M, Vignard V, Rogel A, Khammari A, Dreno B, Lang F, Labarriere N

PLoSOne.2012;7(12):e51716. doi: 10.1371/journal.pone.0051716. Epub 2012 Dec 20.

Le deuxième objectif de mes travaux a été de définir l'immunogénicité de l'antigène MELOE-1 issu de l'ARN *melo*e, en termes d'épitopes T de classe II, en vue d'une vaccination thérapeutique du mélanome avec des longs peptides combinant des épitopes induisant des réponses effectrices avec des épitopes induisant des réponses auxiliaires favorables à l'amplification et au maintien de ces réponses effectrices.

Afin de mettre en évidence l'existence de réponses T CD4 spécifiques des différentes régions de l'antigène MELOE-1, nous avons réalisé des stimulations de PBMC de donneurs sains avec la protéine MELOE-1 entière (10 μ M) en présence de 50UI d'IL-2/mL. Après 14 jours de culture, nous avons recherché la présence de lymphocytes T CD4 réactifs à l'antigène en restimulant les microcultures avec quatre 20mers chevauchants recouvrant la totalité de la protéine MELOE-1. Les réponses T spécifiques obtenues ont été analysées en cytométrie de flux à l'aide d'un double marquage CD4/TNF α . Cette première étude a permis de montrer que les régions centrale et C-terminale de la protéine étaient particulièrement immunogènes tandis que la région MELOE-1₁₈₋₃₇ n'a permis d'induire des réponses CD4 spécifiques que chez un des sept donneurs testés.

Dans le but de confirmer cette immunoprévalence chez les patients porteurs de mélanome (n=10) d'une part et de documenter le profil des réponses CD4 obtenues d'autre part, nous avons réalisé le même type de stimulation à partir de PBMC de patients. Au bout de 14 jours de culture, nous avons restimulé les microcultures avec cette fois-ci, trois longs peptides chevauchants couvrant toujours la totalité de la protéine. Les réponses T helper de type 1 et de type 2 spécifiques obtenues ont été discriminées à l'aide d'un triple marquage CD4/IFN γ /IL-4. Nous avons ainsi pu confirmer l'immunogénicité des régions centrale et C-

terminale chez les patients et nous avons montré que les réponses CD4 obtenues étaient majoritairement helper de type 1, réponses favorables à la mise en place de réponses effectrices anti-tumorales.

Dans le but d'identifier formellement les épitopes de classe II reconnus dans ces régions, nous avons dérivé des clones T CD4 par clonage par dilution limitante des microcultures contenant des lymphocytes T CD4 répondeurs après restimulation. Ainsi, nous avons isolé quatre clones T CD4 spécifiques des différentes régions de la protéine MELOE-1. Nous avons documenté la pertinence de ces épitopes en montrant qu'ils étaient naturellement présentés par des cellules dendritiques autologues préalablement chargées avec l'antigène MELOE-1. Nous avons ensuite recherché le contexte HLA restreignant la reconnaissance de chaque clone. Pour cela, nous avons stimulé les clones T par des lignées de B-EBV d'une part et des lignées de mélanome d'autre part, chargées (ou non) par le 20mer adéquat et possédant au moins une molécule HLA en commun avec les HLA exprimés par le donneur/patient dont étaient issus les clones. Enfin, nous avons déterminé l'épitope minimal reconnu par chacun des clones en les restimulant avec des peptides issus du long peptide reconnu et tronqués en N et C terminal.

A l'issue de cette étude, nous avons pu caractériser quatre nouveaux épitopes présents dans différentes régions de la protéine MELOE-1 et reconnus dans différents contextes HLA permettant ainsi d'envisager la vaccination chez une large cohorte de patients (**Figure 23**).

Les perspectives de ces travaux et des résultats complémentaires que j'ai obtenus sont de définir un peptide vaccinal optimal pour des essais de vaccination thérapeutique chez des patients porteurs de mélanome.

SCVGYPDEATSREQFLPSEGAACPPWHPSEIRISSTLNDECWPASL	MELOE-1	
PDEATSREQFLPS	MELOE-1 ₇₋₁₉	(HLA-DQβ1*0202)
TSREQFLPSEGAA	MELOE-1 ₁₁₋₂₃	(HLA-DRβ1*0101)
QFLPSEGAACPPW	MELOE-1 ₁₅₋₂₇	(HLA-DRβ1*1101)
RISSTLNDECWPAS	MELOE-1 ₃₁₋₄₄	(HLA-DQβ1*0201)

Figure 23 : Schéma récapitulatif des différents épitopes caractérisés dans l'article 2.

Résultats complémentaires : Comparaison *in vitro* de l'immunogénicité de la protéine MELOE-1 entière, du long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆ et du peptide court MELOE-1₃₆₋₄₄.

1. Objectifs

Les résultats obtenus précédemment ont montré que la protéine MELOE-1 était porteuse de multiples épitopes de classe II, répartis tout au long de sa séquence, et susceptibles d'induire des réponses Th1 chez des patients. Les approches de vaccination utilisant des longs peptides porteurs d'épitopes de classe II et de classe I sont particulièrement pertinentes, à la fois parce qu'elles ne permettent la présentation des épitopes que par des CPA, et aussi parce qu'elles sont susceptibles d'induire plus efficacement l'amplification des CTL effecteurs et la génération de lymphocytes T CD8 mémoires, grâce à l'activation d'une réponse CD4.

Nous avons, dans un premier temps, comparé *in vitro* l'efficacité d'induction de réponses T spécifiques CD8, à partir de PBMC de donneurs sains et de patients stimulés soit avec l'épitope de classe I minimal, soit la protéine entière MELOE-1, soit un long peptide dérivé de cette protéine (MELOE-1₁₁₋₄₆). Nous avons choisi ce long peptide de 36 acides aminés car sa taille est compatible avec celle des longs peptides utilisés jusqu'alors dans les essais de vaccination, et que cette séquence permet de préserver tous les épitopes présentés dans le contexte HLA-DR, molécule très exprimée à la surface des CPA. Dans un deuxième temps, nous avons évalué les réponses T CD4 induites par la stimulation avec la protéine MELOE-1 et le long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆.

2. Méthodologie

Nous avons stimulé des PBMC de donneurs sains ou de patients porteurs de mélanome avec soit la protéine MELOE-1 entière, soit le long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆, soit l'épitope T CD8 MELOE-1₃₆₋₄₄ restreint au contexte HLA-A*0201 (**Figure 24**). Pour cela, les PBMC sont distribués en plaque 96 puits à raison de 200 000 cellules par puits dans un volume final de 200µL de milieu de culture additionné de 10µM de peptide adéquat et de 50 UI IL2/mL.

Au bout de quatorze jours de culture, afin d'étudier la fréquence des réponses T CD8 spécifiques de l'épitope HLA-A2 obtenues dans chaque condition de stimulation, les microcultures ont été analysées à l'aide d'un double marquage membranaire CD8/tétramère-MELOE-1₃₆₋₄₄. Par ailleurs, l'analyse des fréquences des réponses T CD4 de

l'antigène MELOE-1 obtenues dans les conditions de stimulation MELOE-1 et MELOE-1₁₁₋₄₆ ont également été analysées après restimulation de l'ensemble des microcultures avec un pool de peptides contenant l'ensemble des épitopes T CD4 déjà décrits dans la séquence MELOE-1 (au total 5 épitopes pour la condition MELOE-1₁₁₋₄₆ et 6 épitopes pour la condition MELOE-1) (**Figure 24**) suivie d'un triple marquage CD4/CD8/IFN- γ . Nous avons inclus un marquage membranaire CD8 afin de documenter d'éventuelles réponses T CD8 spécifiques d'un épitope non caractérisé à ce jour.

SCVGYPDEATSREQFLPSEGAACPPWHPSERISSTLNDECWPASL	MELOE-1
TSREQFLPSEGAACPPWHPSERISSTLNDECWPASL	MELOE-1 ₁₁₋₄₆
TLNDECWPA	MELOE-1 ₃₆₋₄₄
PDEATSREQFLPS	MELOE-1 ₇₋₁₉
TSREQFLPSEGAA	MELOE-1 ₁₁₋₂₃
QFLPSEGAACPPW	MELOE-1 ₁₅₋₂₇
CPPWHPSERISSTL	MELOE-1 ₂₄₋₃₇
RISSTLNDECWPAS	MELOE-1 ₃₁₋₄₄
ERISSTLNDECWPAS	MELOE-1 ₃₂₋₃₄

Figure 24 : Séquence des différents peptides utilisés dans l'étude

Enfin, dans chaque condition de stimulation, les microcultures contenant des lymphocytes T CD4 spécifiques de l'antigène MELOE-1 d'une part et les microcultures contenant des lymphocytes T CD8 spécifiques d'autre part ont été regroupées. La recherche de l'épitope T CD4 reconnu a été effectuée en restimulant le pool de lymphocytes T CD4 par chaque épitope T de classe II, puis en réalisant un double marquage CD4/IFN- γ . La réactivité des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'antigène MELOE-1 obtenus dans les différentes conditions a été testée en regardant leur production intracellulaire de TNF- α après co-culture avec des lignées de mélanome HLA-A2 positives exprimant l'antigène MELOE-1 ou après re-stimulation par l'épitope CD8 MELOE-1₃₆₋₄₄.

3. Résultats

3.1. Fréquence des lymphocytes CD8 spécifiques de l'épitope T MELOE-1₃₆₋₄₄

L'efficacité de la protéine MELOE-1 entière, du long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆ et de l'épitope T MELOE-1₃₆₋₄₄ à stimuler la prolifération des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope de classe I a été testée sur les PBMC de trois patients porteurs de mélanome et quatre donneurs sains.

Les résultats montrent que les réponses T CD8 spécifiques obtenues sont très variables d'un donneur sain à l'autre mais également d'un patient à l'autre (**Tableau 2**).

Cette hétérogénéité peut s'expliquer par la variabilité préalablement observée dans les fréquences du répertoire T CD8 spécifique de l'épitope MELOE-1₃₆₋₄₄ entre les individus, comprise entre 10^{-5} et 10^{-6} parmi les lymphocytes T CD8 circulants (Godet et al., 2010b).

Peptide stimulation	Microcultures containing MELOE-1 specific CD8+ T cells (tetramer labelling) ^a			Class II HLA
	MELOE-1	MELOE-1 ₁₁₋₄₆	MELOE-1 ₃₆₋₄₄	
HD27	0/48	2/48 (5% to 19%)	1/48 (0.2%)	DPβ1*0401/0101 DQβ1*0501/0602 DRβ1*0101/1501
HD33	4/96 (0.6% to 17%)	ND	2/96 (8% to 10%)	ND
HD28	4/96 (0.5% to 27%)	1/96 (24%)	2/96 (1.3 to 15.5%)	DPβ1 NA DQβ1*0201/0501 DRβ1*0301
HD32	43/96 (0.6% to 74%)	41/96 (0.6% to 86%)	19/96 (0.8% to 81%)	DPβ1*0401 DQβ1*0501/0602 DRβ1*0101/1501
Pt#1	63/96 (0.5% to 46%)	40/46 (0.5% to 18%)	36/96 (0.5% to 50%)	NA
Pt#2	72/96 (0.5% to 10%)	63/96 (0.5% to 17%)	32/96 (0.5% to 5.8%)	NA
Pt#3	3/96 (1.8% to 5.5%)	2/96 (3% to 4%)	2/96 (2.6% to 21%)	

Tableau 2 : Nombre de microcultures contenant des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope MELOE-1/A2, après 14 jours de stimulation avec les différents peptides. Entre parenthèses sont indiqués les pourcentages minimum et maximum de lymphocytes T spécifiques détectés au sein des microcultures positives. NA: not available; ND: not done; HD: healthy donor; Pt: patient.

Sur l'ensemble des stimulations réalisées, seules les stimulations des PBMC d'un donneur sain (HD32) et de deux patients (Pt#1 et Pt#2) ont permis l'obtention d'un nombre de microcultures positives suffisant pour nous permettre de comparer les 3 modes de stimulation (**Tableau 2, cadre rouge**). Dans ces trois cas, nous avons observé que la fréquence de microcultures positives est supérieure après une stimulation des PBMC par la protéine MELOE-1 entière ou par le long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆ par rapport à une stimulation avec l'épitope T minimal CD8 MELOE-1₃₆₋₄₄. Cependant, aucune différence n'a été observée entre les stimulations réalisées avec la protéine entière ou avec le long peptide chez le donneur HD32 ou le patient#2, tandis que pour le patient#1, la stimulation avec la protéine entière MELOE-1 semble induire plus efficacement l'amplification de réponses CTL spécifiques. (**Figure 25**).

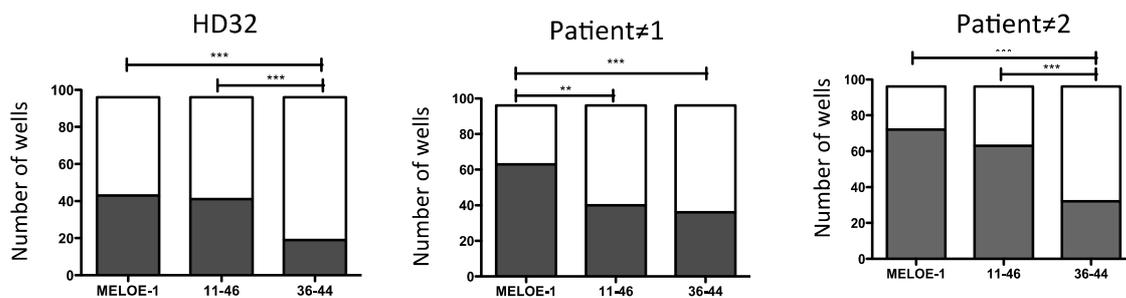


Figure 25 : Nombre de microcultures contenant (partie grise) ou ne contenant pas de lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope MELOE-1₃₆₋₄₄, à l'issue des 14 jours de stimulation avec les différents peptides.

3.2. Réactivité des lymphocytes CD8 spécifiques de l'épitope T MELOE-1₃₆₋₄₄

La réactivité des cellules T CD8 spécifiques de MELOE-1₃₆₋₄₄ vis-à-vis de ce peptide est similaire quelque soit le mode initial de stimulation pour le donneur sain et le patient#1. Pour le patient#2, la réactivité des cellules T CD8 initialement stimulées avec le long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆, semble moins importante que pour les deux autres conditions. Nous avons également observé quelques différences (indiquées en rouge dans le tableau), concernant la réactivité vis-à-vis des lignées de mélanome testées pour les deux patients. En effet, les lymphocytes T CD8 spécifiques générés à partir de la stimulation avec la protéine MELOE-1 ou avec le peptide court MELOE-1₃₆₋₄₄ semblent plus réactifs vis-à-vis de la lignée M113 (38% et 30% respectivement chez le patient#1 et 11% pour le patient#2 ;) que les lymphocytes T

CD8 générés à partir de la stimulation avec le long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆ (7% pour le patient#1 et 2.1% pour le patient#2) (**Tableau 3**). Il semble difficile d'expliquer ce résultat, et il est nécessaire à ce stade d'étendre cette étude à d'autres donneurs et patients, afin de confirmer ou d'infirmer des potentielles différences de réactivité, liées au mode de stimulation.

	HD32			Pt#1			Pt#2		
	+ P	+ M113	+ M170	+ P	+ M113	+ M170	+ P	+ M113	+ M170
MELOE-1	88%	37%	82%	61%	38%	70%	95%	11%	ND
MELOE-1₁₁₋₄₆	85%	31%	79%	60%	7%	49%	64%	2.1%	ND
MELOE1₃₆₋₄₄	92%	19%	84%	71%	30%	61%	79%	11%	ND

Tableau 3 : Réactivité des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope MELOE-1₃₆₋₄₄.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de lymphocytes T CD8 spécifiques produisant du TNF- α après stimulation par des lignées de mélanome HLA-A2 positives et exprimant MELOE-1 (M113 et M170) ou par l'épitope minimal CD8.

3.3. Recherche de lymphocytes T CD4 spécifiques de l'antigène MELOE-1 dans les microcultures stimulées avec MELOE-1 ou MELOE-1₁₁₋₄₆

Afin de déterminer si la plus forte fréquence de cellules T CD8 spécifiques de l'épitope MELOE-1₃₆₋₄₄ observée à l'issue des stimulations avec la protéine MELOE-1 ou le long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆, corrélait avec la présence de lymphocytes T CD4 également spécifiques de la protéine MELOE-1, nous avons restimulé les microcultures du donneur sain HD32 et des patients#1 et #2 avec le pool d'épitopes T CD4 déjà décrits (Bobinet et al., 2012; Rogel et al., 2011) (**Tableau 2**).

Les résultats obtenus montrent qu'aussi bien les stimulations réalisées avec la protéine MELOE-1 qu'avec le long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆ sont capables de générer des réponses T CD4 spécifiques du pool d'épitopes de classe II déjà identifiés. La fréquence des microcultures contenant des lymphocytes T CD4 spécifiques de MELOE-1 semble être plus importante dans la condition de stimulation avec le long peptide suggérant une meilleure capacité du peptide MELOE-1₁₁₋₄₆ à stimuler la prolifération des lymphocytes T CD4

spécifiques de MELOE-1, possiblement liée à un apprêtement plus efficace par les monocytes des PBMC que pour la protéine MELOE-1 (**Figure 26**).

