

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

Année 2011

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Étude de l'immunogénicité de longs peptides d'antigènes de mélanomes humains *in vitro*, et *in vivo* chez des souris HLA-A2 transgéniques : implication en vaccinothérapie.

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie
Spécialité : Immunologie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Joë-Marc CHAUVIN

Le 20 décembre 2012, devant le jury ci-dessous

Président : Daniel SPEISER Professeur, Ludwig Institut for Cancer Research, Lausanne
Rapporteurs : Daniel SPEISER, Armelle BLONDEL, Docteur, Institut Cochin, Paris

Examineur : Jean-Baptiste LATOUCHE, Docteur, INSERM U614, Rouen

Directeur de thèse : Francine JOTEREAU, Professeur, INSERM U892, Nantes

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier très sincèrement le Pr. Francine Jotereau envers qui j'ai grande estime et qui m'a offert l'opportunité d'effectuer ma thèse au sein de son équipe, sur un sujet particulièrement intéressant et motivant de part l'intérêt thérapeutique des longs peptides et l'aspect préclinique des expériences. Il y avait (et il y a toujours) tellement de choses à étudier sur les longs peptides modifiés que le sujet s'est vite orienté dans plusieurs directions prometteuses que nous n'avons malheureusement pas toutes pu explorer au maximum. J'ai apprécié d'ailleurs votre grande implication dans les projets ainsi que votre savoir scientifique et bibliographique que vous m'avez fait partager (en dépit de ma mémoire pas toujours efficace). Étant votre dernier étudiant en thèse, j'espère vous avoir laissé tout de même une bonne impression. Bonne retraite à vous.

Je remercie mes deux rapporteurs, le Dr. Armelle Blondel et le Pr. Daniel Speiser pour avoir consacré du temps à l'étude de ce manuscrit, et pour avoir accepté, de même que le Dr. Jean-Baptiste Latouche, de participer à mon jury de thèse. Bonne continuation dans votre carrière et vos recherches.

Je remercie également le Dr. Armelle Blondel et Renée Langagne pour leur accueil chaleureux lors de notre collaboration sur l'étude *in vivo* de la réponse aux longs peptides Melan-A, bien que les résultats ne fussent pas à la hauteur de nos espérances.

Je remercie mon prédécesseur et tous mes collègues, membres, ex-membres ou stagiaires de l'équipe 3 (et des autres bien sûr) que j'ai côtoyé au cours de ces presque 3 ans et demi dans une ambiance très agréable, toujours cordiale : je pense particulièrement à Nathalie et aux filles, notamment Anne, Juliette et Virginie qui m'ont formé à la culture des lymphocytes T (mais aussi la culture musicale des années 80) et conseillé pour la cytométrie. Je n'oublie pas le club des homonymes et leurs complices, ni les garçons : notamment Guillaume, mon « colocataire » en quelque sorte, le duo de choc formé par Yannick et Jérémie aidés parfois par Romain, toujours là pour mettre l'ambiance. J'ai une pensée particulière pour François, qui en plus d'être collègue de travail est devenu collègue d'Aikido et qui continue (malgré les tarifs qui ont rapidement découragé la grande majorité du labo) de déjeuner au self du CHU en ma compagnie. J'ai beaucoup appris auprès de vous, alors sans oublier les personnes que je n'ai pas citées : un grand merci à toutes et à tous.

Il me reste une petite place pour remercier tous les gens qui m'ont soutenu durant cette thèse et en particulier ma famille, qui m'a manquée de si peu voir durant tout ce temps.

Abréviations

Ac : Anticorps

ADCC : Cytotoxicité dépendante d'anticorps

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

Ag : antigène

APC : Cellules présentatrices d'antigènes

ARN : Acide RiboNucléique

BDCA : Blood Dendritic Cell Antigen

BMDC : Cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse

BTLA : B and T lymphocytes attenuator

CD : Cellule Dendritique

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CTL : Lymphocytes T Cytotoxique

CTLA : Cytotoxique T Lymphocytes Antigen

DAMP : Danger Associated Molecular Patterns

DC-SIGN : DC specific ICMA3-grabbing non integrin

EGFR : Récepteur au facteur de croissance épithélial

GM-CSF : facteur de stimulation de colonies de granulocytes-macrophages

HLA : Human Leucocyte Antigen

IDO : indolamine-2,3-dioxygénase

IFN : Interféron

IL : Interleukine

MAGE : Mélanocyte AntiGEN

MDSC : Cellules suppressives d'origine myéloïde

NK : Natural Killer

PAMP : pathogen associated molecular patterns

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique

PBL : lymphocytes du sang périphérique

pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde

PD-(L)1 : Programmed cell death (ligand) 1

PRR : pattern recognition receptor

RI : Réponse Immunitaire

SPARC : protéine acide sécrétée riche en cystéines

TAP : Tip Associated Protein

T- $\gamma\delta$: T gamma-delta

TGF : Transforming Growth Factor

Th : T helper

TIL : Lymphocytes infiltrant la tumeur

TLR : Toll-Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNFR : TNF-récepteur

TRAIL : TNF-related apoptosis inducing ligand

Tregs : Lymphocytes T régulateurs

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Table des Matières

Abréviations	
Table des Matières.....	
Introduction	1
1. Le mélanome	2
1. 1. Définition et caractéristiques.....	2
1. 2. Voies oncologiques du mélanome	3
1. 3. Épidémiologie et traitements.....	4
2. Le concept d'immunosurveillance des cancers.....	5
2. 1. La théorie des trois « E ».....	7
Figure 1 : L'immunosurveillance du cancer, par Shreiber et al. dans Science, 2011.	8
2. 2. L'échappement tumoral.....	9
3. Induction des réponses immunitaires adaptatives à médiation cellulaire.....	11
3. 1. Les réponses d'immunité innée.	11
3. 2. L'activation des lymphocytes T.....	11
3. 3. Les CD et le concept de la présentation croisée.	14
3. 4. Vers une réponse T cytotoxique optimale : le help CD4.	16
4. Les antigènes du mélanome	17
4. 1. Melan-A/MART-1.....	18
Figure 2 : Schéma de la protéine Melan-A/MART-1 et localisation de ses épitopes.	19
4. 2. NA17-A / GnTV (glucosaminyl N-acetyl-transférase V).	20
4. 3. NY-ESO-1.....	21
5. L'immunothérapie des cancers :	21
5. 1. L'administration d'anticorps monoclonaux ciblant la tumeur.	22
5. 2. Les thérapies visant à stimuler le système immunitaire.....	23
5. 2. 1. Molécules activatrices des cellules immunitaires :	23
5. 2. 2. Inhibiteurs des voies immunosuppressives :	24
5. 3. Les thérapies visant à renforcer les réponses T par transfert de lymphocytes anti-tumoraux.....	25
5. 3. 1. L'injection de TILs et de PBL enrichis :	26
5. 3. 2. Clones et lymphocytes génétiquement modifiés :	26
5. 4. Les thérapies visant à induire de nouvelles réponses T par vaccination.	27
5. 4. 1. La vaccination épitopique.....	27

5. 4. 2. La vaccination par longs peptides (LP) :	28
Figure 3 : Vaccination épitopique versus vaccination par longs peptides.....	29
5. 4. 3. La vaccination par des vecteurs viraux.....	30
5. 4. 4. La vaccination par des CD chargées en antigènes.....	30
Résultats	31
1. Introduction	32
2. Matériel et méthode.....	34
Figure 4 : Informations sur les peptides synthétiques.....	35
3. Étude de la capacité de cross-priming d'un long peptide de l'antigène Melan-A/MART-1 contenant l'épitope A2 immunodominant naturel ou optimisé pour un meilleur ancrage au HLA.	39
3. 1. Un ancrage optimisé de l'épitope immunodominant Melan-A 26-35 est nécessaire pour conférer à un long peptide contenant cet épitope une efficacité de cross-priming de lymphocytes T anti-tumoraux.....	39
TITLE.....	40
INTRODUCTION	42
RESULTS	48
DISCUSSION.....	52
REFERENCES.....	56
FIGURES.....	59
FIGURE LEGENDS	61
3. 2. Le LP Melan-A 16-40 A27L stimule des réponses plus importantes que le LP naturel chez les PBMC de patients.	64
Figure W1 : Le LP Melan-A 16-40 A27L induit une amplification conséquente de lymphocytes T spécifiques et tumeur-réactifs chez des patients atteints de mélanome.....	65
3. 3. Le LP Melan-A 16-40 A27L est plus immunogénique que le LP naturel dans un modèle murin de vaccination.....	65
Figure W2 : Les lymphocytes de souris immunisées avec le LP Melan-A modifié reconnaissent mieux la cellule tumorale humaine que ceux des souris immunisées avec le LP naturel.....	67
Figure W3 : La restimulation avec le 26-35 _{A27L} des lymphocytes de souris AAD génère plus de réponse aux épitopes naturels et modifiés si elles ont été immunisées avec le LP modifié par rapport au LP naturel.....	68
Figure W4 : Le LP Melan-A modifié montre son immunogénicité comparé long peptide naturel dans un modèle murin.....	69
4. Étude <i>in vitro</i> de la capacité du long peptide Melan-A 16-40 modifié à stimuler des lymphocytes T CD4 et rôle des CD4 dans le priming des CD8.	69
4. 1. Introduction.....	69
4. 2. Influence des CD4 sur le priming des CD8 spécifiques de Melan-A/A2.....	70

Figure X1 : Impact des T CD4 ⁺ sur la proportion de T CD8 ⁺ Melan-A spécifiques.....	71
Figure X2 : Impact des T CD4 ⁺ et des agents de maturation des APC sur le nombre des T CD8 ⁺ Melan-A spécifiques.....	73
4. 3. Réponse CD4 spécifique et amplification de la réponse.....	73
Figure X3 : Réponses CD4 spécifiques au LP 16-40 _{A27L} après stimulation puis perte des réponses après re-stimulation par le mix de peptides chevauchants.....	74
4. 4. Des lymphocytes CD4 stimulés par le LP modifié reconnaissent des peptides de séquence naturelle.....	75
Figure X4 : Analyse de la réactivité du puits 24 du donneur 8 aux différents peptides du mélange en autoprésentation.....	76
5. Étude des voies d'internalisation et de présentation croisée du LP Melan-A 16-40 _{A27L}	77
5. 1. Introduction.....	77
5. 2. L'internalisation du LP est un phénomène actif qui implique l'actine.....	77
Figure Y1 : La cytochalasine D inhibe spécifiquement présentation croisée, contrairement aux autres inhibiteurs de l'internalisation testés.....	79
5. 3. L'internalisation et la présentation croisée sont influencées par les interactions des récepteurs membranaires mais ne dépendent ni des récepteurs scavengers ni des récepteurs aux intégrines.....	80
Figure Y2 : L'engagement de PRR d'endocytose n'influence pas spécifiquement la présentation croisée du LP modifié.....	80
Figure Y3 : Le traitement des CD par des anticorps anti-CMH-I augmente la présentation croisée du LP comparée à un Ac contrôle.	81
5. 4. Il existe une voie de dégradation du LP secondaire, délétère pour l'épitope et dépendante du protéasome.....	82
Figure Y4 : Une fraction du LP emprunte une voie de dégradation délétère dépendante du protéasome.	83
5. 5. Analyse de la présentation croisée de longs peptides fluorescents pour la mise au point d'une étude de l'internalisation par microscopie confocale.	84
Figure Y5 : Présentation croisée d'un LP Melan-A 16-41 _{A27L} fluorescent couplé en position C terminale contrairement aux LP couplés en position N terminale.....	85
6. Étude de la présentation croisée de longs peptides dérivés de trois antigènes du mélanome et de leur capacité de cross-priming.	86
6. 1. Introduction.....	86
6. 2. Le LP Melan-A 21-40 _{A27L} permet une présentation croisée durable mais un priming induisant une amplification plus précoce et peu durable de lymphocytes spécifiques comparé au 16-40 _{A27L}	87
Figure Z1 : Présentation croisée efficace et à long terme du peptide Melan-A 21-40 modifié A27L.....	88
Figure Z2 : Le 21-40 _{A27L} génère des lymphocytes spécifiques capables de répondre précocement à la cellule tumorale.	90
Figure Z3 : Le 21-40 _{A27L} stimule efficacement des réponses spécifiques mais moins durablement que le 16-40 _{A27L}	91

6. 3. Un 30mer contenant l'épitope NA17A génèrent une présentation croisée par des CD plus durable qu'un 20mer chimère.....	91
Figure Z4 : Comparaison de la présentation croisée à long terme et de la présentation exogène.	93
6. 4. Un long peptide NY-ESO contenant un épitope-A2 optimisé pour la liaison au HLA induit une présentation croisée durable contrairement à la séquence naturelle. 93	
Figure Z5 : Comparaison de la réponse d'un clone spécifique de l'épitope A2 NY-ESO-1 à la présentation exogène du peptide court naturel (PCN) ou modifié (PCM) ou à la présentation croisée du LP modifié.	95
Figure Z6 : Impact d'un agent réducteur sur la présentation des épitopes NY-ESO-1 naturels et modifiés.....	96
Figure Z7 : L'épitope NY-ESO modifié est présenté de façon durable contrairement au naturel.....	97
Discussion.....	98
Bibliographie.....	107
— A —.....	108
— C —.....	110
— D —.....	111
— E-F —.....	113
— G —.....	113
— H —.....	115
— I —.....	115
— J —.....	116
— K —.....	116
— L —.....	118
— M —.....	119
— N —.....	119
— O —.....	120
— P —.....	120
— R —.....	120
— S —.....	122
— T —.....	123
— U-V —.....	124
— W —.....	125
— Y-Z —.....	125
Résumé et Mots clés.....	