Chez les trois donneur/patients, la restimulation des microcultures avec le pool d'épitopes T CD4 a également mis en évidence l'existence de réponses T CD8 spécifiques, qui se sont avérées être spécifiques de l'épitope MELOE-1₃₆₋₄₄, dont la séquence est entièrement contenue dans les épitopes MELOE-1₃₁₋₄₄ et MELOE-1₃₂₋₄₄, DQ-restreints.

Dans la condition de stimulation avec le long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆, la majorité des lymphocytes T CD4 spécifiques de l'antigène MELOE-1 amplifiés sont présents dans des microcultures qui contiennent également des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope de classe I, et ce chez les trois donneur/patients testés. En ce qui concerne la condition de stimulation avec la protéine MELOE-1 entière, la co-existence de réponses T spécifiques CD4 et CD8 au sein des mêmes microcultures est moins flagrante (surtout pour le donneur sain et le patient#2) suggérant une possible compétition dans l'apprêtement de l'épitope de classe I avec celui des épitopes de classe II à partir de la protéine MELOE-1 entière, qui serait moindre à partir du long peptide (**Figure 26**).

Afin de définir quel(s) épitope(s) T CD4 était(aient) responsable(s) des réponses T CD4 observées, nous avons restimulé les microcultures positives avec chaque épitope T CD4 individuel. Nous avons réussi à déterminer que l'épitope T reconnu par les lymphocytes T CD4 réactifs chez le patient 1 et dans la condition de stimulation utilisant le long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆ correspondait à l'épitope T CD4 MELOE-1₂₄₋₃₇, présenté dans le contexte HLA-DR β 1*1101 (**Figure 26, encadré rouge**). En ce qui concerne les autres patients et conditions, nous n'avons pas pu identifier le ou les épitopes T CD4 reconnus, à cause d'un nombre trop faible de cellules analysées et d'un pourcentage de lymphocytes T CD4 réactifs insuffisant.

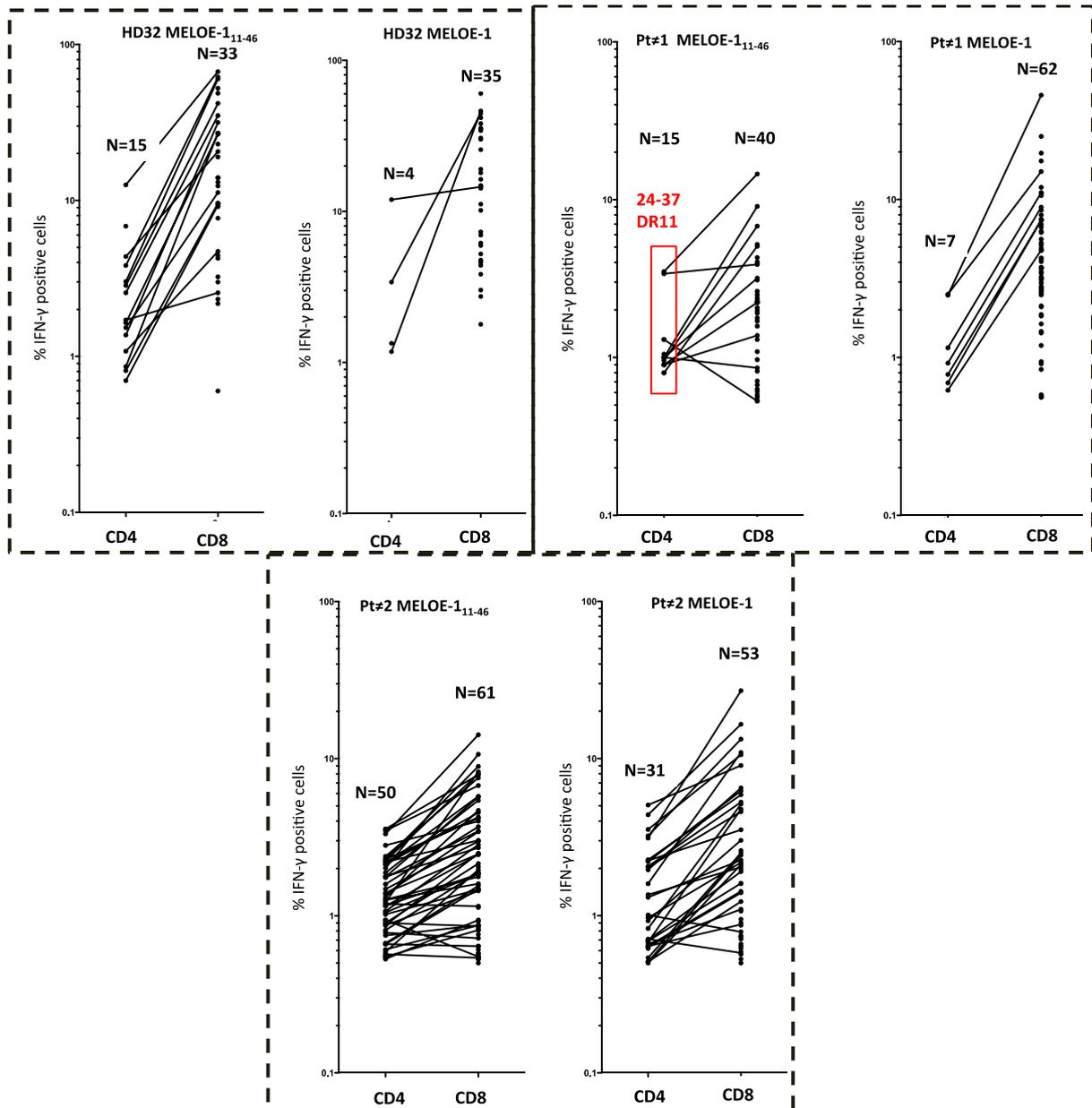


Figure 26 : Pourcentage de lymphocytes T CD4 et T CD8 réactifs au pool d'épitopes T CD4 parmi les microcultures positives. *Chaque point représente une microculture contenant des lymphocytes T spécifiques de MELOE-1 ; les points reliés correspondent à une même microculture.*

4. Conclusion

Ces résultats préliminaires montrent que l'utilisation *in vitro* de la protéine entière MELOE-1 ou du long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆ pour stimuler la prolifération de lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope HLA-A2 semble plus efficace, que l'utilisation du peptide court MELOE-1₃₆₋₄₄ aussi bien chez les donneurs sains que chez les patients porteurs de mélanome. Les lymphocytes T CD8 spécifiques générés dans les différentes conditions de

stimulation s'avèrent être réactifs aussi bien contre l'épitope minimal MELOE-1₃₆₋₄₄ que face à des lignées HLA-A2 positives exprimant l'antigène MELOE-1 bien que des différences de réactivité aient été observées. Néanmoins ces résultats restent à confirmer. Enfin, la protéine MELOE-1 et le long peptide sont également capables de générer des réponses T CD4 spécifiques de l'antigène avec une fréquence qui semble être augmentée dans la condition de stimulation avec le long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆.

Ces résultats devront être confirmés en réalisant des stimulations de PBMC sur un plus large panel de donneurs sains et de patients, et également *in vivo*, dans un modèle murin A2/DR1.

DISCUSSION

Mes travaux de thèse ont conduit à définir d'une part l'immunogénicité de l'antigène MELOE-1 en terme d'épitopes de classe II et d'autre part à définir le promoteur fonctionnel du gène *meloe* ainsi que les mécanismes de régulation transcriptionnelle impliqués dans l'activation de ce promoteur dans les lignées de mélanome. Ces deux aspects de mon travail avaient pour objectif d'établir au mieux la pertinence de l'utilisation de cet antigène en vue d'une stratégie de vaccination thérapeutique utilisant des longs peptides issus de la protéine MELOE-1 chez des patients porteurs de mélanome.

1. Etude des mécanismes impliqués dans la régulation de la transcription du gène *meloe*

Compte-tenu (1) de l'existence d'un épitope T CD8 restreint au contexte de classe I HLA-A*0201, contexte le plus représenté dans la population caucasienne, (2) de l'existence de plusieurs épitopes T CD4 capables de générer des réponses helper de type 1 chez les patients porteurs de mélanome et (3) de l'implication de l'antigène MELOE-1 dans l'immunosurveillance du mélanome, MELOE-1 est une cible attractive dans la mise en place d'une stratégie de vaccination anti-tumorale dans le cadre du mélanome.

Avant d'envisager une telle stratégie, il est important d'étudier très attentivement l'expression tissulaire de ce gène et de comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de cette expression afin de s'assurer que la vaccination utilisant l'antigène MELOE-1 n'induit pas des réponses immunitaires contre des tissus sains.

Dans le travail présenté, nous nous sommes attachés à caractériser les différents mécanismes impliqués dans la régulation transcriptionnelle du gène *meloe*.

1.1. Régulation transcriptionnelle du gène *meloe* par les facteurs de transcription

Il semble clair que les facteurs de transcription SOX9 et/ou SOX10 et CREB sont nécessaires et indispensables à l'activation de la transcription du gène *meloe* dans les lignées

de mélanome. Bien qu'accessoires, deux autres familles de facteurs de transcription participent également à la régulation positive de la transcription de ce gène : les familles de facteurs de transcription AP-1 (Activator Protein-1) et ETS (E-Twenty Six).

Dans la littérature, ces facteurs ou famille de facteurs ont déjà été montrés soit comme ayant une expression restreinte à la lignée mélanique soit comme favorisant l'évolution tumorale. Ainsi, les protéines SOX9 et SOX10, dont l'expression est restreinte à la lignée mélanocytaire, sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes de différenciation mélanocytaire. La famille AP-1, quant à elle, est impliquée dans la régulation de plusieurs mécanismes cellulaires tels que la différenciation et la prolifération cellulaire. Les facteurs de transcription appartenant à cette famille sont souvent surexprimés dans les cancers (Lopez-Bergami et al., 2010). Le facteur ETS-1, membre de la famille ETS, est connu pour réguler positivement le gène *Mcl-1* (Myeloid Cell Leukemia sequence-1) et ainsi favoriser la résistance des cellules de mélanome à l'apoptose (Dong et al., 2011). Enfin, le facteur de transcription ubiquitaire CREB régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans différents mécanismes tels que l'inhibition de l'apoptose, l'induction de la prolifération cellulaire, l'inflammation et la formation de métastases (Mayr and Montminy, 2001). L'implication de l'ensemble de ces facteurs de transcription dans la régulation du gène *meloe* est cohérente avec sa surexpression dans les cellules mélanocytaires saines et tumorales.

Parmi les facteurs et familles de facteurs de transcription précédemment cités, CREB et certains membres de la famille AP-1, c-Jun et c-Fos, sont connus comme pouvant recruter un complexe protéique capable d'induire des modifications épigénétiques.

En effet, il a été montré que les protéines CREB, c-Jun et c-Fos pouvaient recruter le complexe de facteurs co-activateurs CBP/P300 (CREB Binding Protein/P300) en interagissant avec ses domaines de transactivation (Bannister and Kouzarides, 1995; Bannister et al., 1995; Chrivia et al., 1993). L'interaction du complexe CBP/P300 avec des facteurs de transcription contribue à l'activation de la transcription en faisant un pont entre les facteurs de transcription recrutés et la machinerie transcriptionnelle. Par ailleurs, le complexe CBP/P300 possède également une activité HAT intrinsèque qui conduit à l'acétylation des histones présents à proximité des promoteurs où il est recruté (Ogryzko et al., 1996).

Le facteur de transcription CREB étant indispensable à l'expression de *meloe*, nous pouvons envisager que ce facteur recrute le complexe CBP/P300 sur la région promotrice. Ce dernier pourrait alors jouer un rôle de transactivateur ou encore acétyler les histones présentes au niveau de la région promotrice du gène *meloe* et ainsi conférer à la chromatine une structure favorable à la transcription du gène. Cette hypothèse peut également s'appliquer au facteur de transcription de la famille AP-1 recruté sur le promoteur (**Figure 27**).

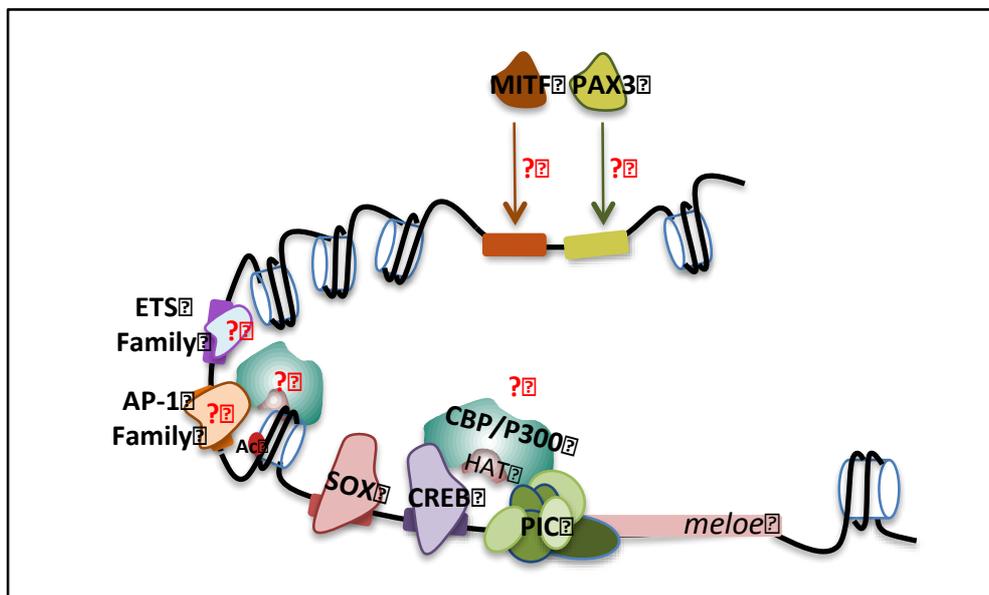


Figure 27 : Facteurs de transcription impliqués dans l'activation du gène *meloe* et modes d'action envisagés

Il sera donc intéressant de déterminer si le complexe CBP/P300 est recruté par le facteur de transcription CREB mais également par le facteur de transcription de la famille AP-1. S'il s'avère que ce complexe est recruté par ces facteurs de transcription, nous étudierons l'état d'acétylation des histones à proximité du nucléotide +1 afin de documenter une corrélation possible entre cet état d'acétylation et l'expression du gène *meloe*.

Il est donc possible qu'il existe un niveau de régulation supplémentaire du gène *meloe* par l'acétylation des histones qui pourrait contribuer à expliquer la différence d'expression de l'ARN messager *meloe* observée entre les différentes lignées de mélanome.

En ce qui concerne les sites putatifs de fixation des facteurs de transcription MITF et PAX3 présents dans la région promotrice étudiée, leur mutation n'a affecté en rien l'activation de la transcription du gène *meloe*. Cependant, l'analyse *in silico* de la région promotrice élargie a mis en évidence d'autres sites de fixation putatifs pour les facteurs MITF et PAX3 (**figure 27**). Il n'est donc pas exclu que ces facteurs soient impliqués dans l'activation du gène, ce qui semblerait cohérent avec son profil d'expression tissulaire. Nous réévaluerons donc leur implication en utilisant des facteurs de transcription de type « dominant-négatifs » dans un système de gène-rapporteur. Par ce type d'approche nous pourrions documenter leur potentielle implication dans l'activation du gène *meloe*, sans préjuger de leur site de fixation, notamment pour PAX3 qui ne possède pas de séquence consensus clairement établie. Si tel est le cas, nous validerons leur fixation sur la région promotrice du gène *meloe in vivo* par immunoprécipitation de chromatine (ChIP).

1.2. Régulation transcriptionnelle du gène *meloe* par méthylation de l'ADN

Nous avons montré que le facteur de transcription ubiquitaire CREB sous sa forme active (P-CREB) était présent aussi bien dans les lignées de mélanome que dans les lignées de mésothéliome ou de cancer du colon. Cependant, dans les lignées de mésothéliome et de cancers colorectaux, nous avons également montré que P-CREB ne se fixait pas sur le promoteur du gène *meloe*.

De par la présence d'un dinucléotide CpG dans le site de fixation à l'ADN reconnu par le facteur de transcription CREB, nous nous sommes intéressés au statut de méthylation du promoteur du gène *meloe*. La séquence promotrice étudiée montre la présence de 26 CpG qui se sont avérés quasiment tous déméthylés dans les lignées de mélanomes et les mélanocytes testés. A l'inverse, dans les lignées de mésothéliome ainsi que dans les lignées de cancer du colon, la quasi totalité des dinucléotides CpG sont méthylés dont celui présent dans le site de fixation du facteur de transcription CREB. Ainsi, la transcription du gène *meloe* est également régulée par le statut de méthylation de sa région promotrice, hyperméthylée dans les lignées non mélaniques, prévenant ainsi la fixation des facteurs activant sa transcription.

La région analysée dans cette première étude couvre environ 800 paires de base

autour du nucléotide +1 (-270 +563). Ces premiers résultats ne permettent pas de savoir si l'hypométhylation observée dans les lignées de mélanome et les mélanocytes est un défaut de méthylation général du locus du gène *meloe* ou bien si cette hypométhylation est localisée uniquement au niveau de la région promotrice du gène.