Introduction

1. Le mélanome

1. 1. Définition et caractéristiques.

Les mélanocytes sont des cellules pigmentaires localisées majoritairement au niveau de la peau, mais aussi dans la rétine, l'iris et l'oreille interne. Dans la peau, elles sont spécialisées dans la protection contre le stress des ultra-violets. Ces rayonnements très énergétiques induisent des radicaux libres, déclenchent un stress oxydatif et provoquent des cassures de la molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) des cellules. Les mécanismes de réparation de l'ADN peuvent conduire à des erreurs, des mutations, dont l'impact peut être important sur les mécanismes cellulaires. Si l'ADN est trop endommagé, cela entraîne la mort de la cellule par apoptose via l'activation d'une voie métabolique impliquant la protéine p53 (Vousden and Lu, 2002). Les mélanocytes résistent mieux à ce stress que les autres types cellulaires grâce à un environnement paracrine particulier, qui favorise leur production de mélanine, d'enzymes antioxydantes, de protéines anti-apoptotiques tel que Bcl2, ainsi que les mécanismes de réparation de l'ADN (Abdel-Malek et al., 2010). Toutefois, Ceci n'empêche pas l'apparition de mutations pouvant se révéler oncogéniques et favorise par conséquent la survie de cellules susceptibles d'en posséder.

Suite à un dérèglement des mécanismes cellulaires, favorisé par les mutations, les mélanocytes peuvent se mettre à proliférer localement et causer des tumeurs bénignes (naevus acquis ou congénital au niveau de la peau) ou maligne, alors appelées mélanomes, qui sont à 90% d'origine cutanée. Le type cellulaire à l'origine de cette tumeur cutanée maligne la distingue des deux autres : le sarcome (tissu épithélial) et le carcinome (tissu conjonctif). En plus des mutations fréquentes au sein des tumeurs sur des gènes tels p53 ou bcl2 (Vogelstein and Kinzler, 2004) qui leur confèrent une résistance à l'apoptose, le mélanome conserve la capacité des mélanocytes à résister aux radiations d'ultra-violets très énergétiques en s'aidant de protéines impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN et de la pigmentation (Pak et al., 2004). Il a de surcroît un fort potentiel métastatique avec des récives tardives (au delà de dix ans).

1. 2. Voies oncologiques du mélanome.

Le tissu tumoral est composé de nombreuses cellules à différents stades d'évolution et de différenciation. Certaines tumeurs sont plus hétérogènes que d'autres mais toutes sont caractérisées par leur capacité proliférative. Cette faculté implique la présence au sein des tumeurs de cellules souches cancéreuses : des progéniteurs exprimant la télomérase (une enzyme préservant l'intégrité des extrémités chromosomiques, offrant une capacité proliférative infinie) et ayant acquis une mutation levant le contrôle du cycle cellulaire. Dans le mélanome, il s'agit de progéniteurs mélanocytaires, ou de mélanocytes en partie dédifférenciés par des mutations. Ces cellules expriment souvent CD133, une molécule caractéristique de lignage embryogénique, qui permet de les identifier au sein du tissu (Sabatino et al., 2009). En fonction de la situation (mutations, facteurs paracrines etc...), la cellule va passer d'un côté ou de l'autre de la balance générée par le facteur MITF : principal facteur de différenciation mélanocytaire impliqué dans la prolifération cellulaire et dans la production des pigments, et par BNR2 : facteur inhibiteur de MITF et impliqué dans la motilité cellulaire. La présence simultanée de deux sous-populations aux profils opposés (prolifération / motilité) favorise la formation et l'expansion *in vitro* de microsphères tumorales dans un modèle tridimensionnel sur matrice de collagène, modèle qui illustre bien leur capacité d'expansion *in vivo* (Thurber et al., 2011)

Plusieurs voies peuvent être impliquées dans l'oncogenèse du mélanome, impliquant un certain nombre de gènes et de protéines déterminantes (Ko et al., 2010). La grande majorité des mélanomes expriment une mutation sur la protéine Braf, la rendant constitutivement active. Cette protéine est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et de la différenciation par l'intermédiaire de la voie des MAP-kinases. Cette mutation seule ne suffit cependant pas à générer une cellule tumorale et conduit normalement à un arrêt du cycle et à la sénescence. D'autres mutations coopératives sont nécessaires et il apparaît par exemple dans 10 à 20% des mélanomes, une inactivation de la protéine Pten qui régule la voie des protéines kinases Akt. Celles-ci, également mutées ou amplifiées dans la majorité des mélanomes, favorisent une voie anti-apoptotique en phosphorylant de nombreuses cibles tel Bad (protéine pro-apoptotique antagoniste de Bcl2) et le facteur nucléaire Nf- κ B au centre de la signalisation intracellulaire (Fresno Vara et al., 2004).

Il existe d'autres mutations types en fonction de la localisation des tumeurs, qui vont conduire aux mêmes voies intracellulaires et leurs conséquences (Ko et al., 2010). Pour les mélanomes oculaires on note la mutation fréquente du gène gnaq, codant pour la sous unité α

d'une protéine G. Ces protéines sont associées à un grand nombre de récepteurs transmembranaires et sont par conséquent impliquées dans la régulation de diverses voies intracellulaires. Pour les mélanomes des paumes et des muqueuses, on remarque des mutations du récepteur kinase c-Kit, en amont des protéines Ras. En plus d'activer la voie de Braf, le récepteur c-Kit va activer la voie des PI-3 kinases également en amont des Akt. Cette voie fournit une protection supplémentaire contre la mort induite par les ligands associés aux facteurs de nécrose tumorale (TNF) et induisant l'apoptose (TRAIL) (Larribere et al., 2004).

1. 3. Épidémiologie et traitements.

Bien que peu fréquent, le mélanome est en nette progression dans les pays industrialisés depuis les quinze dernières années durant lesquelles son incidence, ou du moins sa détection, a doublé, passant à 18/100000 nouveau cas par an. En France, elle est de plus de 1/10000 habitants, soit 6000 à 8000 nouveau cas par an. Plus de 130000 mélanomes sont diagnostiqués dans le monde chaque année et le risque est de 0,53% pour les populations caucasiennes (Garbe and Leiter, 2009).

Cette tumeur cutanée est facilement observable mais il faut pouvoir la distinguer d'un naevus bénin. Le diagnostic s'établit principalement sur la base de critères simples mais caractéristiques nommés d'une part « ABCDE » pour Asymétrie, Bords irréguliers, Couleur hétérogène, Diamètre supérieur à 7 millimètres et Élévation ou Évolution progressive récente (critère qui doit coexister avec l'un des quatre précédents), ou d'autre part « les trois C » (Changement de Couleur et de Contour) associés à quatre critères mineurs (diamètre supérieur à 7 millimètres, troubles sensitifs, saignements, inflammation).

Il existe des classifications variées et détaillées du mélanome en fonction de son évolution, les plus utilisées étant celles de l'Union Internationale Contre le Cancer et de « l'American Joint Committee on Cancer ». Toutefois, le pronostic de guérison des patients est encore plus catégorique. En effet, il est de 80 à 90% en l'absence de métastases mais dès que l'on observe une première atteinte ganglionnaire, le taux de survie chute à 35%, puis il passe à 12% si des métastases se diffusent.

En cas de suspicion d'un mélanome, la première étape consiste en une exérèse chirurgicale de la tumeur primaire (qu'elle soit effectivement maligne ou bien bénigne) avec une marge variable pouvant inclure l'hypoderme. L'échantillon de peau est ensuite analysé par une étude anatomopathologique. Ceci permet d'établir un diagnostic et de classer la lésion

pour donner les éléments pronostics nécessaires à la mise en place d'une stratégie thérapeutique. Si l'examen clinique qui s'en suit laisse apparaître une atteinte ganglionnaire, on préconise un curage de la zone atteinte, bien que cela comporte un risque non négligeable de complications inflammatoires. Un traitement par chimiothérapie localisée peut être associé en cas de récurrence locale ou la suspicion de nodules en transit. Les chimiothérapies agissent de manière peu ciblée en visant la prolifération cellulaire. Malgré leur efficacité sur l'inhibition de la progression tumorale, elles touchent généralement d'autres cellules saines, ce qui provoque inévitablement des effets secondaires. Il est ensuite nécessaire d'effectuer une surveillance post-thérapeutique durant toute la vie du patient en cas de récurrence. Toutefois, devant l'inefficacité des traitements actuels dans les formes métastatiques de la maladie, de nouvelles molécules et approches thérapeutiques sont testées depuis plusieurs années pour essayer de cibler les cellules tumorales, ou d'induire une réponse de l'organisme. Parmi les diverses molécules et anticorps étudiés, certains offrent des résultats encourageants. Ils visent à neutraliser les différentes voies oncogéniques du mélanome (Ras, B-Raf...) ou ses mécanismes de survie et de progression métastatique (CXCL1, SPARC...) en les ciblant directement (Botton et al., 2011; Fenouille et al., 2011; Vultur et al., 2011). Une autre approche prometteuse consiste à utiliser le potentiel du système immunitaire à reconnaître et éliminer des cibles spécifiques dans un contexte inflammatoire, ce sont les concepts d'immunothérapie (Garbe et al., 2011).

2. Le concept d'immunosurveillance des cancers.

Le système immunitaire est capable de reconnaître, contrôler et détruire des cellules de l'organisme devenues « anormales » à condition de disposer d'un microenvironnement favorable. Les cellules cancéreuses ne peuvent alors se développer que si elles échappent au système immunitaire. C'est le concept d'immunosurveillance proposé par Burnet en 1970 (Burnet, 1970) suite à l'hypothèse de Thomas en 1959 (Burnet, 1957) ; (Thomas, 1959) selon lequel l'immunité à médiation cellulaire serait le principal mécanisme impliqué dans l'élimination des tumeurs.

Ce sont les modèles murins de tumeurs chimio ou radio-induites développés à partir des années 1940 et 50 qui ont permis d'établir l'immunogénicité et la spécificité antigénique

des tumeurs implantées chez des souris syngéniques (Boon and Van Pel, 1978; Prehn and Main, 1957) en montrant notamment que l'immunisation contre une lignée tumorale mutée *in vitro* induit une réponse immunitaire T spécifique de la tumeur d'origine, qui n'était pas rejetée spontanément. Cette expérience montre que l'immunisation peut induire une réponse T protectrice spécifique d'antigènes (Ag) qui n'induisent pas spontanément une telle réponse, ce qui est sans doute le cas des antigènes de tumeurs humaines. Cette observation justifie déjà le principe d'immunothérapie chez l'Homme, qui permettrait de déclencher, à partir d'une réponse spécifique d'un seul Ag de la tumeur, une réaction immunitaire à d'autres Ag. Les études des réactions immunitaires ont été poursuivies sur des modèles de tumeurs humaines greffées à des souris immunodéprimées : souris SCID et KO rag/γc (Koo et al., 2009). Enfin, les mécanismes de l'immunosurveillance des cancers ont été déduits en grande partie des modèles de tumeurs murines endogènes (induites par le methylcholanthrène ou par l'activation conditionnelle d'oncogènes) en neutralisant par génie génétique différents effecteurs de l'immunité et en mesurant leur impact sur l'incidence des cancers. L'action bénéfique du système immunitaire sur le contrôle du développement tumoral étant établi chez l'animal, il a ensuite été recherché chez l'Homme. Ainsi, les études ont fourni de nombreux arguments indirects à l'appui d'une immunosurveillance des cancers. Parmi ceux-ci : le fait que les tumeurs soient infiltrées par de nombreux lymphocytes T, que cette infiltration corrèle avec un pronostic favorable (Galon et al., 2006; Husby et al., 1976; Underwood, 1974), et le fait que des immunosuppressions d'origines variées soient associées à une augmentation de l'incidence de nombreux cancers (Gatti and Good, 1971).

Malgré l'impact bénéfique de certaines réponses immunitaires des études réalisées dans les années 2000 ont révélé l'ambivalence des relations entre le système immunitaire et les cancers. En effet, d'une part la pression qu'exerce le système immunitaire sur les cellules tumorales en éliminant certaines cellules (contrôle sur la quantité) favorise la sélection d'un phénotype plus résistant (contrôle sur la qualité) des cellules tumorales (Imai et al., 2000; Shankaran et al., 2001). D'autre part l'inflammation associée aux cancers et l'instabilité génétique des cellules tumorales semblent contribuer fréquemment à l'établissement d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur et pro-tumoral. Ces résultats ont conduit à concevoir une nouvelle théorie selon laquelle l'immunosurveillance de la tumeur évoluerait au cours du temps et serait divisée en trois phases dite des « 3E » : Elimination, Equilibre, Echappement (Dunn et al., 2002; Dunn et al., 2004; Vesely et al., 2011).