Les dinucléotides CpG étudiés dans la séquence promotrice du gène *meloe* ne font pas partie des îlots CpG prédits dans ce locus (critères de prédiction : pourcentage de GC > 50% de la séquence étudiée ; longueur de la séquence étudiée > 100 paires de base) (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/>). Le statut de méthylation des îlots CpG est considéré comme représentatif du niveau de méthylation global d'un locus.

L'étude du statut de méthylation de ces îlots permettra donc de rendre compte de l'état général de méthylation du locus du gène *meloe* dans des mélanocytes, des lignées de mélanome mais également dans d'autres types de lignées tumorales. Dans l'étude que nous avons menée, seuls deux îlots ont été explorés, les îlots A' et B', situés en aval du nucléotide +1 (**Figure 28**). Afin de compléter cette étude, nous étudierons les îlots CpG présents dans le gène (C') mais également ceux situés en amont (A et B) et en aval du gène (D') (**Figure 28**).

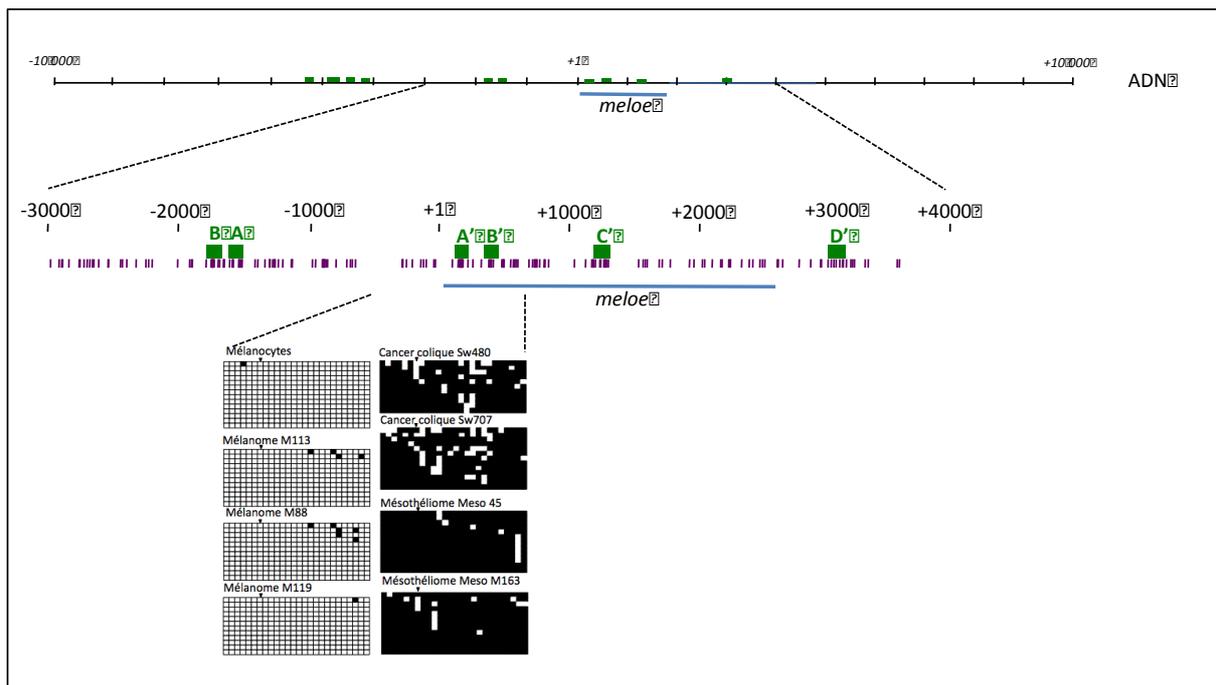


Figure 28 : Représentation schématique des dinucléotides CpG (traits violets) et des îlots CpG (rectangles verts) présents dans le locus du gène *meloe* (trait bleu) ainsi que du statut de méthylation de la région promotrice étudiée.

Si l'hypométhylation observée est localisée uniquement au niveau de la région promotrice du gène *meloe*, cela sous-entendra que les enzymes responsables de la méthylation ne peuvent pas accéder à l'ADN à cet endroit précis. On peut alors supposer qu'en occupant la région promotrice, l'ensemble des facteurs nécessaires à la transcription du gène empêche l'accès à l'ADN aux DNMT, maintenant ainsi le statut d'hypométhylation de cette région dans les lignées mélanocytaires, comme cela a été suggéré pour le gène *MAGE-A1* (De Smet et al., 2004).

Dans l'optique de rétablir l'expression endogène du transcrit *meloe*, nous avons utilisé un agent déméthylant (5-aza-déoxycytidine) sur des lignées de mésothéliome que nous avons ensuite transfectées avec un vecteur d'expression codant le facteur SOX10. Cependant, bien que l'efficacité de la transfection et du traitement hypométhylant ait été validée, respectivement par RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) et par l'induction de l'expression du gène NY-ESO-1, aucune augmentation du niveau de

transcription du gène *meloe* n'a été observée en RT-qPCR (quantitative PCR). Il est possible que la cinétique de déméthylation suite au traitement déméthylant est différente pour les gènes *meloe* et *NY-ESO-1*, et donc que le traitement n'ait pas été optimal dans le cas du gène *meloe*. Une autre hypothèse serait qu'il existe d'autres mécanismes de régulation de l'expression du gène *meloe* non découverts à ce jour, tels que des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle, dans les lignées non mélaniques.

1.3. Régulation post-transcriptionnelle

Si la régulation du niveau de transcription des différents gènes joue un rôle essentiel dans l'expression ou non de certaines protéines, la demi-vie des ARNm, c'est à dire leur stabilité, va également être un élément clef du niveau de traduction et donc d'expression de ces protéines. Parmi les mécanismes impliqués dans la non persistance d'un ARNm au sein d'une cellule, les micro-ARN jouent un rôle essentiel.

Les micro-ARN sont des petits ARN non codant d'une taille comprise entre 17 et 25 paires de base et qui, associés au complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex), peuvent réguler négativement l'expression de gènes au niveau post-transcriptionnel en s'hybridant à la région 3' non traduite (3'UTR) de l'ARN ciblé provoquant ainsi sa dégradation ou inhibant sa traduction.

Récemment, il a été montré que l'expression aberrante de certains micro-ARN serait impliquée dans la régulation de l'expression de certains antigènes de mélanome. Par exemple, la transfection du micro-ARN miR-203 dans des cellules de mélanome Mewo résulte en une hyperpigmentation des cellules avec une augmentation significative de l'expression de l'antigène Tyrosinase (Noguchi et al., 2013). Ce miRNA cible les protéines de la famille des kinésines, impliquées dans la migration des mélanosomes. Le mode d'action des kinésines sur la régulation de l'expression du gène *tyrosinase* est encore inconnu (Noguchi et al., 2013). A l'inverse, la diminution de l'expression du micro-ARN-211 dans les cellules de mélanome par rapport aux mélanocytes normaux, semble corrélérer avec une expression accrue de l'antigène PRAME. En effet, l'analyse *in silico* de la région 3'UTR du gène *prame* montre que ce dernier est une cible potentielle du micro-ARN-211. De plus, des

expériences de gène-rapporteur utilisant un vecteur contenant la région 3'UTR du gène *prame* mutée ou non dans la séquence reconnue par le miARN-211 ont également montré que le miARN-211 ciblait ce transcrit (Sakurai et al., 2011).

Il est donc envisageable que l'expression du gène *meloe* soit également directement régulée par des miRNA préférentiellement exprimés dans les lignées non mélaniques, ou encore que cette expression soit indirectement régulée par des miRNA qui cibleraient des protéines inhibant son expression dans les lignées mélaniques. L'analyse *in silico* de la région 3'UTR du gène *meloe* a révélé des sites potentiels de fixation pour certains miRNA. La transfection de ces miRNAs avec un gène rapporteur comportant la région 3'UTR de *meloe* mutée ou non, nous permettra d'en évaluer la pertinence.

La régulation transcriptionnelle ne semble pas le seul mécanisme impliqué dans l'expression de l'antigène MELOE-1. En effet, les niveaux d'expression du messenger *meloe* sont équivalents entre les mélanomes et les mélanocytes, mais seules les lignées de mélanomes sont capables d'activer des lymphocytes T spécifiques de l'antigène MELOE-1 (Godet et al., 2008). Ceci suggère l'existence de mécanismes de régulation au niveau traductionnel.

Une étude menée dans l'équipe a montré très récemment que la traduction de la protéine MELOE-1 à partir de l'ARN messenger *meloe* était sous le contrôle d'une séquence IRES (Internal Ribosomal Entry Site) (Carbannelle et al., 2013). La grande majorité des ARN messenger utilise la voie classique de la traduction dépendante de la coiffe, mais une minorité d'ARN messenger cellulaires utilise des voies d'initiation de la traduction non conventionnelles, dont font parties les séquences IRES. Identifiées à l'origine comme un système de traduction utilisé par les virus, ces séquences ARN sont situées en 5' du codon d'initiation de la traduction et permettent le recrutement du ribosome de manière indépendante de la coiffe. La majorité des IRES cellulaires identifiées chez les eucaryotes sont associées à la régulation de l'expression des gènes durant le développement, la différenciation, le cycle cellulaire, la croissance cellulaire, l'apoptose ou le stress (Stoneley and Willis, 2004).

Les résultats obtenus dans l'équipe permettent d'émettre l'hypothèse que la différence de reconnaissance des mélanomes et des mélanocytes par des lymphocytes T

spécifiques de l'antigène MELOE-1 serait due à une différence de disponibilité de protéines ITAF (IRES Trans-Acting Factors) nécessaires à l'activation des séquences IRES, et potentiellement surexprimées dans un contexte tumoral (Carbonnelle et al., 2013).

1.4. Conclusion

La régulation de la transcription du gène *meloe* par les facteurs de transcription spécifiques de la lignée mélanocytaire SOX9 et/ou SOX10 d'une part, et par le statut de méthylation de sa région promotrice spécifiquement hypométhylé dans la lignée mélanocytaire d'autre part, assure une expression de l'antigène MELOE-1 restreinte à la lignée mélanique. De plus, la reconnaissance exclusive des mélanomes par des lymphocytes T spécifiques de MELOE-1, et le mode de traduction de l'antigène MELOE-1, dépendant d'une séquence IRES, suggèrent une régulation traductionnelle de cette protéine différente dans les mélanocytes et leur contrepartie tumorale.

Ainsi, la restriction de l'expression de l'ARN messenger *meloe* à la lignée mélanocytaire, et de la protéine MELOE-1 aux cellules de mélanome, permet d'envisager l'utilisation de cet antigène dans le cadre d'une vaccination thérapeutique chez des patients porteurs de mélanome.

2. Etude de l'immunogénicité de l'antigène MELOE-1 chez les donneurs sains et les patients porteurs de mélanome

Il est maintenant clairement établi que le mélanome est un des cancers les plus immunogènes. La découverte de nombreux antigènes de mélanome a permis de développer différentes stratégies d'immunothérapie. Les premiers essais de vaccination thérapeutique peptidique se sont avérés peu efficaces aussi bien sur le plan immunologique que clinique. Parallèlement, l'importance du help CD4 dans la génération de réponses immunes persistantes a été mise en exergue. La conception des vaccins peptidiques a par conséquent évolué vers l'utilisation de longs peptides synthétiques contenant à la fois des épitopes T CD8 et T CD4 et les premiers résultats obtenus sont plutôt encourageants.

2.1. Caractérisation d'épitopes T CD4 présents dans l'antigène MELOE-1 capables de stimuler des réponses T CD4 helper

Durant ma thèse, nous avons isolé différents clones T CD4 spécifiques des différentes régions de la protéine MELOE-1 qui nous ont permis d'identifier de nouveaux épitopes T CD4 en plus des deux déjà décrits : l'épitope T MELOE-1₇₋₁₉ reconnu dans le contexte HLA-DQβ1*0202, l'épitope T MELOE-1₁₅₋₂₇ reconnu dans le contexte HLA-DRβ1*1101, l'épitope T MELOE-1₃₁₋₄₄ restreint au contexte HLA-DQβ1*0202 et l'épitope T MELOE-1₁₁₋₂₃ restreint au contexte HLA-DRβ1*0101. Le profil cytokinique de l'ensemble de ces clones T CD4 est de type Th1, profil favorable à la génération d'une réponse anti-tumorale efficace. Cependant, le profil cytokinique d'une population clonale T donnée n'est pas forcément représentatif des réponses T CD4 globales générées *in vitro*, du fait des multiples étapes de sélection et d'amplification *in vitro* nécessaires à l'obtention de clones T. Il est donc important de regarder la qualité de la réponse T CD4 spécifique retrouvée après stimulation au niveau polyclonal.

2.2. Immunogénicité de la protéine MELOE-1 en termes de réponses T CD4

Nous avons montré que la protéine MELOE-1 était capable de générer des réponses T CD4 spécifiques de différentes régions de la protéine chez des donneurs sains. Il s'est avéré que la région centrale de la protéine appelée MELOE-1₁₁₋₃₀ était particulièrement immunogène puisque des réponses T CD4 spécifiques de cette région ont été générées chez la totalité des donneurs sains testés. Nous avons ensuite cherché à savoir si la protéine MELOE-1 était également immunogène chez des patients porteurs de mélanome. Les résultats ont montré que les stimulations utilisant la protéine MELOE-1 étaient capables de générer des réponses T CD4 chez la totalité des patients testés et que la majorité de ces réponses était caractérisée par un profil helper de type 1, favorable à une réponse anti-tumorale efficace.

Dans la stratégie de vaccination anti-tumorale utilisant des longs peptides, l'induction de lymphocytes T CD4 helper de type 1 est particulièrement recherchée. A l'inverse, la génération de lymphocytes T régulateurs est délétère à la réponse anti-tumorale. En effet, alors que leur action est plutôt recherchée dans certaines pathologies comme les maladies auto-immunes, ces cellules sont associées, dans un contexte tumoral, à la suppression de la réponse anti-tumorale à travers l'induction de la tolérance immunitaire.

Des études menées chez l'homme ont identifié des cellules T régulatrices spécifiques d'antigènes de tumeur comme MLANA, TYRP-1, GP100 (Jandus et al., 2009; Vence et al., 2007). De plus, certains épitopes T CD4 capables d'activer des lymphocytes Th1 sont également capables de stimuler des cellules T régulatrices comme cela a déjà été montré pour les antigènes NY-ESO-1 et TRAG-3 (Taxol Resistance Associated Gene-3) (Fourcade et al., 2010). Plus récemment, des études ont montré que des patients porteurs de mélanome métastatique présentaient une plus forte fréquence de lymphocytes T régulateurs dans le sang par rapport à des patients présentant un mélanome résiduel et que, suite à une vaccination utilisant la protéine recombinante NY-ESO-1, ces patients montraient une induction de réponses T CD4 et T CD8 spécifiques plus faible (Nicholaou et al., 2009). Une analyse extensive des réponses T CD4 spécifiques de l'antigène NY-ESO-1 avant et après la vaccination a montré l'existence, aussi bien dans le sang que dans le tissu tumoral, de

lymphocytes T régulateurs spécifiques de différents épitopes T CD4 présents au sein de la protéine NY-ESO-1 et que cette vaccination stimulait ces cellules T régulatrices spécifiques de l'antigène NY-ESO-1 chez les patients porteurs de mélanome avancé (Ebert et al., 2012).

Ainsi, dans l'optique d'une stratégie de vaccination utilisant de longs peptides, il est important d'étudier au mieux le phénotype des réponses T CD4 générés *in vitro* mais aussi *in vivo* afin de s'assurer que les réponses T générées par la vaccination présentent un profil de type Th1 majoritaire et non T régulateur. Dans ce but, dans le cadre d'une collaboration avec une équipe Inserm de Besançon (O. Adotevi et Y. Godet), les réponses T CD4 induites par une immunisation à l'aide de longs peptides dérivés de MELOE-1 seront caractérisées dans un modèle de souris transgéniques A2/DR1,.

2.3. Stratégies envisagées dans la conception du vaccin

Compte tenu de sa petite taille (46 acides aminés), l'utilisation de l'antigène MELOE-1 dans sa globalité peut être envisagée pour une vaccination peptidique, bien qu'elle soit supérieure à celles des longs peptides (25 à 35 acides aminés) utilisés jusqu'alors en vaccination thérapeutique. Afin d'évaluer *in vitro* la longueur optimale de peptide permettant la meilleure amplification de réponses T CD8 spécifiques de l'antigène MELOE-1, nous avons stimulé des PBMC de donneurs sains et de patients avec soit le peptide court correspondant à l'épitope T CD8 MELOE-1₃₆₋₄₄, soit avec le long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆, soit avec la protéine MELOE-1 entière.

Les résultats préliminaires ont montré que la protéine entière et le long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆ étaient plus efficaces que le peptide minimal pour induire *in vitro* des réponses T CD8 spécifiques de l'épitope HLA-A2. Cependant aucune différence significative n'a été observée entre la fréquence des réponses T CD8 générés avec la protéine entière et celle obtenue avec le long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆.

L'analyse des réponses T CD4 générées a montré que, dans la condition de stimulation avec le long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆, la quasi totalité des réponses T CD4 spécifiques se trouvaient dans des microcultures contenant également de réponses T CD8 spécifiques de l'épitope T MELOE-1₃₆₋₄₄, ce qui n'est pas le cas avec la protéine MELOE-1

entière. L'apprêtement des différents épitopes T semble donc plus efficace à partir du long peptide MELOE-1₁₁₋₄₆.

Une étude menée par Zhang *et coll* a montré que les réponses T induites après vaccination avec une protéine antigénique issue du HIV étaient majoritairement spécifiques des épitopes T immunodominants tandis que celles générées à partir d'une vaccination utilisant un mélange de SLP chevauchants de 24 acides aminés couvrant la globalité de la protéine étaient aussi bien spécifiques des épitopes T immunodominants que sous-dominants et que par conséquent un plus large répertoire T spécifique était activé (Rosario et al., 2010; Zhang et al., 2009a). De plus, dans ce modèle il s'avère que non seulement l'apprêtement des épitopes est plus efficace avec des SLP mais que l'internalisation par les cellules dendritiques est également de meilleure qualité (Zhang et al., 2009a).

Les différents résultats que nous avons observés ainsi que les données de la littérature penchent en faveur d'une meilleure efficacité dans la génération de réponses T avec une vaccination utilisant des longs peptides. Ces observations devront être confirmées *in vitro* puis validées *in vivo* dans un modèle murin avant d'envisager l'utilisation d'un long peptide dérivé de l'antigène MELOE-1 en vaccination anti-tumorale chez des patients porteurs de mélanome (**Figure 29**).

Enfin, la vaccination d'un patient porteur de cancer de la prostate avec un long peptide hybride contenant à la fois un épitope T CD8 et T CD4 issu de l'antigène MAGE-A4 reliés entre eux par un linker neutre a donné des résultats immunologiques et cliniques très encourageants (Takahashi et al., 2012). On peut envisager une amélioration de cette stratégie en utilisant un linker contenant un site de clivage pour une protéase cellulaire afin d'améliorer l'apprêtement des épitopes T par les cellules dendritiques (**Figure 29**).

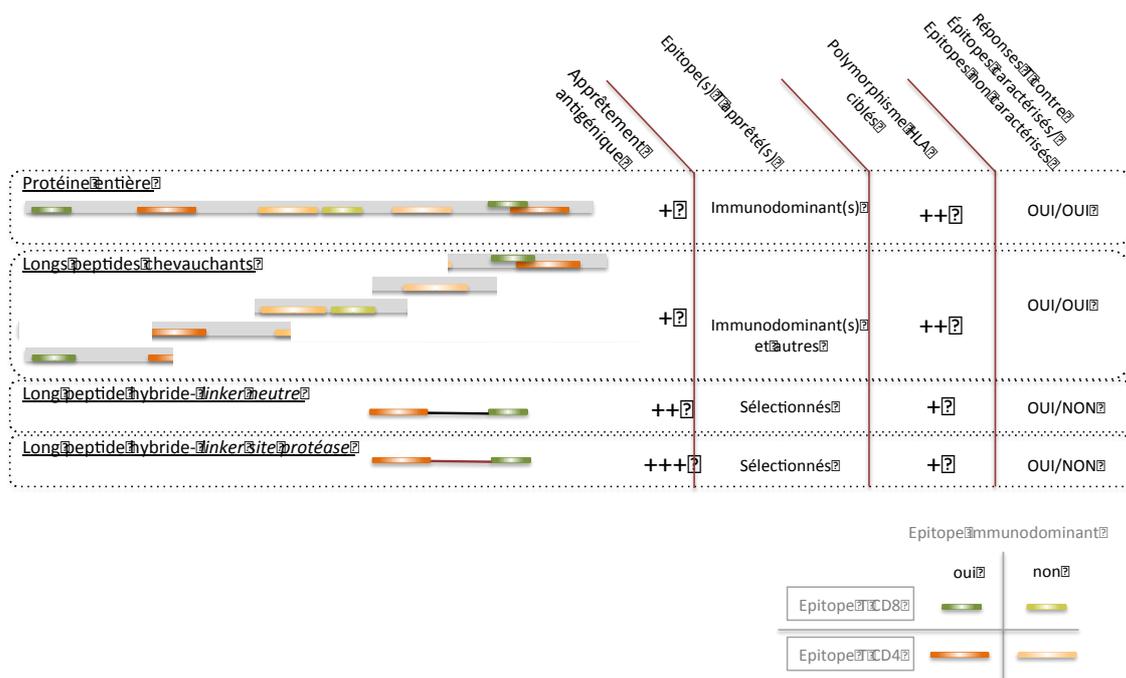


Figure 29 : Avantages et inconvénients de différents types de SLP pour une vaccination thérapeutique

2.4. Conclusion

L'antigène MELOE-1 possède tout au long de sa séquence des épitopes T CD4 qui stimulent des réponses T helper de type 1 *in vitro*. Toujours *in vitro*, la stimulation de PBMC avec un long peptide issu de l'antigène MELOE-1₁₁₋₄₆ semble plus efficace que le peptide court MELOE-1₃₆₋₄₄ pour induire des réponses T CD8 spécifiques de l'épitope MELOE-1₃₆₋₄₄ et meilleur que la protéine entière pour l'induction de réponses T CD4 de type 1. Ces résultats devront être confirmés *in vitro* et également *in vivo* dans un modèle murin. L'utilisation de ce modèle murin nous permettra également de tester le potentiel anti-tumoral d'une vaccination ciblant l'antigène MELOE-1, en utilisant des cellules du mélanome murin B16, exprimant la molécule HLA-A2 et l'antigène MELOE-1.

L'ensemble de mes résultats sur la régulation transcriptionnelle du gène meloe ainsi que les résultats récents obtenus dans l'équipe sur la traduction de MELOE-1 suggèrent que l'expression de cet antigène est restreinte aux cellules de mélanome. De plus, son immunogénicité aussi bien en termes d'épitopes de classe I que de classe II, permet d'envisager de cibler l'antigène MELOE-1 dans une stratégie de vaccination thérapeutique avec de longs peptides chez des patients porteurs de mélanome.

BIBLIOGRAPHIE

A

Ackerman, A.L., Giodini, A., and Cresswell, P. (2006). A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 25, 607-617.

Afkarian, M., Sedy, J.R., Yang, J., Jacobson, N.G., Cereb, N., Yang, S.Y., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nature immunology* 3, 549-557.

Agarwal, A., Verma, S., Burra, U., Murthy, N.S., Mohanty, N.K., and Saxena, S. (2006). Flow cytometric analysis of Th1 and Th2 cytokines in PBMCs as a parameter of immunological dysfunction in patients of superficial transitional cell carcinoma of bladder. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 55, 734-743.

Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature reviews Cancer* 7, 834-846.

Aksan, I., and Goding, C.R. (1998). Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements in vitro and in vivo. *Molecular and cellular biology* 18, 6930-6938.

Albert, M.L., Pearce, S.F., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L., and Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 188, 1359-1368.

Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51, 786-794.

Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P., and Becker, J.C. (2006). Cytotoxic T cells. *The Journal of investigative dermatology* 126, 32-41.

Arnold-Schild, D., Hanau, D., Spehner, D., Schmid, C., Rammensee, H.G., de la Salle, H., and Schild, H. (1999). Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 162, 3757-3760.

Arpaia, N., Cassano, N., and Vena, G.A. (2006). Regressing cutaneous malignant melanoma and vitiligo-like depigmentation. *International journal of dermatology* 45, 952-956.

Azzola, M.F., Shaw, H.M., Thompson, J.F., Soong, S.J., Scolyer, R.A., Watson, G.F., Colman, M.H., and Zhang, Y. (2003). Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. *Cancer* 97, 1488-1498.

B

Bachmann, M.F., Wolint, P., Walton, S., Schwarz, K., and Oxenius, A. (2007). Differential role of IL-2R signaling for CD8+ T cell responses in acute and chronic viral infections. *European journal of immunology* *37*, 1502-1512.

Badovinac, V.P., Messingham, K.A., Griffith, T.S., and Harty, J.T. (2006). TRAIL deficiency delays, but does not prevent, erosion in the quality of "helpless" memory CD8 T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *177*, 999-1006.

Bakker, A.B., Schreurs, M.W., de Boer, A.J., Kawakami, Y., Rosenberg, S.A., Adema, G.J., and Figdor, C.G. (1994). Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* *179*, 1005-1009.

Bakos, R.M., Maier, T., Besch, R., Mestel, D.S., Ruzicka, T., Sturm, R.A., and Berking, C. (2010). Nestin and SOX9 and SOX10 transcription factors are coexpressed in melanoma. *Experimental dermatology* *19*, e89-94.

Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Soong, S.J., Thompson, J.F., Atkins, M.B., Byrd, D.R., Buzaid, A.C., Cochran, A.J., Coit, D.G., Ding, S., *et al.* (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *27*, 6199-6206.

Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (1995). CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *The EMBO journal* *14*, 4758-4762.

Bannister, A.J., Oehler, T., Wilhelm, D., Angel, P., and Kouzarides, T. (1995). Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro. *Oncogene* *11*, 2509-2514.

Belz, G.T., Wodarz, D., Diaz, G., Nowak, M.A., and Doherty, P.C. (2002). Compromised influenza virus-specific CD8(+)-T-cell memory in CD4(+)-T-cell-deficient mice. *Journal of virology* *76*, 12388-12393.

Bendle, G.M., Linnemann, C., Hooijkaas, A.I., Bies, L., de Witte, M.A., Jorritsma, A., Kaiser, A.D., Pouw, N., Debets, R., Kieback, E., *et al.* (2010). Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nature medicine* *16*, 565-570, 561p following 570.

Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Flavell, R.A., Miller, J.F., and Heath, W.R. (1998a). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* *393*, 478-480.

Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Miller, J.F., and Heath, W.R. (1997). Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *The Journal of experimental medicine* *186*, 65-70.

Bennett, S.R., Carbone, F.R., Toy, T., Miller, J.F., and Heath, W.R. (1998b). B cells directly tolerize CD8(+) T cells. *The Journal of experimental medicine* 188, 1977-1983.

Bentley, N.J., Eisen, T., and Goding, C.R. (1994). Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Molecular and cellular biology* 14, 7996-8006.

Bertolotto, C., Busca, R., Abbe, P., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1998). Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Molecular and cellular biology* 18, 694-702.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.

Bevan, M.J. (2004). Helping the CD8(+) T-cell response. *Nature reviews Immunology* 4, 595-602.

Bijker, M.S., van den Eeden, S.J., Franken, K.L., Melief, C.J., Offringa, R., and van der Burg, S.H. (2007). CD8+ CTL priming by exact peptide epitopes in incomplete Freund's adjuvant induces a vanishing CTL response, whereas long peptides induce sustained CTL reactivity. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 179, 5033-5040.

Bijker, M.S., van den Eeden, S.J., Franken, K.L., Melief, C.J., van der Burg, S.H., and Offringa, R. (2008). Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation. *European journal of immunology* 38, 1033-1042.

Bobinet, M., Vignard, V., Rogel, A., Khammari, A., Dreno, B., Lang, F., and Labarriere, N. (2012). MELOE-1 antigen contains multiple HLA class II T cell epitopes recognized by Th1 CD4+ T cells from melanoma patients. *PLoS one* 7, e51716.

Boel, P., Wildmann, C., Sensi, M.L., Brasseur, R., Renauld, J.C., Coulie, P., Boon, T., and van der Bruggen, P. (1995). BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 2, 167-175.

Bolander, A., Agnarsdottir, M., Stromberg, S., Ponten, F., Hesselius, P., Uhlen, M., and Bergqvist, M. (2008). The protein expression of TRP-1 and galectin-1 in cutaneous malignant melanomas. *Cancer genomics & proteomics* 5, 293-300.

Bondurand, N., Pingault, V., Goerich, D.E., Lemort, N., Sock, E., Le Caignec, C., Wegner, M., and Goossens, M. (2000). Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Human molecular genetics* 9, 1907-1917.

Bourgeois, C., Rocha, B., and Tanchot, C. (2002). A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science (New York, NY)* 297, 2060-2063.

Bradish, J.R., Montironi, R., Lopez-Beltran, A., Post, K.M., MacLennan, G.T., and Cheng, L. (2013). Towards personalized therapy for patients with malignant melanoma: molecular insights into the biology of BRAF mutations. *9*, 245-253.

Brasseur, F., Rimoldi, D., Lienard, D., Lethe, B., Carrel, S., Arienti, F., Suter, L., Vanwijck, R., Bourlond, A., Humblet, Y., *et al.* (1995). Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* *63*, 375-380.

Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Wolfel, C., De Plaen, E., Lethe, B., Coulie, P., and Boon, T. (1993). The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *The Journal of experimental medicine* *178*, 489-495.

Brocker, T., and Karjalainen, K. (1995). Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* *181*, 1653-1659.

Bruniquel, D., and Schwartz, R.H. (2003). Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nature immunology* *4*, 235-240.

Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research* *13*, 1-27.

C

Campbell, D.J., and Koch, M.A. (2011). Treg cells: patrolling a dangerous neighborhood. *Nature medicine* *17*, 929-930.

Cannuyer, J., Lorient, A., Parvizi, G.K., and De Smet, C. (2013). Epigenetic hierarchy within the MAGEA1 cancer-germline gene: promoter DNA methylation dictates local histone modifications. *PloS one* *8*, e58743.

Cao, X., Leonard, K., Collins, L.I., Cai, S.F., Mayer, J.C., Payton, J.E., Walter, M.J., Pivnicka-Worms, D., Schreiber, R.D., and Ley, T.J. (2009). Interleukin 12 stimulates IFN-gamma-mediated inhibition of tumor-induced regulatory T-cell proliferation and enhances tumor clearance. *Cancer research* *69*, 8700-8709.

Carbonnelle, D., Vignard, V., Sehedic, D., Moreau-Aubry, A., Florenceau, L., Charpentier, M., Mikulits, W., Labarriere, N., and Lang, F. (2013). The Melanoma Antigens MELOE-1 and MELOE-2 Are Translated from a Polycistronic mRNA Containing Functional IRES Sequences. *PloS one* *8*, e75233.

Casares, N., Lasarte, J.J., de Cerio, A.L., Sarobe, P., Ruiz, M., Melero, I., Prieto, J., and Borrascua, F. (2001). Immunization with a tumor-associated CTL epitope plus a tumor-related or unrelated Th1 helper peptide elicits protective CTL immunity. *European journal of immunology* *31*, 1780-1789.

Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., and Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *The Journal of experimental medicine* *184*, 747-752.

Chapiro, J., Claverol, S., Piette, F., Ma, W., Stroobant, V., Guillaume, B., Gairin, J.E., Morel, S., Burlet-Schiltz, O., Monsarrat, B., *et al.* (2006). Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) *176*, 1053-1061.

Chapman, H.A. (1998). Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Current opinion in immunology* *10*, 93-102.

Chen, J.G., Xia, J.C., Liang, X.T., Pan, K., Wang, W., Lv, L., Zhao, J.J., Wang, Q.J., Li, Y.Q., Chen, S.P., *et al.* (2011). Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients. *International journal of biological sciences* *7*, 53-60.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* *198*, 1875-1886.

Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L.J. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 1914-1918.

Chen, Z., Laurence, A., Kanno, Y., Pacher-Zavisin, M., Zhu, B.M., Tato, C., Yoshimura, A., Hennighausen, L., and O'Shea, J.J. (2006). Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 8137-8142.

Chen, Z.X., and Riggs, A.D. (2011). DNA methylation and demethylation in mammals. *The Journal of biological chemistry* *286*, 18347-18353.

Chin, Y.E., Kitagawa, M., Kuida, K., Flavell, R.A., and Fu, X.Y. (1997). Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Molecular and cellular biology* *17*, 5328-5337.

Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R., and Goodman, R.H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* *365*, 855-859.

Clemente, C.G., Mihm, M.C., Jr., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., and Cascinelli, N. (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* *77*, 1303-1310.

Cook, A.L., Smith, A.G., Smit, D.J., Leonard, J.H., and Sturm, R.A. (2005). Co-expression of SOX9 and SOX10 during melanocytic differentiation in vitro. *Experimental cell research* 308, 222-235.

Coral, S., Parisi, G., Nicolay, H.J., Colizzi, F., Danielli, R., Fratta, E., Covre, A., Taverna, P., Sigalotti, L., and Maio, M. (2013). Immunomodulatory activity of SGI-110, a 5-aza-2'-deoxycytidine-containing demethylating dinucleotide. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 62, 605-614.

Corre, S., Primot, A., Sviderskaya, E., Bennett, D.C., Vaulont, S., Goding, C.R., and Galibert, M.D. (2004). UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *The Journal of biological chemistry* 279, 51226-51233.

Corry, G.N., and Underhill, D.A. (2005). Pax3 target gene recognition occurs through distinct modes that are differentially affected by disease-associated mutations. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 18, 427-438.

Corthay, A., Skovseth, D.K., Lundin, K.U., Rosjo, E., Omholt, H., Hofgaard, P.O., Haraldsen, G., and Bogen, B. (2005). Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity* 22, 371-383.