2. 1. La théorie des trois « E »

Basée sur de nombreuses observations et expériences, cette théorie illustrée par la figure 1, décrit l'évolution de la tumeur de par sa relation étroite avec le système immunitaire. Tout débute par la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire inné et adaptatif qui va enclencher la phase d'élimination. Les mécanismes exacts qui permettent la mise en place de la réponse anti-tumorale ne sont pas clairement établis et ce phénomène n'a pas été directement observé *in vivo*. Toutefois, on suppose que le développement tumoral, qui se fait aux dépens du tissu sain, favorise un contexte pro-inflammatoire par la libération de signaux de danger (appelés DAMP). Ce contexte favorise alors le recrutement et l'activation de cellules cytotoxiques de l'immunité innée telles que les cellules NK (natural killers) et les lymphocytes T gamma-delta (T- $\gamma\delta$) capables de reconnaître et de tuer des cellules tumorales exprimant des signaux de stress (Raulet and Guerra, 2009). Ce contexte favorise aussi le recrutement de cellules présentatrices d'antigènes (APC) telles que les cellules dendritiques (CD). La nécrose ou l'apoptose de cellules au sein du tissu tumoral va libérer des Ag qui seront alors capturés par les CD. Sous l'influence des DAMP, celles-ci peuvent alors mûrir et migrer dans un organe lymphoïde secondaire pour présenter les Ag tumoraux aux lymphocytes T naïfs. Cette présentation aux lymphocytes T CD8 (dite « présentation croisée » ou « cross-présentation ») et T CD4 va permettre l'activation initiale ou « priming » de ces lymphocytes puis leur multiplication et différenciation en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et CD4⁺ « helper » (Th). Les CTL et Th anti-tumoraux migrent ensuite dans la tumeur et peuvent à leur tour éliminer les cellules cancéreuses par cytotoxicité, via des récepteurs de morts tels que TRAIL et FAS-L ou par lyse directe via la libération de perforine et de granzymes suite à la reconnaissance d'un Ag qui leur est spécifique. Les lymphocytes activés (notamment les Th) et les CD libèrent également de nombreuses cytokines (Interleukines, Interférons, TNF) qui vont favoriser le contexte inflammatoire et la mise en place de la réponse (Figure 1, (Schreiber et al., 2011)). Ainsi, durant cette étape, la tumeur sera contrôlée par le système immunitaire, voire entièrement éliminée.

La relation dynamique entre le système immunitaire et la tumeur conduit à une phase d'équilibre, qui peut durer de nombreuses années. Durant cette période certaines cellules tumorales peu prolifératives et/ou peu immunogènes auront survécu à la phase d'élimination. Les échanges entre les deux systèmes devenus tous deux moins agressifs, conduisent à une homéostasie. La tumeur est dite « en dormance » : elle est contrôlée mais continue d'évoluer lentement (Aguirre-Ghiso, 2007; Schreiber et al., 2011). La balance peut pencher en faveur

d'un système ou de l'autre mais plus il se maintient dans le temps plus il y a de risques que les cellules tumorales échappent au contrôle et prennent le dessus. En effet, durant cette longue phase, les cellules tumorales vont subir une pression importante du système immunitaire, notamment par les lymphocytes cytotoxiques qui libèrent beaucoup d'IFN γ et de TNF, cytokines inflammatoires et catalyseurs des mécanismes de la reconnaissance antigénique. Cette pression conduit alors à un phénomène de sélection darwinienne que l'on nomme « immunoediting » (Schreiber et al., 2011). C'est l'observation de modèles murins de tumeurs chimio-induites qui a permis de vérifier ces hypothèses. En effet, l'immunogénicité des tumeurs diffère selon qu'elles sont induites dans des souris immunocompétentes ou dans des souris Rag^{-/-} dépourvues de lymphocytes. Lorsque des lignées cellulaires dérivées de ces tumeurs sont réinjectées dans des souris contrôles, celles ayant été au contact du système immunitaire adaptatif induisent une progression tumorale systématique, tandis que 40% de celles ne l'ayant pas été sont rapidement rejetées (Shankaran et al., 2001).

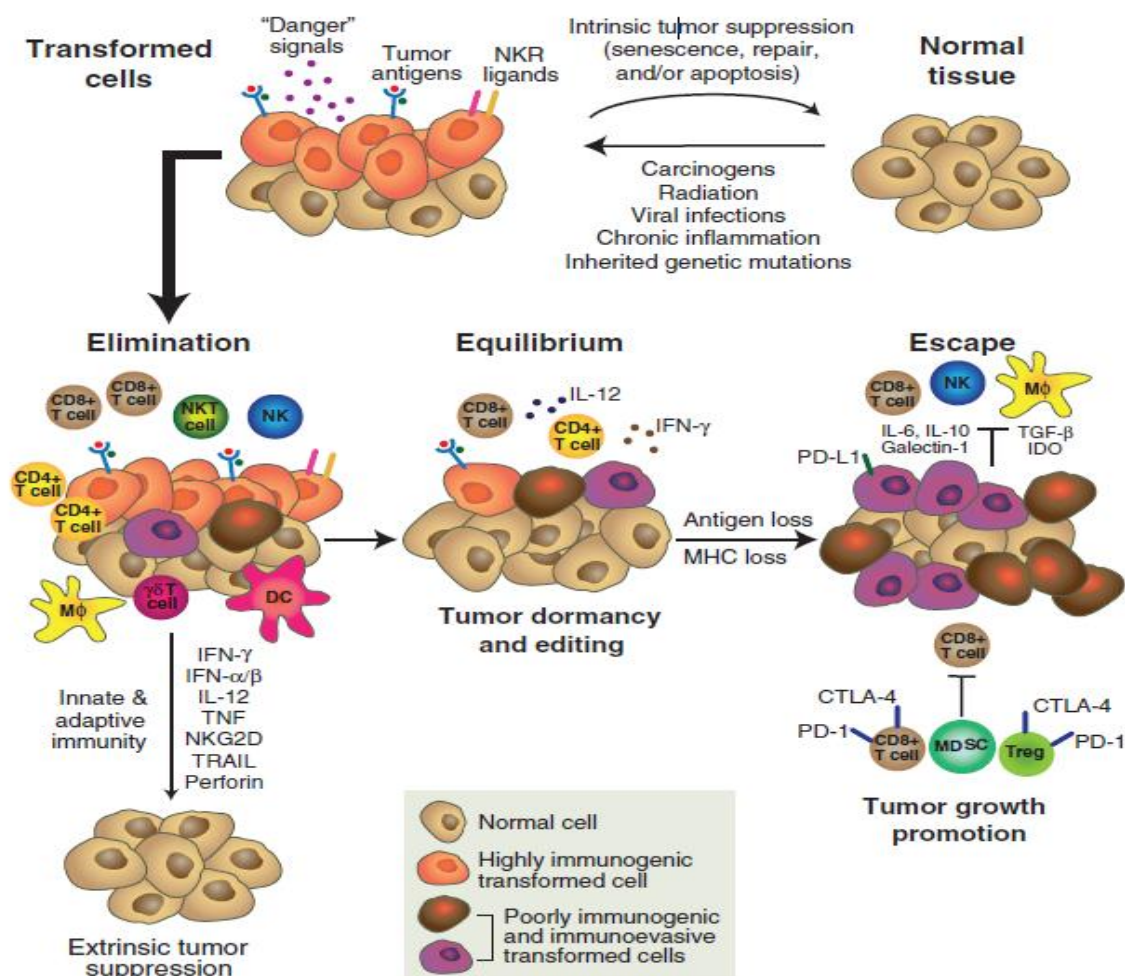


Figure 1 : L'immunosurveillance du cancer, par Shreiber et al. dans Science, 2011.

NKT: Lymphocytes T natural killer, Mφ: Macrophages, MDSC: cellule suppressive d'origine myéloïde, Treg: Lymphocyte T régulateur.

Alors que les cellules tumorales continuent de proliférer et de muter, la pression du microenvironnement et du système immunitaire sélectionne les variants les plus adaptés à survivre. Ces clones résistants, capables d'échapper par divers mécanismes à la mort, prennent le dessus au sein du tissu tumoral. Ils vont alors permettre à la tumeur de proliférer brusquement voire générer des métastases : c'est la phase d'échappement. C'est souvent durant cette phase tardive, durant laquelle la tumeur prend de l'ampleur, qu'on parvient à la détecter. Les mécanismes de survie et de résistance qu'elle a acquis la rendent plus ou moins ardue à éliminer.

2. 2. L'échappement tumoral

L'accumulation dans les tumeurs de nombreuses modifications génétiques ou épigénétiques et l'apparition de nouveaux facteurs micro-environnementaux offrent ensuite à celles-ci des possibilités de « camouflage » et de résistance (Poschke et al., 2011). La désactivation des mécanismes de présentation d'antigènes (perte de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, molécules TAP) ou de la réponse aux cytokines pro-inflammatoires (comme les récepteurs aux Interférons (IFN) et autres protéines impliquées dans la transduction des signaux), sera le moyen le plus adéquat pour se cacher aux yeux du système immunitaire. Les modifications favorisant la résistance sont celles forçant la survie cellulaire en dépit de tous les facteurs contradictoires de l'environnement. On trouvera par exemple une surexpression de molécules anti-apoptiques comme bcl2 ou une activation constitutive de p53, d'oncogènes codant pour des protéines anti-apoptotiques, ou de gènes codant pour des récepteurs de mort cellulaire tels que la molécule FAS (induisant la mort des lymphocytes T). L'évolution de la tumeur et de son microenvironnement ainsi qu'une inflammation devenant chronique vont favoriser la mise en place de mécanismes d'immunosuppression via l'expression au sein du tissu, soit par les cellules tumorales elles-mêmes, soit par les cellules immunitaires infiltrantes de ligands ou de cytokines régulatrices. On aura une accumulation au sein de la tumeur de nombreuses sous populations régulatrices telles que les cellules myéloïdes suppressive, les macrophages suppresseurs, les cellules dendritiques tolérogènes... (Allavena et al., 2010; Ostrand-Rosenberg, 2010; Vasievich and Huang, 2011) qui peuvent en plus avoir un potentiel angiogénique (2008 Nat Rev Cancer Murdock_C), ainsi que des lymphocytes T régulateurs (Elkord et al., 2010).

Par ailleurs, les cellules tumorales expriment elles-mêmes de nombreuses molécules contribuant à supprimer ou limiter la réponse immunitaire (RI) anti-tumorale telles que les galectines (Demydenko and Berest, 2009; Liu and Rabinovich, 2005), le récepteur inhibiteur de l'activation T et B nommé BTLA (Derre et al., 2010), TIM-3 (Fourcade et al., 2010; Sakuishi et al., 2010), le récepteur CTLA-4 qui limite l'activation T chronique (Contardi et al., 2005), PD-L1 aussi nommé B7-H1, le ligand d'un récepteur inhibiteur exprimé par les lymphocytes activés de façon prolongée, (Dong et al., 2002). Plusieurs de ces ligands sont en fait impliqués dans le rétrocontrôle normal de la réponse immunitaire afin d'éviter une inflammation chronique.

Deux cytokines immunorégulatrices : le transforming-growth factor (TGF) β et l'Interleukine (IL)-10 sont par ailleurs produites dans beaucoup de tumeurs, soit par les cellules tumorales elles-mêmes soit par les cellules immunosuppressives mentionnées plus haut. Le TGF- β a d'abord un effet anti-tumoral (anti-prolifératif et anti-invasif), mais celui-ci est rapidement compensé par son effet immunosuppresseur comme l'induction de Tregs et leur sécrétion d'IL-10, ainsi que par le détournement de certaines voies de signalisation à l'avantage de la cellule tumorale (Massague, 2008; Padua and Massague, 2009). L'IL-10 peut aussi être sécrétée par les cellules tumorales. Il va changer le profil de la réponse immunitaire en inhibant les CD et en favorisant l'apparition de Tregs (Elkord et al., 2010; Rabinovich et al., 2007).

Outre ces deux cytokines, de nombreux autres facteurs solubles immunosuppresseurs sont produits dans les tumeurs, notamment l'indoléamine-2-3-dioxygénase (IDO), produite par les cellules tumorales, les cellules myéloïdes suppressives et les CD tolérogènes. Cette enzyme agit en dégradant un acide aminé essentiel à l'activation des lymphocytes T : le tryptophane ; et induit des produits de dégradation toxiques de celui-ci (Katz et al., 2008). Les MIC solubles, des molécules inhibitrices du récepteur NKG2D indispensable à la cytotoxicité des cellules NK et des lymphocytes T cytotoxiques peuvent également être produites par les cellules tumorales (Flies and Chen, 2006; Zwirner et al., 2007).

Tous les mécanismes d'échappement qui peuvent advenir au niveau de la tumeur lui permettent de progresser en dépit de l'action du système immunitaire. Outre la stimulation des réponses immunitaires anti-tumorales, le second objectif majeur des immunothérapies en développement est donc la neutralisation simultanée des mécanismes d'échappement. Dans cette perspective il faut identifier les mécanismes d'échappement majeurs qui sont à l'œuvre dans les différents cancers en traitement. De nombreuses études abordent actuellement cette

question, principalement par le biais de la détermination du profil d'expression génique propre à chaque tumeur (Gajewski et al., 2011; Melief and Finn, 2011).

3. Induction des réponses immunitaires adaptatives à médiation cellulaire.

3. 1. Les réponses d'immunité innée.

Les réponses d'immunité innée précèdent et sont nécessaires aux réponses immunitaires adaptatives. Elles sont spécialisées en fonction de la nature des signaux de danger (DAMP) présents. Ces signaux vont induire la production de cytokines par les premières cellules immunitaires innées activées présentes sur le site tumoral, ainsi que par celles recrutées par la suite. Les composantes des réponses favorables à l'induction de l'immunité adaptative à médiation cellulaire de type antivirale sont en grande partie connues et dépendent des PAMP (pathogen associated molecular patterns) viraux. On suppose donc leur implication dans la réponse à une tumeur d'origine virale. On ne connaît pas en revanche les composantes de l'immunité innée induite précocement par les tumeurs d'origine non virale. L'induction d'une réponse cytotoxique efficace implique probablement celle d'une réponse CD4 Th1 voire Th17 et donc la production d'IL-12 et d'IFN- γ . Les cellules dendritiques et les cellules NK sont probablement les cellules de l'immunité innée les plus concernées par l'induction de ces réponses, comme illustré figure 1. D'autres cellules comme les NKT et les T $\gamma\delta$ pourraient jouer un rôle.