Coughlin, C.M., Salhany, K.E., Gee, M.S., LaTemple, D.C., Kotenko, S., Ma, X., Gri, G., Wysocka, M., Kim, J.E., Liu, L., *et al.* (1998). Tumor cell responses to IFN γ affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity* 9, 25-34.

Coulie, P.G., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., Szikora, J.P., *et al.* (1994). A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *The Journal of experimental medicine* 180, 35-42.

Coulie, P.G., Lehmann, F., Lethe, B., Herman, J., Lurquin, C., Andrawiss, M., and Boon, T. (1995). A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7976-7980.

Curiel, T.J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Krzysiek, R., Knutson, K.L., Daniel, B., Zimmermann, M.C., *et al.* (2003). Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nature medicine* 9, 562-567.

D

Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J., and Shevach, E.M. (2007). Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 178, 4022-4026.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., *et al.* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954.

de la Serna, I.L., Ohkawa, Y., Higashi, C., Dutta, C., Osias, J., Kommajosyula, N., Tachibana, T., and Imbalzano, A.N. (2006). The microphthalmia-associated transcription factor requires SWI/SNF enzymes to activate melanocyte-specific genes. *The Journal of biological chemistry* 281, 20233-20241.

De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J.J., Szikora, J.P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C., *et al.* (1994). Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40, 360-369.

De Smet, C., Courtois, S.J., Faraoni, I., Lurquin, C., Szikora, J.P., De Backer, O., and Boon, T. (1995). Involvement of two Ets binding sites in the transcriptional activation of the MAGE1 gene. *Immunogenetics* 42, 282-290.

De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F., and Boon, T. (1996). The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7149-7153.

De Smet, C., Loriot, A., and Boon, T. (2004). Promoter-dependent mechanism leading to selective hypomethylation within the 5' region of gene MAGE-A1 in tumor cells. *Molecular and cellular biology* 24, 4781-4790.

De Smet, C., Lurquin, C., Lethe, B., Martelange, V., and Boon, T. (1999). DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Molecular and cellular biology* 19, 7327-7335.

de Vries, T.J., Fourkour, A., Wobbles, T., Verkroost, G., Ruiten, D.J., and van Muijen, G.N. (1997). Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions. *Cancer research* 57, 3223-3229.

Derhovanessian, E., Adams, V., Hahnel, K., Groeger, A., Pandha, H., Ward, S., and Pawelec, G. (2009). Pretreatment frequency of circulating IL-17+ CD4+ T-cells, but not Tregs, correlates with clinical response to whole-cell vaccination in prostate cancer patients. *International journal of cancer Journal international du cancer* 125, 1372-1379.

Djuretic, I.M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., and Ansel, K.M. (2007). Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate *Ifng* and silence *Il4* in T helper type 1 cells. *Nature immunology* 8, 145-153.

Dong, L., Jiang, C.C., Thorne, R.F., Croft, A., Yang, F., Liu, H., de Bock, C.E., Hersey, P., and Zhang, X.D. (2011). Ets-1 mediates upregulation of Mcl-1 downstream of XBP-1 in human melanoma cells upon ER stress. *Oncogene* 30, 3716-3726.

Dreno, B., Nguyen, J.M., Khammari, A., Pandolfino, M.C., Tessier, M.H., Bercegeay, S., Cassidanius, A., Lemarre, P., Billaudel, S., Labarriere, N., *et al.* (2002). Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 51, 539-546.

Du, J., and Fisher, D.E. (2002). Identification of Aim-1 as the underwhite mouse mutant and its transcriptional regulation by MITF. *The Journal of biological chemistry* 277, 402-406.

Du, J., Miller, A.J., Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Ramaswamy, S., and Fisher, D.E. (2003). MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *The American journal of pathology* 163, 333-343.

Duan, Z., Duan, Y., Lamendola, D.E., Yusuf, R.Z., Naeem, R., Penson, R.T., and Seiden, M.V. (2003). Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9, 2778-2785.

Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Robbins, P.F., Yang, J.C., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Sherry, R., Restifo, N.P., Hubicki, A.M., *et al.* (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science (New York, NY)* 298, 850-854.

Dudley, M.E., Yang, J.C., Sherry, R., Hughes, M.S., Royal, R., Kammula, U., Robbins, P.F., Huang, J., Citrin, D.E., Leitman, S.F., *et al.* (2008). Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, 5233-5239.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137-148.

Dutton-Regester, K., and Hayward, N.K. (2012). Reviewing the somatic genetics of melanoma: from current to future analytical approaches. *Pigment cell melanoma research* 25, 144-154.

E

Ebert, L.M., MacRaid, S.E., Zanker, D., Davis, I.D., Cebon, J., and Chen, W. (2012). A cancer vaccine induces expansion of NY-ESO-1-specific regulatory T cells in patients with advanced melanoma. *PLoS one* 7, e48424.

Ehrlich, M. (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21, 5400-5413.

Ehrlich, M., Gama-Sosa, M.A., Huang, L.H., Midgett, R.M., Kuo, K.C., McCune, R.A., and Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic acids research* 10, 2709-2721.

Emmerich, J., Mumm, J.B., Chan, I.H., LaFace, D., Truong, H., McClanahan, T., Gorman, D.M., and Oft, M. (2012). IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8(+) T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer research* 72, 3570-3581.

Epstein, J.A., Shapiro, D.N., Cheng, J., Lam, P.Y., and Maas, R.L. (1996). Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 4213-4218.

Erdmann, F., Lortet-Tieulent, J., Schuz, J., Zeeb, H., Greinert, R., Breitbart, E.W., and Bray, F. (2013). International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008--are recent generations at higher or lower risk? *International journal of cancer Journal international du cancer* 132, 385-400.

Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *The New England journal of medicine* 358, 1148-1159.

Esteller, M., and Herman, J.G. (2002). Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *The Journal of pathology* 196, 1-7.

F

Fayolle, C., Deriaud, E., and Leclerc, C. (1991). In vivo induction of cytotoxic T cell response by a free synthetic peptide requires CD4+ T cell help. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 147, 4069-4073.

Feinberg, A.P., and Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nature reviews Cancer* 4, 143-153.

Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301, 89-92.

Feltkamp, M.C., Smits, H.L., Vierboom, M.P., Minnaar, R.P., de Jongh, B.M., Drijfhout, J.W., ter Schegget, J., Melief, C.J., and Kast, W.M. (1993). Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *European journal of immunology* 23, 2242-2249.

Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* 4, 330-336.

Fourcade, J., Sun, Z., Kudela, P., Janjic, B., Kirkwood, J.M., El-Hafnawy, T., and Zarour, H.M. (2010). Human tumor antigen-specific helper and regulatory T cells share common epitope specificity but exhibit distinct T cell repertoire. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 184, 6709-6718.

Fraga, M.F., and Esteller, M. (2005). Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 4, 1377-1381.

Fridman, W.H., Mlecnik, B., Bindea, G., Pages, F., and Galon, J. (2011). Immunosurveillance in human non-viral cancers. *Current opinion in immunology* 23, 272-278.

Frisch, M., Biggar, R.J., Engels, E.A., and Goedert, J.J. (2001). Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 285, 1736-1745.

Fullgrabe, J., Kavanagh, E., and Joseph, B. (2011). Histone onco-modifications. *Oncogene* 30, 3391-3403.

Furuta, J., Umebayashi, Y., Miyamoto, K., Kikuchi, K., Otsuka, F., Sugimura, T., and Ushijima, T. (2004). Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma. *Cancer science* 95, 962-968.

G

Gaggioli, C., Busca, R., Abbe, P., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (2003). Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is required but is not sufficient to induce the expression of melanogenic genes. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 16, 374-382.

Galibert, M.D., Carreira, S., and Goding, C.R. (2001). The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. *The EMBO journal* 20, 5022-5031.

Galibert, M.D., Yavuzer, U., Dexter, T.J., and Goding, C.R. (1999). Pax3 and regulation of the melanocyte-specific tyrosinase-related protein-1 promoter. *The Journal of biological chemistry* 274, 26894-26900.

Gama-Sosa, M.A., Slagel, V.A., Trewyn, R.W., Oxenhandler, R., Kuo, K.C., Gehrke, C.W., and Ehrlich, M. (1983). The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic acids research* 11, 6883-6894.

Garraway, L.A., Widlund, H.R., Rubin, M.A., Getz, G., Berger, A.J., Ramaswamy, S., Beroukhim, R., Milner, D.A., Granter, S.R., Du, J., *et al.* (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 436, 117-122.

Gates, J.D., Clifton, G.T., Benavides, L.C., Sears, A.K., Carmichael, M.G., Hueman, M.T., Holmes, J.P., Jama, Y.H., Mursal, M., Zacharia, A., *et al.* (2010). Circulating regulatory T cells (CD4+CD25+FOXP3+) decrease in breast cancer patients after vaccination with a modified MHC class II HER2/neu (AE37) peptide. *Vaccine* 28, 7476-7482.

Gaudet, F., Hodgson, J.G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J.W., Leonhardt, H., and Jaenisch, R. (2003). Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science (New York, NY)* *300*, 489-492.

Gaugler, B., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., Romero, P., Gaforio, J.J., De Plaen, E., Lethe, B., Brasseur, F., and Boon, T. (1994). Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* *179*, 921-930.

Gershon, T.R., Oppenheimer, O., Chin, S.S., and Gerald, W.L. (2005). Temporally regulated neural crest transcription factors distinguish neuroectodermal tumors of varying malignancy and differentiation. *Neoplasia (New York, NY)* *7*, 575-584.

Glimcher, L.H., and Murphy, K.M. (2000). Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes & development* *14*, 1693-1711.

Godet, Y., Desfrancois, J., Vignard, V., Schadendorf, D., Khammari, A., Dreno, B., Jotereau, F., and Labarriere, N. (2010b). Frequent occurrence of high affinity T cells against MELOE-1 makes this antigen an attractive target for melanoma immunotherapy. *European journal of immunology* *40*, 1786-1794.

Godet, Y., Moreau-Aubry, A., Mompelat, D., Vignard, V., Khammari, A., Dreno, B., Lang, F., Jotereau, F. and Labarriere, N. (2010a). An additional ORF on meloe cDNA encodes a new melanoma antigen, MELOE-2, recognized by melanoma-specific T cells in the HLA-A2 context. *Cancer Immunology Immunotherapy* *59*, 431-439.

Godet, Y., Moreau-Aubry, A., Guilloux, Y., Vignard, V., Khammari, A., Dreno, B., Jotereau, F., and Labarriere, N. (2008). MELOE-1 is a new antigen overexpressed in melanomas and involved in adoptive T cell transfer efficiency. *The Journal of experimental medicine* *205*, 2673-2682.

Goldberg, A.L., and Rock, K. (2002). Not just research tools--proteasome inhibitors offer therapeutic promise. *Nature medicine* *8*, 338-340.

Goydos, J.S., Mann, B., Kim, H.J., Gabriel, E.M., Alsina, J., Germino, F.J., Shih, W., and Gorski, D.H. (2005). Detection of B-RAF and N-RAS mutations in human melanoma. *Journal of the American College of Surgeons* *200*, 362-370.

Grogan, J.L., and Locksley, R.M. (2002). T helper cell differentiation: on again, off again. *Current opinion in immunology* *14*, 366-372.

Guerder, S., and Matzinger, P. (1992). A fail-safe mechanism for maintaining self-tolerance. *The Journal of experimental medicine* *176*, 553-564.

Guilloux, Y., Lucas, S., Brichard, V.G., Van Pel, A., Viret, C., De Plaen, E., Brasseur, F., Lethe, B., Jotereau, F., and Boon, T. (1996). A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-

acetylglucosaminyltransferase V gene. *The Journal of experimental medicine* 183, 1173-1183.

H

Hamilton, S.E., Prlic, M., and Jameson, S.C. (2004). Environmental conservation: bystander CD4 T cells keep CD8 memories fresh. *Nature immunology* 5, 873-874.

Hanada, K., Yewdell, J.W., and Yang, J.C. (2004). Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature* 427, 252-256.

Harada, M., Li, Y.F., El-Gamil, M., Rosenberg, S.A., and Robbins, P.F. (2001). Use of an in vitro immunoselected tumor line to identify shared melanoma antigens recognized by HLA-A*0201-restricted T cells. *Cancer research* 61, 1089-1094.

Harding, F.A., McArthur, J.G., Gross, J.A., Raulet, D.H., and Allison, J.P. (1992). CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356, 607-609.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology* 6, 1123-1132.

Hedstrand, H., Ekwall, O., Olsson, M.J., Landgren, E., Kemp, E.H., Weetman, A.P., Perheentupa, J., Husebye, E., Gustafsson, J., Betterle, C., *et al.* (2001). The transcription factors SOX9 and SOX10 are vitiligo autoantigens in autoimmune polyendocrine syndrome type I. *The Journal of biological chemistry* 276, 35390-35395.

Heegaard, S., Jensen, O.A., and Prause, J.U. (2000). Immunohistochemical diagnosis of malignant melanoma of the conjunctiva and uvea: comparison of the novel antibody against melan-A with S100 protein and HMB-45. *Melanoma research* 10, 350-354.

Holmes, J.P., Benavides, L.C., Gates, J.D., Carmichael, M.G., Hueman, M.T., Mittendorf, E.A., Murray, J.L., Amin, A., Craig, D., von Hofe, E., *et al.* (2008). Results of the first phase I clinical trial of the novel II-key hybrid preventive HER-2/neu peptide (AE37) vaccine. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, 3426-3433.

Horiuchi, S., Onodera, A., Hosokawa, H., Watanabe, Y., Tanaka, T., Sugano, S., Suzuki, Y., and Nakayama, T. (2011). Genome-wide analysis reveals unique regulation of transcription of Th2-specific genes by GATA3. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 186, 6378-6389.

Huang, J., Meyer, C., and Zhu, C. (2012). T cell antigen recognition at the cell membrane. *Molecular immunology* 52, 155-164.

Huber, W.E., Price, E.R., Widlund, H.R., Du, J., Davis, I.J., Wegner, M., and Fisher, D.E. (2003). A tissue-restricted cAMP transcriptional response: SOX10 modulates alpha-melanocyte-stimulating hormone-triggered expression of microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *The Journal of biological chemistry* 278, 45224-45230.

Husmann, L.A., and Bevan, M.J. (1988). Cooperation between helper T cells and cytotoxic T lymphocyte precursors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 532, 158-169.

Huster, K.M., Busch, V., Schiemann, M., Linkemann, K., Kerksiek, K.M., Wagner, H., and Busch, D.H. (2004). Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8⁺ memory T cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 5610-5615.

Hwang, E.S., Szabo, S.J., Schwartzberg, P.L., and Glimcher, L.H. (2005). T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science (New York, NY)* 307, 430-433.

I

Irving, B.A., Chan, A.C., and Weiss, A. (1993). Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *The Journal of experimental medicine* 177, 1093-1103.

Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology* 5, 987-995.

J

Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics* 33 *Suppl*, 245-254.

Jandus, C., Bioley, G., Dojcinovic, D., Derre, L., Baitsch, L., Wieckowski, S., Rufer, N., Kwok, W.W., Tiercy, J.M., Luescher, I.F., *et al.* (2009). Tumor antigen-specific FOXP3⁺ CD4⁺ T cells identified in human metastatic melanoma: peptide vaccination results in selective expansion of Th1-like counterparts. *Cancer research* 69, 8085-8093.

Janssen, E.M., Droin, N.M., Lemmens, E.E., Pinkoski, M.J., Bensinger, S.J., Ehst, B.D., Griffith, T.S., Green, D.R., and Schoenberger, S.P. (2005). CD4⁺ T-cell help controls CD8⁺ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434, 88-93.

Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M.G., and Schoenberger, S.P. (2003). CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* 421, 852-856.

Jensen, P.E. (1993). Acidification and disulfide reduction can be sufficient to allow intact proteins to bind class II MHC. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 150, 3347-3356.

Jiao, Z., Mollaaghababa, R., Pavan, W.J., Antonellis, A., Green, E.D., and Hornyak, T.J. (2004). Direct interaction of Sox10 with the promoter of murine Dopachrome Tautomerase (Dct) and synergistic activation of Dct expression with Mitf. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 17, 352-362.

Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature reviews Immunology* 12, 557-569.

Johansson, M., Denardo, D.G., and Coussens, L.M. (2008). Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunological reviews* 222, 145-154.

Johnson, L.A., Morgan, R.A., Dudley, M.E., Cassard, L., Yang, J.C., Hughes, M.S., Kammula, U.S., Royal, R.E., Sherry, R.M., Wunderlich, J.R., *et al.* (2009). Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 114, 535-546.

Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews Genetics* 3, 415-428.

K

Kabbarah, O., and Chin, L. (2006). Advances in malignant melanoma: genetic insights from mouse and man. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 11, 928-942.

Kacha, A.K., Fallarino, F., Markiewicz, M.A., and Gajewski, T.F. (2000). Cutting edge: spontaneous rejection of poorly immunogenic P1.HTR tumors by Stat6-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 165, 6024-6028.

Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K.J., Podack, E.R., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369, 31-37.

Kakimi, K., Isobe, M., Uenaka, A., Wada, H., Sato, E., Doki, Y., Nakajima, J., Seto, Y., Yamatsuji, T., Naomoto, Y., *et al.* (2011). A phase I study of vaccination with NY-ESO-1f peptide mixed with Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. *International journal of cancer Journal international du cancer* 129, 2836-2846.