3. 2. L'activation des lymphocytes T.

La réponse adaptative du système immunitaire met en jeu les lymphocytes T, CD4 et CD8 cellules très spécialisées dans la reconnaissance antigénique. Les lymphocytes T CD4 orchestrent toutes les réponses immunitaires (RI) adaptatives mais c'est la sous population Th1 qui joue un rôle majeur grâce à sa collaboration avec les lymphocytes CD8 cytotoxiques dans les RI à médiation cellulaire.

Le répertoire des lymphocytes T naïfs est produit et sélectionné dans le thymus par l'interaction de leur récepteur avec des complexes constitués de peptides du soi et des molécules du CMH-I ou CMH-II, présentés par les cellules épithéliales corticales du thymus. Ce répertoire est ensuite réduit par la mort des thymocytes dont le TCR interagit avec une forte affinité avec les complexes CMH-peptides du soi présentés par les cellules dendritiques médullaires du thymus. Ce répertoire va ensuite circuler, par le sang et la lymphe, en traversant les organes lymphoïdes secondaires jusqu'à ce qu'il rencontre son antigène (Koch and Radtke, 2011). L'activation des lymphocytes T naïfs, ou priming, se fait généralement dans les organes lymphoïdes secondaires. Elle nécessite trois types de signaux : antigénique, de co-stimulation, de survie et différenciation.

Tout d'abord, le lymphocyte T doit reconnaître par l'intermédiaire de son complexe TCR-CD3, et du corécepteur CD8 ou CD4, la molécule CMH présentant l'Ag qui lui est spécifique. Ce sera généralement sur une cellule dendritique (CD). Mais cette interaction seule ne suffit pas. Les molécules d'adhérence ICAM-1 du lymphocyte et LFA-1 de la CD renforcent le signal antigénique. De plus le récepteur CD2 est activé par son ligand ubiquitaire LFA-3, ce qui amplifie l'activation dépendante du TCR et induit la sécrétion de cytokines (Kaizuka et al., 2009; Le Guiner et al., 1998).

L'absence d'un second signal conduit à l'anergie des lymphocytes T. Ce signal, obtenu par l'interaction de récepteurs co-activateurs du lymphocyte T avec les ligands des CD est donc indispensable leur activation. De plus, afin d'obtenir une activation optimale, le lymphocyte doit interagir plusieurs heures avec une CD par une structure dynamique nommée synapse immunologique (Dustin and Depoil, 2011). Lors de cette interaction, les lymphocytes et les CD activées vont exprimer plusieurs corécepteurs afin de renforcer puis de stopper leurs interactions (Croft, 2003). Beaucoup de ces récepteurs appartiennent aux familles des récepteurs du TNF et des molécules B7. Les principaux sont :

- Le CD28, qui est le récepteur de co-stimulation majeur. Il est activé par CD80 et CD86, deux molécules de la famille B7. Le CD86 est exprimé principalement par les CD. L'activation des CD va augmenter l'expression de cette molécule et induire l'expression de CD80 (Greenwald et al., 2005; Sharpe and Freeman, 2002). Il existe un autre ligand de CD80 et CD86 nommé CTLA-4. Ce récepteur est exprimé par les lymphocytes T après plusieurs heures d'activation. Ce n'est pas un récepteur activateur mais au contraire un récepteur inhibiteur impliqué dans le rétrocontrôle négatif naturel de l'activation des lymphocytes T (Rudd et al., 2009).

- Le CD27, activé par CD70, agit précocement et va favoriser la division du lymphocyte T (Hintzen et al., 1995)

- 4-1BB, de la superfamille des TNF récepteurs (TNFR) lie 4-1BB ligand. Il joue un rôle tardif mais important dans la co-stimulation car il agit sur de nombreux éléments tel que la prolifération, la capacité de la cellule à devenir effectrice, mais aussi sa survie par l'intermédiaire d'une augmentation de BCLXL (agoniste de BCL2) (Hintzen et al., 1995; Starck et al., 2005; Wen et al., 2002).

- L'expression d'OX40 sur les lymphocytes T et celle de son ligand OX40L sur les CD n'est pas constitutive mais induite respectivement par l'interaction du TCR et la liaison de divers molécules activatrices (CD40, lipopolysaccharide...). Cette interaction est donc tardive mais néanmoins importante pour perpétuer l'effet d'activation induit par le CD28 (Dawicki et al., 2004; Ishii et al., 2010).

- Le CD40L, molécule de la superfamille des TNFR, apparaît principalement sur les CD4 une fois activés, et va interagir avec CD40 exprimé par la plupart des cellules immunitaires dont le CD. Cela va favoriser l'activation des CD et des T CD8 dans le cadre des RI à médiation cellulaires (Clarke, 2000; Rocha and Tanchot, 2004; Schoenberger et al., 1998).

Le troisième signal nécessaire à la survie des lymphocytes et à la différenciation des lymphocytes T, est l'ensemble des cytokines libérées par le microenvironnement et par les APC (Curtsinger and Mescher, 2010). Il en existe une très grande variété avec de nombreuses redondances de signalétiques intracellulaire distinguant plusieurs grands groupes. Les familles d'interleukines 1 (dont 18 et 33) et 2 (dont 15 et 7) favorisent la survie et l'activation des lymphocytes (Ben-Sasson et al., 2009; Gaffen and Liu, 2004; Kim and Williams, 2010; Smith, 2011; Weber et al., 2010), tandis que les autres (IL4, 6, 10, 12, 17, 21...) orientent le type de réponse immunitaire via la différenciation des sous-types de CD4 helpers (Th). Les cytokines ont un rôle essentiel dans l'induction ou le contrôle de l'inflammation.

L'ensemble de ces mécanismes d'activation des lymphocytes T sont également nécessaires pour réactiver une réponse effectrice à partir de lymphocytes mémoires (Sprent and Surh, 2011). Pour que les conditions de stimulation des lymphocytes soient optimales, il faut donc que le contexte (microenvironnement inflammatoire, co-stimulation, cytokines) concorde, et surtout que la cellule présentatrice d'antigène soit elle-même activée et maturée de façon adéquate.

3. 3. Les CD et le concept de la présentation croisée.

Les complexes CMH-I-peptides sont exprimés de façon quasi-ubiquitaire sur toutes les cellules par une voie d'apprêtement antigénique dite « classique » (Reits et al., 2003; Williams et al., 2002). Cette présentation cible majoritairement des protéines nouvellement synthétisées présentant un défaut fonctionnel. Elle passe par une étape d'ubiquitination et la dégradation se fait par le protéasome ou d'autres enzymes (Schubert et al., 2000). Les cellules présentent ainsi des Ag du soi mais également des Ag viraux, bactériens ou tumoraux suivant la situation.