Kalia, V., Sarkar, S., Subramaniam, S., Haining, W.N., Smith, K.A., and Ahmed, R. (2010). Prolonged interleukin-2/Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* 32, 91-103.

Kalialis, L.V., Drzewiecki, K.T., and Klyver, H. (2009). Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. *Melanoma research* 19, 275-282.

- Kanazawa, M., Yoshihara, K., Abe, H., Iwadate, M., Watanabe, K., Suzuki, S., Endoh, Y., Takita, K., Sekikawa, K., Takenoshita, S., *et al.* (2005). Effects of PSK on T and dendritic cells differentiation in gastric or colorectal cancer patients. *Anticancer research* 25, 443-449.
- Kang, X., Kawakami, Y., el-Gamil, M., Wang, R., Sakaguchi, K., Yannelli, J.R., Appella, E., Rosenberg, S.A., and Robbins, P.F. (1995). Identification of a tyrosinase epitope recognized by HLA-A24-restricted, tumor-infiltrating lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 155, 1343-1348.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7556-7561.
- Kaplan, M.H., Schindler, U., Smiley, S.T., and Grusby, M.J. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4, 313-319.
- Keene, J.A., and Forman, J. (1982). Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 155, 768-782.
- Kenter, G.G., Welters, M.J., Valentijn, A.R., Lowik, M.J., Berends-van der Meer, D.M., Vloon, A.P., Essahsah, F., Fathallah, L.M., Offringa, R., Drijfhout, J.W., *et al.* (2009). Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *The New England journal of medicine* 361, 1838-1847.
- Khammari, A., Labarriere, N., Vignard, V., Nguyen, J.M., Pandolfino, M.C., Knol, A.C., Quereux, G., Saiagh, S., Brocard, A., Jotereau, F., *et al.* (2009). Treatment of metastatic melanoma with autologous Melan-A/MART-1-specific cytotoxic T lymphocyte clones. *The Journal of investigative dermatology* 129, 2835-2842.
- Khammari, A., Nguyen, J.M., Pandolfino, M.C., Quereux, G., Brocard, A., Bercegeay, S., Cassidanius, A., Lemarre, P., Volteau, C., Labarriere, N., *et al.* (2007). Long-term follow-up of patients treated by adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 56, 1853-1860.
- Kharchenko, P.V., Alekseyenko, A.A., Schwartz, Y.B., Minoda, A., Riddle, N.C., Ernst, J., Sabo, P.J., Larschan, E., Gorchakov, A.A., Gu, T., *et al.* (2011). Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 471, 480-485.
- Kholmanskikh, O., Lorient, A., Brasseur, F., De Plaen, E., and De Smet, C. (2008). Expression of BORIS in melanoma: lack of association with MAGE-A1 activation. *International journal of cancer Journal international du cancer* 122, 777-784.
- King, R., Weilbaecher, K.N., McGill, G., Cooley, E., Mihm, M., and Fisher, D.E. (1999). Microphthalmia transcription factor. A sensitive and specific melanocyte marker for MelanomaDiagnosis. *The American journal of pathology* 155, 731-738.

Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Woo, K.M., and Goldberg, A.L. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *The Journal of biological chemistry* 274, 3363-3371.

Klebanoff, C.A., Gattinoni, L., and Restifo, N.P. (2006). CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunological reviews* 211, 214-224.

Klenova, E.M., Morse, H.C., 3rd, Ohlsson, R., and Lobanenkov, V.V. (2002). The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Seminars in cancer biology* 12, 399-414.

Knutson, K.L., Schiffman, K., and Disis, M.L. (2001). Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates HER-2/neu CD8 T-cell immunity in cancer patients. *The Journal of clinical investigation* 107, 477-484.

Kobayashi, M., Kobayashi, H., Pollard, R.B., and Suzuki, F. (1998). A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 160, 5869-5873.

Kobi, D., Steunou, A.L., Dembele, D., Legras, S., Larue, L., Nieto, L., and Davidson, I. (2010). Genome-wide analysis of POU3F2/BRN2 promoter occupancy in human melanoma cells reveals Kitl as a novel regulated target gene. *Pigment cell & melanoma research* 23, 404-418.

Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., Romani, N., and Schuler, G. (1996). High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *The Journal of experimental medicine* 184, 741-746.

Komine, O., Hayashi, K., Natsume, W., Watanabe, T., Seki, Y., Seki, N., Yagi, R., Sukzuki, W., Tamauchi, H., Hozumi, K., *et al.* (2003). The Runx1 transcription factor inhibits the differentiation of naive CD4+ T cells into the Th2 lineage by repressing GATA3 expression. *The Journal of experimental medicine* 198, 51-61.

Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jager, A., Strom, T.B., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448, 484-487.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.

Kryczek, I., Wei, S., Szeliga, W., Vatan, L., and Zou, W. (2009). Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* 114, 357-359.

Kular, R.K., Yehiely, F., Kotlo, K.U., Cilensek, Z.M., Bedi, R., and Deiss, L.P. (2009). GAGE, an antiapoptotic protein binds and modulates the expression of nucleophosmin/B23 and interferon regulatory factor 1. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 29, 645-655.

Kundig, T.M., Shahinian, A., Kawai, K., Mittrucker, H.W., Sebzda, E., Bachmann, M.F., Mak, T.W., and Ohashi, P.S. (1996). Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity* 5, 41-52.

Kurashige, T., Noguchi, Y., Saika, T., Ono, T., Nagata, Y., Jungbluth, A., Ritter, G., Chen, Y.T., Stockert, E., Tsushima, T., *et al.* (2001). Ny-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade. *Cancer research* 61, 4671-4674.

Kuriyama, M., Wang, M.C., Papsidero, L.D., Killian, C.S., Shimano, T., Valenzuela, L., Nishiura, T., Murphy, G.P., and Chu, T.M. (1980). Quantitation of prostate-specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay. *Cancer research* 40, 4658-4662.

Kurte, M., Lopez, M., Aguirre, A., Escobar, A., Aguillon, J.C., Charo, J., Larsen, C.G., Kiessling, R., and Salazar-Onfray, F. (2004). A synthetic peptide homologous to functional domain of human IL-10 down-regulates expression of MHC class I and Transporter associated with Antigen Processing 1/2 in human melanoma cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 173, 1731-1737.

L

Labarriere, N., Pandolfino, M.C., Gervois, N., Khammari, A., Tessier, M.H., Dreno, B., and Jotereau, F. (2002). Therapeutic efficacy of melanoma-reactive TIL injected in stage III melanoma patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 51, 532-538.

Lang, D., and Epstein, J.A. (2003). Sox10 and Pax3 physically interact to mediate activation of a conserved c-RET enhancer. *Human molecular genetics* 12, 937-945.

Lang, D., Lu, M.M., Huang, L., Engleka, K.A., Zhang, M., Chu, E.Y., Lipner, S., Skoultchi, A., Millar, S.E., and Epstein, J.A. (2005). Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. *Nature* 433, 884-887.

Lang, D., Powell, S.K., Plummer, R.S., Young, K.P., and Ruggeri, B.A. (2007). PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochemical pharmacology* 73, 1-14.

Larsson, M., Fonteneau, J.F., Somersan, S., Sanders, C., Bickham, K., Thomas, E.K., Mahnke, K., and Bhardwaj, N. (2001). Efficiency of cross presentation of vaccinia virus-derived antigens by human dendritic cells. *European journal of immunology* 31, 3432-3442.

Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., *et al.* (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26, 371-381.

Lazarevic, V., and Glimcher, L.H. (2011). T-bet in disease. *Nature immunology* 12, 597-606.

Lee, B.O., Hartson, L., and Randall, T.D. (2003). CD40-deficient, influenza-specific CD8 memory T cells develop and function normally in a CD40-sufficient environment. *The Journal of experimental medicine* 198, 1759-1764.

Lee, J.W., Wang, P., Kattah, M.G., Youssef, S., Steinman, L., DeFea, K., and Straus, D.S. (2008). Differential regulation of chemokines by IL-17 in colonic epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *181*, 6536-6545.

Lee, M., Goodall, J., Verastegui, C., Ballotti, R., and Goding, C.R. (2000). Direct regulation of the Microphthalmia promoter by Sox10 links Waardenburg-Shah syndrome (WS4)-associated hypopigmentation and deafness to WS2. *The Journal of biological chemistry* *275*, 37978-37983.

Leffers, N., Lambeck, A.J., Gooden, M.J., Hooigeboom, B.N., Wolf, R., Hamming, I.E., Hepkema, B.G., Willemsse, P.H., Molmans, B.H., Hollema, H., *et al.* (2009). Immunization with a P53 synthetic long peptide vaccine induces P53-specific immune responses in ovarian cancer patients, a phase II trial. *International journal of cancer Journal international du cancer* *125*, 2104-2113.

Leffers, N., Vermeij, R., Hooigeboom, B.N., Schulze, U.R., Wolf, R., Hamming, I.E., van der Zee, A.G., Melief, K.J., van der Burg, S.H., Daemen, T., *et al.* (2012). Long-term clinical and immunological effects of p53-SLP(R) vaccine in patients with ovarian cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* *130*, 105-112.

Leist, T.P., Cobbold, S.P., Waldmann, H., Aguet, M., and Zinkernagel, R.M. (1987). Functional analysis of T lymphocyte subsets in antiviral host defense. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *138*, 2278-2281.

Levy, C., Khaled, M., and Fisher, D.E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in molecular medicine* *12*, 406-414.

Linette, G.P., Stadtmayer, E.A., Maus, M.V., Rapoport, A.P., Levine, B.L., Emery, L., Litzky, L., Bagg, A., Carreno, B.M., Cimino, P.J., *et al.* (2013). Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* *122*, 863-871.

Link, P.A., Gangisetty, O., James, S.R., Woloszynska-Read, A., Tachibana, M., Shinkai, Y., and Karpf, A.R. (2009). Distinct roles for histone methyltransferases G9a and GLP in cancer germline antigen gene regulation in human cancer cells and murine embryonic stem cells. *Molecular cancer research : MCR* *7*, 851-862.

Liu, C.L., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Schreiber, S.L., Friedman, N., and Rando, O.J. (2005). Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS biology* *3*, e328.

Liu, X.S., Leerberg, J., MacDonald, K., Leggatt, G.R., and Frazer, I.H. (2009). IFN-gamma promotes generation of IL-10 secreting CD4+ T cells that suppress generation of CD8 responses in an antigen-experienced host. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *183*, 51-58.

Lizee, G., Overwijk, W.W., Radvanyi, L., Gao, J., Sharma, P., and Hwu, P. (2013). Harnessing the power of the immune system to target cancer. *Annual review of medicine* 64, 71-90.

Lopez-Bergami, P., Lau, E., and Ronai, Z. (2010). Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nature reviews Cancer* 10, 65-76.

Lowings, P., Yavuzer, U., and Goding, C.R. (1992). Positive and negative elements regulate a melanocyte-specific promoter. *Molecular and cellular biology* 12, 3653-3662.

Ludwig, A., Rehberg, S., and Wegner, M. (2004). Melanocyte-specific expression of dopachrome tautomerase is dependent on synergistic gene activation by the Sox10 and Mitf transcription factors. *FEBS letters* 556, 236-244.

M

Ma, D.K., Jang, M.H., Guo, J.U., Kitabatake, Y., Chang, M.L., Pow-Anpongkul, N., Flavell, R.A., Lu, B., Ming, G.L., and Song, H. (2009). Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science (New York, NY)* 323, 1074-1077.

Ma, J.S., Monu, N., Shen, D.T., Mecklenbrauker, I., Radoja, N., Haydar, T.F., Leitges, M., Frey, A.B., Vukmanovic, S., and Radoja, S. (2007). Protein kinase Cdelta regulates antigen receptor-induced lytic granule polarization in mouse CD8+ CTL. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 178, 7814-7821.

Mackensen, A., Meidenbauer, N., Vogl, S., Laumer, M., Berger, J., and 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, 5060-5069.

Mandelboim, O., Vadai, E., Fridkin, M., Katz-Hillel, A., Feldman, M., Berke, G., and Eisenbach, L. (1995). Regression of established murine carcinoma metastases following vaccination with tumour-associated antigen peptides. *Nature medicine* 1, 1179-1183.

Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441, 231-234.

Martin-Kleiner, I. (2012). BORIS in human cancers -- a review. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 48, 929-935.

Mattes, J., Hulett, M., Xie, W., Hogan, S., Rothenberg, M.E., Foster, P., and Parish, C. (2003). Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process. *The Journal of experimental medicine* 197, 387-393.

Mayr, B., and Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 599-609.

Medic, S., Rizos, H., and Ziman, M. (2011). Differential PAX3 functions in normal skin melanocytes and melanoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* 411, 832-837.

Medic, S., and Ziman, M. (2009). PAX3 across the spectrum: from melanoblast to melanoma. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 44, 85-97.

Melief, C.J., and van der Burg, S.H. (2008). Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nature reviews Cancer* 8, 351-360.

Michie, C.A., McLean, A., Alcock, C., and Beverley, P.C. (1992). Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* 360, 264-265.

Miyahara, Y., Odunsi, K., Chen, W., Peng, G., Matsuzaki, J., and Wang, R.F. (2008). Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 15505-15510.

Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology* 19, 683-765.

Moreau-Aubry, A., Le Guiner, S., Labarriere, N., Gesnel, M.C., Jotereau, F., and Breathnach, R. (2000). A processed pseudogene codes for a new antigen recognized by a CD8(+) T cell clone on melanoma. *The Journal of experimental medicine* 191, 1617-1624.

Morel, S., Levy, F., Burlet-Schiltz, O., Brasseur, F., Probst-Kepper, M., Peitrequin, A.L., Monsarrat, B., Van Velthoven, R., Cerottini, J.C., Boon, T., *et al.* (2000). Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 12, 107-117.

Morgan, R.A., Yang, J.C., Kitano, M., Dudley, M.E., Laurencot, C.M., and Rosenberg, S.A. (2010). Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 843-851.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 136, 2348-2357.

Mullen, A.C., Hutchins, A.S., High, F.A., Lee, H.W., Sykes, K.J., Chodosh, L.A., and Reiner, S.L. (2002). Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. *Nature immunology* 3, 652-658.

Mumberg, D., Monach, P.A., Wanderling, S., Philip, M., Toledano, A.Y., Schreiber, R.D., and Schreiber, H. (1999). CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 8633-8638.

Murakami, T., Sato, A., Chun, N.A., Hara, M., Naito, Y., Kobayashi, Y., Kano, Y., Ohtsuki, M., Furukawa, Y., and Kobayashi, E. (2008). Transcriptional modulation using HDACi depsiptide promotes immune cell-mediated tumor destruction of murine B16 melanoma. *The Journal of investigative dermatology* *128*, 1506-1516.

Muranski, P., Boni, A., Antony, P.A., Cassard, L., Irvine, K.R., Kaiser, A., Paulos, C.M., Palmer, D.C., Touloukian, C.E., Ptak, K., *et al.* (2008). Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* *112*, 362-373.

Murisier, F., Guichard, S., and Beermann, F. (2006). A conserved transcriptional enhancer that specifies *Tyrb1* expression to melanocytes. *Developmental biology* *298*, 644-655.

Murisier, F., Guichard, S., and Beermann, F. (2007). The tyrosinase enhancer is activated by *Sox10* and *Mitf* in mouse melanocytes. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* *20*, 173-184.

N

Nankivell, B.J., and Alexander, S.I. (2010). Rejection of the kidney allograft. *The new england journal of medicine* *363*, 1451-1462.

Newton, J.M., Cohen-Barak, O., Hagiwara, N., Gardner, J.M., Davisson, M.T., King, R.A., and Brilliant, M.H. (2001). Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (*uw*) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. *American journal of human genetics* *69*, 981-988.

Nicholaou, T., Ebert, L.M., Davis, I.D., McArthur, G.A., Jackson, H., Dimopoulos, N., Tan, B., Maraskovsky, E., Miloradovic, L., Hopkins, W., *et al.* (2009). Regulatory T-cell-mediated attenuation of T-cell responses to the NY-ESO-1 ISCOMATRIX vaccine in patients with advanced malignant melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *15*, 2166-2173.

Nishigaki, M., Aoyagi, K., Danjoh, I., Fukaya, M., Yanagihara, K., Sakamoto, H., Yoshida, T., and Sasaki, H. (2005). Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer research* *65*, 2115-2124.

Noble, A. (2000). Review article: molecular signals and genetic reprogramming in peripheral T-cell differentiation. *Immunology* *101*, 289-299.

Noguchi, S., Kumazaki, M., Yasui, Y., Mori, T., Yamada, N., and Akao, Y. (2013). MicroRNA-203 Regulates Melanosome Transport and Tyrosinase Expression in Melanoma Cells by Targeting Kinesin Superfamily Protein 5b. *The Journal of investigative dermatology*.

Noguchi, Y., Chen, Y.T., and Old, L.J. (1994). A mouse mutant p53 product recognized by CD4+ and CD8+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 3171-3175.

Norbury, C.C., Basta, S., Donohue, K.B., Tscharke, D.C., Princiotta, M.F., Berglund, P., Gibbs, J., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (2004). CD8+ T cell cross-priming via transfer of proteasome substrates. *Science (New York, NY)* *304*, 1318-1321.

Norcross, M.A. (1984). A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Annales d'immunologie* *135D*, 113-134.

Numasaki, M., Fukushi, J., Ono, M., Narula, S.K., Zavodny, P.J., Kudo, T., Robbins, P.D., Tahara, H., and Lotze, M.T. (2003). Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* *101*, 2620-2627.

Numasaki, M., Watanabe, M., Suzuki, T., Takahashi, H., Nakamura, A., McAllister, F., Hishinuma, T., Goto, J., Lotze, M.T., Kolls, J.K., *et al.* (2005). IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *175*, 6177-6189.

O

Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* *87*, 953-959.

Opdecamp, K., Nakayama, A., Nguyen, M.T., Hodgkinson, C.A., Pavan, W.J., and Arnheiter, H. (1997). Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. *Development (Cambridge, England)* *124*, 2377-2386.

Ossendorp, F., Mengede, E., Camps, M., Filius, R., and Melief, C.J. (1998). Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *The Journal of experimental medicine* *187*, 693-702.

P

Palucka, K., and Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature reviews Cancer* *12*, 265-277.

Passeron, T., Valencia, J.C., Bertolotto, C., Hoashi, T., Le Pape, E., Takahashi, K., Ballotti, R., and Hearing, V.J. (2007). SOX9 is a key player in ultraviolet B-induced melanocyte differentiation and pigmentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 13984-13989.

Passeron, T., Valencia, J.C., Namiki, T., Vieira, W.D., Passeron, H., Miyamura, Y., and Hearing, V.J. (2009). Upregulation of SOX9 inhibits the growth of human and mouse melanomas and restores their sensitivity to retinoic acid. *The Journal of clinical investigation* *119*, 954-963.

Pasternack, M.S., Verret, C.R., Liu, M.A., and Eisen, H.N. (1986). Serine esterase in cytolytic T lymphocytes. *Nature* 322, 740-743.

Pastor, W.A., Aravind, L., and Rao, A. (2013). TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nature reviews Molecular cell biology* 14, 341-356.

Peirano, R.I., Goerich, D.E., Riethmacher, D., and Wegner, M. (2000). Protein zero gene expression is regulated by the glial transcription factor Sox10. *Molecular and cellular biology* 20, 3198-3209.

Penn, I. (1996). Malignant melanoma in organ allograft recipients. *Transplantation* 61, 274-278.

Perez, S.A., Kallinteris, N.L., Bisias, S., Tzonis, P.K., Georgakopoulou, K., Varla-Leftherioti, M., Papamichail, M., Thanos, A., von Hofe, E., and Baxevanis, C.N. (2010). Results from a phase I clinical study of the novel li-Key/HER-2/neu(776-790) hybrid peptide vaccine in patients with prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 3495-3506.

Petersson, M., Charo, J., Salazar-Onfray, F., Noffz, G., Mohaupt, M., Qin, Z., Klein, G., Blankenstein, T., and Kiessling, R. (1998). Constitutive IL-10 production accounts for the high NK sensitivity, low MHC class I expression, and poor transporter associated with antigen processing (TAP)-1/2 function in the prototype NK target YAC-1. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 161, 2099-2105.

Piera-Velazquez, S., Hawkins, D.F., Whitecavage, M.K., Colter, D.C., Stokes, D.G., and Jimenez, S.A. (2007). Regulation of the human SOX9 promoter by Sp1 and CREB. *Experimental cell research* 313, 1069-1079.

Pingault, V., Ente, D., Dastot-Le Moal, F., Goossens, M., Marlin, S., and Bondurand, N. (2010). Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Human mutation* 31, 391-406.

Pipkin, M.E., Sacks, J.A., Cruz-Guilloty, F., Lichtenheld, M.G., Bevan, M.J., and Rao, A. (2010). Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* 32, 79-90.

Plummer, R.S., Shea, C.R., Nelson, M., Powell, S.K., Freeman, D.M., Dan, C.P., and Lang, D. (2008). PAX3 expression in primary melanomas and nevi. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 21, 525-530.

Podack, E.R., Young, J.D., and Cohn, Z.A. (1985). Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 8629-8633.

Potterf, S.B., Mollaaghababa, R., Hou, L., Southard-Smith, E.M., Hornyak, T.J., Arnheiter, H., and Pavan, W.J. (2001). Analysis of SOX10 function in neural crest-derived melanocyte development: SOX10-dependent transcriptional control of dopachrome tautomerase. *Developmental biology* 237, 245-257.

Pound, C.R., Partin, A.W., Eisenberger, M.A., Chan, D.W., Pearson, J.D., and Walsh, P.C. (1999). Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 281, 1591-1597.

Povoleri, G.A., Scotta, C., Nova-Lamperti, E.A., John, S., Lombardi, G., and Afzali, B. (2013). Thymic versus induced regulatory T cells - who regulates the regulators? *Frontiers in immunology* 4, 169.

Q

Quezada, S.A., Simpson, T.R., Peggs, K.S., Merghoub, T., Vider, J., Fan, X., Blasberg, R., Yagita, H., Muranski, P., Antony, P.A., *et al.* (2010). Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *The Journal of experimental medicine* 207, 637-650.

R

Rao, M., Chinnasamy, N., Hong, J.A., Zhang, Y., Zhang, M., Xi, S., Liu, F., Marquez, V.E., Morgan, R.A., and Schrumpp, D.S. (2011). Inhibition of histone lysine methylation enhances cancer-testis antigen expression in lung cancer cells: implications for adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer research* 71, 4192-4204.

Rees, M.A., Rosenberg, A.S., Munitz, T.I., and Singer, A. (1990). In vivo induction of antigen-specific transplantation tolerance to Qa1a by exposure to alloantigen in the absence of T-cell help. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 2765-2769.

Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Thery, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., *et al.* (1999). Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *The Journal of experimental medicine* 189, 371-380.

Reinke, S., Koniger, P., Herberth, G., Audring, H., Wang, H., Ma, J., Guo, Y., Sterry, W., and Trefzer, U. (2005). Differential expression of MART-1, tyrosinase, and SM5-1 in primary and metastatic melanoma. *The American Journal of dermatopathology* 27, 401-406.

Ridge, J.P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474-478.

Robbins, P.F., Morgan, R.A., Feldman, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Nahvi, A.V., Helman, L.J., Mackall, C.L., *et al.* (2011). Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 917-924.

Robertson, K.D. (2001). DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 20, 3139-3155.

Robson, E.J., He, S.J., and Eccles, M.R. (2006). A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nature reviews Cancer* 6, 52-62.

Rogel, A., Vignard, V., Bobinet, M., Labarriere, N., and Lang, F. (2011). A long peptide from MELOE-1 contains multiple HLA class II T cell epitopes in addition to the HLA-A*0201 epitope: an attractive candidate for melanoma vaccination. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 60, 327-337.

Ronnstrand, L., and Phung, B. (2013). Enhanced SOX10 and KIT expression in cutaneous melanoma. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 30, 648.

Rosario, M., Bridgeman, A., Quakkelaar, E.D., Quigley, M.F., Hill, B.J., Knudsen, M.L., Ammendola, V., Ljungberg, K., Borthwick, N., Im, E.J., *et al.* (2010). Long peptides induce polyfunctional T cells against conserved regions of HIV-1 with superior breadth to single-gene vaccines in macaques. *European journal of immunology* 40, 1973-1984.

Rosenberg, S.A., Packard, B.S., Aebersold, P.M., Solomon, D., Topalian, S.L., Toy, S.T., Simon, P., Lotze, M.T., Yang, J.C., Seipp, C.A., *et al.* (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *The New England journal of medicine* 319, 1676-1680.

Rosenberg, S.A., Yang, J.C., and Restifo, N.P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature medicine* 10, 909-915.

Rosenberg, S.A., Yannelli, J.R., Yang, J.C., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Weber, J.S., Parkinson, D.R., Seipp, C.A., Einhorn, J.H., and White, D.E. (1994). Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *Journal of the National Cancer Institute* 86, 1159-1166.

S

Sabbatini, P., Tsuji, T., Ferran, L., Ritter, E., Sedrak, C., Tuballes, K., Jungbluth, A.A., Ritter, G., Aghajanian, C., Bell-McGuinn, K., *et al.* (2012). Phase I trial of overlapping long peptides from a tumor self-antigen and poly-ICLC shows rapid induction of integrated immune response in ovarian cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18, 6497-6508.

Sacks, J.A., and Bevan, M.J. (2008). TRAIL deficiency does not rescue impaired CD8+ T cell memory generated in the absence of CD4+ T cell help. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 180, 4570-4576.

Sakurai, E., Maesawa, C., Shibasaki, M., Yasuhira, S., Oikawa, H., Sato, M., Tsunoda, K., Ishikawa, Y., Watanabe, A., Takahashi, K., *et al.* (2011). Downregulation of microRNA-211 is

involved in expression of preferentially expressed antigen of melanoma in melanoma cells. *International journal of oncology* 39, 665-672.

Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual review of immunology* 22, 745-763.

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.

Sant, A.J., Beeson, C., McFarland, B., Cao, J., Ceman, S., Bryant, P.W., and Wu, S. (1999). Individual hydrogen bonds play a critical role in MHC class II: peptide interactions: implications for the dynamic aspects of class II trafficking and DM-mediated peptide exchange. *Immunological reviews* 172, 239-253.

Sawan, C., and Herceg, Z. (2010). Histone modifications and cancer. *Advances in genetics* 70, 57-85.

Schepers, G.E., Teasdale, R.D., and Koopman, P. (2002). Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Developmental cell* 3, 167-170.

Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Offringa, R., and Melief, C.J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-483.

Scholl, F.A., Kamarashev, J., Murmann, O.V., Geertsen, R., Dummer, R., and Schafer, B.W. (2001). PAX3 is expressed in human melanomas and contributes to tumor cell survival. *Cancer research* 61, 823-826.

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (New York, NY)* 331, 1565-1570.

Schulz, M., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1991). Peptide-induced antiviral protection by cytotoxic T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 991-993.

Schwartzentruber, D.J., Lawson, D.H., Richards, J.M., Conry, R.M., Miller, D.M., Treisman, J., Gailani, F., Riley, L., Conlon, K., Pockaj, B., *et al.* (2011). gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *The New England journal of medicine* 364, 2119-2127.

Sfanos, K.S., Bruno, T.C., Maris, C.H., Xu, L., Thoburn, C.J., DeMarzo, A.M., Meeker, A.K., Isaacs, W.B., and Drake, C.G. (2008). Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes

reveals TH17 and Treg skewing. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *14*, 3254-3261.

Shakhova, O., Zingg, D., Schaefer, S.M., Hari, L., Civenni, G., Blunski, J., Claudinot, S., Okoniewski, M., Beermann, F., Mihic-Probst, D., *et al.* (2012). Sox10 promotes the formation and maintenance of giant congenital naevi and melanoma. *Nature cell biology* *14*, 882-890.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* *410*, 1107-1111.

Sharma, S., Kelly, T.K., and Jones, P.A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* *31*, 27-36.

Shay, J.W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* *33*, 787-791.

Shedlock, D.J., and Shen, H. (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science (New York, NY)* *300*, 337-339.

Shen, D.T., Ma, J.S., Mather, J., Vukmanovic, S., and Radoja, S. (2006). Activation of primary T lymphocytes results in lysosome development and polarized granule exocytosis in CD4+ and CD8+ subsets, whereas expression of lytic molecules confers cytotoxicity to CD8+ T cells. *Journal of leukocyte biology* *80*, 827-837.

Sigalotti, L., Coral, S., Nardi, G., Spessotto, A., Cortini, E., Cattarossi, I., Colizzi, F., Altomonte, M., and Maio, M. (2002). Promoter methylation controls the expression of MAGE2, 3 and 4 genes in human cutaneous melanoma. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997)* *25*, 16-26.

Sigalotti, L., Fratta, E., Coral, S., Tanzarella, S., Danielli, R., Colizzi, F., Fonsatti, E., Traversari, C., Altomonte, M., and Maio, M. (2004). Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer research* *64*, 9167-9171.

Simpson, A.J., Caballero, O.L., Jungbluth, A., Chen, Y.T., and Old, L.J. (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature reviews Cancer* *5*, 615-625.

Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science (New York, NY)* *235*, 177-182.

Slingluff, C.L., Jr., Lee, S., Zhao, F., Chianese-Bullock, K.A., Olson, W.C., Butterfield, L.H., Whiteside, T.L., Leming, P.D., and Kirkwood, J.M. (2013). A randomized phase II trial of multiepitope vaccination with melanoma peptides for cytotoxic T cells and helper T cells for patients with metastatic melanoma (E1602). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *19*, 4228-4238.

Slingluff, C.L., Jr., Petroni, G.R., Chianese-Bullock, K.A., Smolkin, M.E., Ross, M.I., Haas, N.B., von Mehren, M., and Grosh, W.W. (2011). Randomized multicenter trial of the effects of melanoma-associated helper peptides and cyclophosphamide on the immunogenicity of a multi-peptide melanoma vaccine. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 2924-2932.

Smith, C.M., Wilson, N.S., Waithman, J., Villadangos, J.A., Carbone, F.R., Heath, W.R., and Belz, G.T. (2004). Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nature immunology* 5, 1143-1148.

Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., MacGregor, D., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2000). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *The Journal of experimental medicine* 192, 755-760.

Sosman, M.A., Kim, K.B., Schuchter, L., Gonzalez, R., Pavlick, A.C., Weber, J.S., McArthur, G.A., Hutson, T.E., Moschos, S.J., Flaherty, K.T., *et al.* (2012). Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated by vemurafenib. *The new england journal of medicine* 23, 707-714.

Sotiriadou, N.N., Kallinteris, N.L., Gritzapis, A.D., Voutsas, I.F., Papamichail, M., von Hofe, E., Humphreys, R.E., Pavlis, T., Perez, S.A., and Baxevanis, C.N. (2007). li-Key/HER-2/neu(776-790) hybrid peptides induce more effective immunological responses over the native peptide in lymphocyte cultures from patients with HER-2/neu+ tumors. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 56, 601-613.

Speetjens, F.M., Kuppen, P.J., Welters, M.J., Essahsah, F., Voet van den Brink, A.M., Lantrua, M.G., Valentijn, A.R., Oostendorp, J., Fathes, L.M., Nijman, H.W., *et al.* (2009). Induction of p53-specific immunity by a p53 synthetic long peptide vaccine in patients treated for metastatic colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 1086-1095.

Sprent, J., and Kishimoto, H. (2002). The thymus and negative selection. *Immunological reviews* 185, 126-135.

Steinbrink, K., Wolfl, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A.H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 159, 4772-4780.

Stemberger, C., Neuenhahn, M., Buchholz, V.R., and Busch, D.H. (2007). Origin of CD8+ effector and memory T cell subsets. *Cellular & molecular immunology* 4, 399-405.

Stockis, J., Colau, D., Coulie, P.G., and Lucas, S. (2009). Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. *European journal of immunology* 39, 3315-3322.

Stoneley, M., and Willis, A.E. (2004). Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 23, 3200-3207.

Street, S.E., Trapani, J.A., MacGregor, D., and Smyth, M.J. (2002). Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *The Journal of experimental medicine* *196*, 129-134.

Stutman, O. (1974). Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science (New York, NY)* *183*, 534-536.

Sun, J.C., and Bevan, M.J. (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science (New York, NY)* *300*, 339-342.

Sun, J.C., and Bevan, M.J. (2004). Cutting edge: long-lived CD8 memory and protective immunity in the absence of CD40 expression on CD8 T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *172*, 3385-3389.

Sun, J.C., Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2004). CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nature immunology* *5*, 927-933.

Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L., and Glimcher, L.H. (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annual review of immunology* *21*, 713-758.

I

Takahashi, N., Ohkuri, T., Homma, S., Ohtake, J., Wakita, D., Togashi, Y., Kitamura, H., Todo, S., and Nishimura, T. (2012). First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/ killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen. *Cancer science* *103*, 150-153.

Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *The Journal of experimental medicine* *195*, 161-169.

Takimoto, T., Wakabayashi, Y., Sekiya, T., Inoue, N., Morita, R., Ichiyama, K., Takahashi, R., Asakawa, M., Muto, G., Mori, T., *et al.* (2010). Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *185*, 842-855.

Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., *et al.* (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* *146*, 1016-1028.

Tanikawa, T., Wilke, C.M., Kryczek, I., Chen, G.Y., Kao, J., Nunez, G., and Zou, W. (2012). Interleukin-10 ablation promotes tumor development, growth, and metastasis. *Cancer research* *72*, 420-429.

Tatsumi, T., Kierstead, L.S., Ranieri, E., Gesualdo, L., Schena, F.P., Finke, J.H., Bukowski, R.M., Mueller-Berghaus, J., Kirkwood, J.M., Kwok, W.W., *et al.* (2002). Disease-associated bias in T helper type 1 (Th1)/Th2 CD4(+) T cell responses against MAGE-6 in HLA-DRB10401(+) patients with renal cell carcinoma or melanoma. *The Journal of experimental medicine* *196*, 619-628.

Toes, R.E., Blom, R.J., Offringa, R., Kast, W.M., and Melief, C.J. (1996). Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumors. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) *156*, 3911-3918.

Torre, L., Lopez-Rodas, G., Latasa, M.U., Carretero, M.V., Boukaba, A., Rodriguez, J.L., Franco, L., Mato, J.M., and Avila, M.A. (2000). DNA methylation and histone acetylation of rat methionine adenosyltransferase 1A and 2A genes is tissue-specific. *The international journal of biochemistry & cell biology* *32*, 397-404.

Touloukian, C.E., Leitner, W.W., Schnur, R.E., Robbins, P.F., Li, Y., Southwood, S., Sette, A., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (2003). Normal tissue depresses while tumor tissue enhances human T cell responses in vivo to a novel self/tumor melanoma antigen, OA1. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) *170*, 1579-1585.

Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R.A. (2003). The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* *19*, 641-644.

Tripp, R.A., Sarawar, S.R., and Doherty, P.C. (1995). Characteristics of the influenza virus-specific CD8+ T cell response in mice homozygous for disruption of the H-2IAb gene. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) *155*, 2955-2959.

Tureci, O., Sahin, U., Schobert, I., Koslowski, M., Scmitt, H., Schild, H.J., Stenner, F., Seitz, G., Rammensee, H.G., and Pfreundschuh, M. (1996). The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. *Cancer research* *56*, 4766-4772.

U

Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A., and Strober, W. (2003). GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* *18*, 415-428.

V

van den Broek, M.E., Kagi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W.K., Melief, C.J., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1996). Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* *184*, 1781-1790.

Van den Eynde, B., Peeters, O., De Backer, O., Gaugler, B., Lucas, S., and Boon, T. (1995). A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *The Journal of experimental medicine* 182, 689-698.

Van Den Eynde, B.J., Gaugler, B., Probst-Kepper, M., Michaux, L., Devuyst, O., Lorge, F., Weynants, P., and Boon, T. (1999). A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription. *The Journal of experimental medicine* 190, 1793-1800.

van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science (New York, NY)* 254, 1643-1647.

van Houdt, I.S., Sluijter, B.J., Moesbergen, L.M., Vos, W.M., de Gruijl, T.D., Molenkamp, B.G., van den Eertwegh, A.J., Hooijberg, E., van Leeuwen, P.A., Meijer, C.J., *et al.* (2008). Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression. *International journal of cancer Journal international du cancer* 123, 609-615.

Vatolin, S., Abdullaev, Z., Pack, S.D., Flanagan, P.T., Custer, M., Loukinov, D.I., Pugacheva, E., Hong, J.A., Morse, H., 3rd, Schrupp, D.S., *et al.* (2005). Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. *Cancer research* 65, 7751-7762.

Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature immunology* 9, 1341-1346.

Vence, L., Palucka, A.K., Fay, J.W., Ito, T., Liu, Y.J., Banchereau, J., and Ueno, H. (2007). Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 20884-20889.

Verastegui, C., Bille, K., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (2000). Regulation of the microphthalmia-associated transcription factor gene by the Waardenburg syndrome type 4 gene, SOX10. *The Journal of biological chemistry* 275, 30757-30760.

Verdegaal, E.M., Visser, M., Ramwadhoebe, T.H., van der Minne, C.E., van Steijn, J.A., Kapiteijn, E., Haanen, J.B., van der Burg, S.H., Nortier, J.W., and Osanto, S. (2011). Successful treatment of metastatic melanoma by adoptive transfer of blood-derived polyclonal tumor-specific CD4+ and CD8+ T cells in combination with low-dose interferon-alpha. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 60, 953-963.

Vetrini, F., Auricchio, A., Du, J., Angeletti, B., Fisher, D.E., Ballabio, A., and Marigo, V. (2004). The microphthalmia transcription factor (Mitf) controls expression of the ocular albinism

type 1 gene: link between melanin synthesis and melanosome biogenesis. *Molecular and cellular biology* 24, 6550-6559.

Vierboom, M.P., Nijman, H.W., Offringa, R., van der Voort, E.I., van Hall, T., van den Broek, L., Fleuren, G.J., Kenemans, P., Kast, W.M., and Melief, C.J. (1997). Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 186, 695-704.

Vignard, V., Lemercier, B., Lim, A., Pandolfino, M.C., Guilloux, Y., Khammari, A., Rabu, C., Echasserieu, K., Lang, F., Gougeon, M.L., *et al.* (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. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 175, 4797-4805.

Vyas, J.M., Kim, Y.M., Artavanis-Tsakonas, K., Love, J.C., Van der Veen, A.G., and Ploegh, H.L. (2007). Tubulation of class II MHC compartments is microtubule dependent and involves multiple endolysosomal membrane proteins in primary dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 178, 7199-7210.

W

Wang, R.F., Appella, E., Kawakami, Y., Kang, X., and Rosenberg, S.A. (1996a). Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 184, 2207-2216.

Wang, R.F., Parkhurst, M.R., Kawakami, Y., Robbins, P.F., and Rosenberg, S.A. (1996b). Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. *The Journal of experimental medicine* 183, 1131-1140.

Wang, R.F., Robbins, P.F., Kawakami, Y., Kang, X.Q., and Rosenberg, S.A. (1995). Identification of a gene encoding a melanoma tumor antigen recognized by HLA-A31-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 181, 799-804.

Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J.A., Schones, D.E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Peng, W., Zhang, M.Q., *et al.* (2008). Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nature genetics* 40, 897-903.

Watanabe, A., Takeda, K., Ploplis, B., and Tachibana, M. (1998). Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3. *Nature genetics* 18, 283-286.

Waterhouse, N.J., Sedelies, K.A., and Trapani, J.A. (2006). Role of Bid-induced mitochondrial outer membrane permeabilization in granzyme B-induced apoptosis. *Immunology and cell biology* 84, 72-78.

Weber, J., Salgaller, M., Samid, D., Johnson, B., Herlyn, M., Lassam, N., Treisman, J., and Rosenberg, S.A. (1994). Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer research* 54, 1766-1771.

Wiesel, M., Joller, N., Ehlert, A.K., Crouse, J., Sporri, R., Bachmann, M.F., and Oxenius, A. (2010). Th cells act via two synergistic pathways to promote antiviral CD8+ T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 185, 5188-5197.

Wilke, C.M., Bishop, K., Fox, D., and Zou, W. (2011). Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends in immunology* 32, 603-611.

Williams, M.A., Tyznik, A.J., and Bevan, M.J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* 441, 890-893.

Wilson, E.B., and Livingstone, A.M. (2008). Cutting edge: CD4+ T cell-derived IL-2 is essential for help-dependent primary CD8+ T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 181, 7445-7448.

Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science (New York, NY)* 269, 1281-1284.

Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., *et al.* (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature medicine* 7, 297-303.

X

Xu, X., Fu, X.Y., Plate, J., and Chong, A.S. (1998). IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer research* 58, 2832-2837.

Y

Yang, B., O'Herrin, S.M., Wu, J., Reagan-Shaw, S., Ma, Y., Bhat, K.M., Gravekamp, C., Setaluri, V., Peters, N., Hoffmann, F.M., *et al.* (2007). MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines. *Cancer research* 67, 9954-9962.

Yang, X.O., Nurieva, R., Martinez, G.J., Kang, H.S., Chung, Y., Pappu, B.P., Shah, B., Chang, S.H., Schluns, K.S., Watowich, S.S., *et al.* (2008). Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 29, 44-56.

Yang, Y., Xiang, Z., Ertl, H.C., and Wilson, J.M. (1995). Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon gamma is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7257-7261.

Yasumoto, K., Mahalingam, H., Suzuki, H., Yoshizawa, M., and Yokoyama, K. (1995). Transcriptional activation of the melanocyte-specific genes by the human homolog of the mouse *Microphthalmia* protein. *Journal of biochemistry* 118, 874-881.

Yasumoto, K., Takeda, K., Saito, H., Watanabe, K., Takahashi, K., and Shibahara, S. (2002). *Microphthalmia*-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. *The EMBO journal* 21, 2703-2714.

Yasumoto, K., Yokoyama, K., Shibata, K., Tomita, Y., and Shibahara, S. (1994). *Microphthalmia*-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Molecular and cellular biology* 14, 8058-8070.

Yasumoto, K., Yokoyama, K., Takahashi, K., Tomita, Y., and Shibahara, S. (1997). Functional analysis of *microphthalmia*-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *The Journal of biological chemistry* 272, 503-509.

Yee, C., Thompson, J.A., Byrd, D., Riddell, S.R., Roche, P., Celis, E., and 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16168-16173.

Yeh, S., Karne, N.K., Kerkar, S.P., Heller, C.K., Palmer, D.C., Johnson, L.A., Li, Z., Bishop, R.J., Wong, W.T., Sherry, R.M., *et al.* (2009). Ocular and systemic autoimmunity after successful tumor-infiltrating lymphocyte immunotherapy for recurrent, metastatic melanoma. *Ophthalmology* 116, 981-989 e981.

Yokoyama, S., Feige, E., Poling, L.L., Levy, C., Widlund, H.R., Khaled, M., Kung, A.L., and Fisher, D.E. (2008). Pharmacologic suppression of MITF expression via HDAC inhibitors in the melanocyte lineage. *Pigment cell & melanoma research* 21, 457-463.

Z

Zaidi, M.R., and Merlino, G. (2011). The two faces of interferon-gamma in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 6118-6124.

Zanetti, M., Hernandez, X., and Langlade-Demoyen, P. (2005). Telomerase reverse transcriptase as target for anti-tumor T cell responses in humans. *Springer seminars in immunopathology* 27, 87-104.

Zendman, A.J., Van Kraats, A.A., Weidle, U.H., Ruiter, D.J., and Van Muijen, G.N. (2002). The XAGE family of cancer/testis-associated genes: alignment and expression profile in normal tissues, melanoma lesions and Ewing's sarcoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* 99, 361-369.

Zeng, G., Li, Y., El-Gamil, M., Sidney, J., Sette, A., Wang, R.F., Rosenberg, S.A., and Robbins, P.F. (2002). Generation of NY-ESO-1-specific CD4+ and CD8+ T cells by a single peptide with dual MHC class I and class II specificities: a new strategy for vaccine design. *Cancer research* 62, 3630-3635.

Zhang, B., Rong, G., Wei, H., Zhang, M., Bi, J., Ma, L., Xue, X., Wei, G., Liu, X., and Fang, G. (2008). The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 374, 533-537.

Zhang, H., Hong, H., Li, D., Ma, S., Di, Y., Stoten, A., Haig, N., Di Gleria, K., Yu, Z., Xu, X.N., *et al.* (2009a). Comparing pooled peptides with intact protein for accessing cross-presentation pathways for protective CD8+ and CD4+ T cells. *The Journal of biological chemistry* 284, 9184-9191.

Zhang, J.P., Yan, J., Xu, J., Pang, X.H., Chen, M.S., Li, L., Wu, C., Li, S.P., and Zheng, L. (2009b). Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Journal of hepatology* 50, 980-989.

Zhou, J., Shen, X., Huang, J., Hodes, R.J., Rosenberg, S.A., and Robbins, P.F. (2005). Telomere length of transferred lymphocytes correlates with in vivo persistence and tumor regression in melanoma patients receiving cell transfer therapy. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 175, 7046-7052.

Zhu, J., Cote-Sierra, J., Guo, L., and Paul, W.E. (2003). Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity* 19, 739-748.

Zhu, J., Guo, L., Watson, C.J., Hu-Li, J., and Paul, W.E. (2001). Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 166, 7276-7281.

Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L., and Paul, W.E. (2006). GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell research* 16, 3-10.

Zimmerli, S.C., Harari, A., Cellerai, C., Vallelia, F., Bart, P.A., and Pantaleo, G. (2005). HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 7239-7244.

Zou, W., and Restifo, N.P. (2010). T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews Immunology* 10, 248-256.

Zwaveling, S., Ferreira Mota, S.C., Nouta, J., Johnson, M., Lipford, G.B., Offringa, R., van der Burg, S.H., and Melief, C.J. (2002). Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 169, 350-358.

ANNEXE

Article 3 : A long peptide from MELOE-1 contains multiple HLA class II T cell epitopes in addition to the HLA-A*0201 epitope: an attractive candidate for melanoma vaccination.

Rogel A, Vignard V, Bobinet M, Labarriere N, Lang F

Cancer Immunol Immunother. 2011 Mar;60(3):327-37. doi: 10.1007/s00262-010-0938-6.
Epub 2010 Nov 16

Cet article, antérieur à mes travaux de thèse auquel j'ai participé lors de mon stage de Master 2, visait à définir un potentiel long peptide vaccinal issu de MELOE-1, contenant l'épitope de classe I préalablement décrit. La région choisie a donc été la région C-terminale de cet antigène. Pour cela, des PBMC de donneurs sains ont été stimulés avec le long peptide MELOE-1₂₆₋₄₆ qui comprend l'épitope MELOE-1₃₆₋₄₄ déjà décrit, reconnu par des lymphocytes T CD8⁺ dans le contexte HLA-A*0201. Deux clones T CD4 spécifiques de deux épitopes de classe II (MELOE-1₂₄₋₃₇ et MELOE-1₃₂₋₄₄) distincts ont été isolés à partir de microcultures contenant des lymphocytes T CD4 répondeurs issus de deux donneurs différents. Ces deux épitopes T sont reconnus dans les contextes HLA-DRβ1*1101 et HLA-DQβ1*0603 respectivement. Enfin, nous avons démontré que les cellules dendritiques chargées avec le long peptide naturel MELOE-1₂₂₋₄₆ qui contient aussi bien les deux épitopes de classe II que l'épitope de classe I étaient capables de stimuler des réponses T CD4 et T CD8 à partir des PBMC de donneurs sains exprimant les allèles HLA restreignant la réponse, suggérant fortement que ce long peptide est un bon candidat pour la mise en place de stratégies de vaccination thérapeutique dans le cadre du mélanome (**Figure 30**). Les perspectives de cette étude, réalisées dans le cadre de mes travaux de thèse, étaient de caractériser tous les épitopes de classe II présents sur l'ensemble de la protéine MELOE-1, et de définir le type de réponses T CD4 induites à partir de PBMC de patients.

Titre : L'antigène de mélanome MELOE-1 : expression tissu-spécifique et immunogénicité.

Dans l'optique de développer de nouvelles approches d'immunothérapie dans le mélanome, nous sommes intéressés à l'antigène MELOE-1 dont l'implication dans l'immunosurveillance du mélanome avait été montrée. Ce travail a permis d'une part de mieux documenter l'immunogénicité de cet antigène et d'autre part de définir les mécanismes de régulation impliqués dans l'expression du gène *meloe*, deux pré-requis pour une utilisation en vaccinothérapie. Nous avons montré que l'expression du gène *meloe* était contrôlée à la fois par des facteurs de transcription spécifiques du mélanome et par le statut de méthylation de sa région promotrice, spécifiquement hypométhylée dans la lignée mélanocytaire. Ces deux niveaux de contrôle restreignent l'expression de *meloe* aux cellules mélanocytaires. En ce qui concerne l'immunogénicité de l'antigène MELOE-1, un des produits issu de la traduction de *meloe*, nous avons identifié six épitopes de classe II situés dans différentes régions de la protéine, en plus de l'épitope de classe I déjà décrit. De plus, nous avons montré que l'antigène MELOE-1 était capable d'induire des réponses CD4 *in vitro* majoritairement Th1 à partir des lymphocytes circulants de tous les patients porteurs de mélanome testés. Enfin, des résultats préliminaires suggèrent que l'antigène MELOE-1 entier, ou un long peptide dérivé de cet antigène sont plus efficaces que l'épitope minimal de classe I pour induire *in vitro* des réponses T CD8 robustes à partir de lymphocytes T circulants. L'ensemble de ces résultats permettrait donc d'envisager l'utilisation de longs peptides dérivés de MELOE-1 pour l'immunothérapie du mélanome.

Mots-clés : MELOE-1, mélanome, facteurs de transcription, méthylation, immunogénicité, lymphocytes T CD4, long peptide, vaccination anti-tumorale

Title : MELOE-1 melanoma antigen : tissue-specific expression and immunogenicity

In order to develop new approaches of immunotherapy in melanoma, we focused on MELOE-1 antigen which is involved in immunosurveillance in melanomas. This study allowed to better document the immunogenicity of this antigen and to define the mechanisms involved in the regulation of *meloe* gene expression, two prerequisites for a use as a cancer vaccine. We showed that *meloe* gene expression was controlled both by melanoma specific transcription factors and by the methylation status of its promoter region, specifically hypomethylated in the melanocyte lineage. These two levels of control lead to the exclusive expression of *meloe* gene in melanocytic cells. Regarding the immunogenicity of MELOE-1 antigen, a product resulting from the translation of *meloe* gene, we identified six class II epitopes in different regions of the protein, in addition to the class I epitope already described. Furthermore, we showed *in vitro*, that MELOE-1 antigen was able to induce CD4 responses predominantly Th1 from circulating lymphocytes of all melanoma patients tested. Finally, preliminary results suggest that whole MELOE-1 antigen or a long peptide derived from this protein are more effective than the minimal class I epitope to induce robust CD8 T cell responses *in vitro* from circulating T lymphocytes. Taken together, these results make the use of long peptides derived from MELOE-1 relevant for melanoma immunotherapy.

Key-words: MELOE-1, melanoma, transcription factors, methylation, immunogenicity, T CD4 lymphocytes, long peptide, anti-tumor vaccination