Les lymphocytes T CD8 naïfs, même s'ils reconnaissent leur Ag spécifique sur une cellule de l'organisme, ne seront pas capables d'induire une réponse effectrice sans l'importante étape préalable de priming par une CD qui se fait dans un organe lymphoïde secondaire. Les CD capturent les Ag et sont activées via leurs PRR (Pattern recognition receptors) par les signaux de danger PAMP et DAMP (Takeuchi and Akira, 2010). Cette stimulation induit chez les CD la présentation des antigènes internalisés sur les molécules du CMH-I et/ou II, cette présentation est dite « croisée » lorsqu'elle concerne les CMH de classe I pour la différencier de la voie endogène classique. L'activation de la CD induit également l'augmentation la densité des CMH et des molécules de co-stimulation à sa surface, et sa migration de la cellule dans l'organe lymphoïde secondaire drainant. La CD dispose de trois principaux mécanismes actifs pour capturer les Ag :

- la macropinocytose (Kerr and Teasdale, 2009), permettant aux APC grâce au réseau d'actine, d'englober dans invagination de sa membrane plasmique, du milieu extracellulaire avec les molécules qu'il peut contenir (nutriments, facteurs solubles, antigènes...),
- l'endocytose par l'intermédiaire d'un réseau de clathrine ou de cavéoline autour de divers récepteurs (Doherty and McMahon, 2009; Vyas et al., 2008),
- la phagocytose, dépendante de l'actine, qui permet d'internaliser de larges particules pouvant aller jusqu'à des cellules entières (apoptotiques ou nécrotiques).

La capture des Ag par ces deux derniers mécanismes, met en jeu de nombreux récepteurs d'endocytose (récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines, scavengers, lectine C like, langerine, DC-SIGN, CD91 et Lox-1, ...)

Les CD sont au centre de l'immunité, faisant le lien entre immunité innée et adaptative. (Granucci et al., 2005; Greenberg and Grinstein, 2002; Palucka and Banchereau, 1999). Elles ont différentes origines : les CD différenciées tissu-spécifiques et les CD circulantes (Kushwah and Hu, 2011). Ces deux types cellulaires sont peu abondants, ce qui les rend difficile à étudier. Parmi les CD circulantes on distingue plusieurs sous-types caractérisés par l'expression de marqueurs spécifiques : les BDCA1 (CD1c)⁺, les plus abondantes, les BDCA3⁺, les plus rares mais qui semblent spécialisées dans la présentation croisée et les BDCA2(CD123)⁺BDCA4⁺ qui correspondent aux cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (Dzionek et al., 2000; Jongbloed et al., 2010; Narbutt et al., 2004; Poulin et al., 2010). Bien que leur rôle spécifique ne soit pas encore bien connu, chaque sous-population semble posséder des fonctions particulières comme le montre leur capacité différente à réagir et à présenter les antigènes (Schnurr et al., 2005). Les CD myéloïdes conventionnelles semblent spécialisées dans la présentation croisée. Les pDC en comparaison, sont spécialisées dans la réponse antivirale. Elles répondent aux stimuli viraux qu'elles détectent notamment via les toll-like récepteurs (TLR) 3 et 7 capables de lier des fragments d'ADN et d'ARN viraux. Cette activation déclenche leur maturation et la libération massive d'IFN α pro-inflammatoire (Di Pucchio et al., 2008; Dudziak et al., 2007; Hoeffel et al., 2007; Izaguirre et al., 2003). Par ailleurs, les monocytes sont capables de phagocytose et interagissent étroitement avec le système immunitaire. Ce sont des précurseurs capables de générer des CD quand ils sont recrutés dans un foyer inflammatoire et ils représentent une proportion importante des leucocytes du sang (Auffray et al., 2009; Randolph et al., 2008; Yona and Jung, 2010).

Les voies de présentation croisée des Ag par les CD ne sont pas encore toutes élucidées mais suivant le mode d'internalisation, la particule antigénique se retrouvera dans différents compartiments ou phagosomes et transitera éventuellement dans le cytosol via des récepteurs de rétrotranslocation suivant ensuite, pour le chargement des peptides, une voie dépendante ou indépendante de la protéine TAP (Burgdorf and Kurts, 2008; Monu and Trombetta, 2007). La dégradation de la particule s'effectuera soit par le protéasome, soit par d'autres enzymes, avec ou non l'aide d'une acidification du compartiment (lysosome). Le lieu et les modalités de chargement sur les CMH-I restent mal connus (Merzougui et al., 2011). Les peptides générés seront ensuite chargés, suivant la voie empruntée (Burgdorf et al., 2007; Merzougui et al., 2011) soit sur des CMH-I soit nouvellement synthétisés (comme dans la voie classique) soit de recyclage, puis présentés à la surface aux lymphocytes T (Ackerman et al., 2006; Graham et al., 2007; Robson et al., 2010; Shen and Rock, 2006; Vyas et al., 2008).

La présentation croisée des antigènes par les CD possède deux caractéristiques qui semblent indispensables à l'activation optimale des populations CD8 cytotoxiques effectrices et mémoires : la durée, par rechargement prolongée des molécules du CMH-I à partir d'un stock intracellulaire de l'antigène, et une capacité de stimulation des lymphocytes T CD8 encore incomplètement caractérisée, généralement dépendante de l'activation simultanée des T CD4 par la CD et du « licensing » en retour de la CD par ceux-ci.

3. 4. Vers une réponse T cytotoxique optimale : le help CD4.

En fonction des signaux de maturations que forment les PAMP, les DAMP, et les cytokines de type TNF et IFN (Diamond et al., 2011; Godefroy et al., 2011), les CD vont sécréter des cytokines et se spécialiser vers un profil associé à la génération de certains types de lymphocytes T CD4 helpers. Ces derniers diffèrent en fonction de leurs sécrétions cytokiniques principales et du rôle qui leur est associé (Kaiko et al., 2008). Toutes ces populations peuvent se retrouver à un moment ou un autre au sein des tumeurs en fonction du microenvironnement (Kennedy and Celis, 2008). Le profil Th1, semble le plus efficace pour le help associé à la réponse T cytotoxique.

La coopération CD4 apparaît indispensable à l'élaboration de la réponse cytotoxique optimale (Bennett et al., 1997; Horne et al., 2007; Rocha and Tanchot, 2004). Elle se fait sans doute à deux niveaux : lors du priming dans les organes lymphoïdes secondaires au contact des CD et lors de la phase effectrice au sein du tissu infecté ou tumoral. Lors du priming, il est admis que la coopération passe à la fois par l'interaction CD40L/CD40 entre le CD4 et la CD qui rend cette dernière capable d'activer le T CD8 de façon optimale et par l'IL2 sécrété, qui apparaît être indispensable à leur expansion (Blachere et al., 2006; Feau et al., 2011). Une interaction directe peut également se faire entre les CD4 et les CD8 via l'interaction CD40/CD40L (Rocha and Tanchot, 2004). De plus, l'interaction des CD4 et des CD via le CD40 et le CMH-II dans les ganglions lymphatiques entraîne la production de chimiokines qui va permettre un recrutement massif des CD8 et favoriser la sélection de clones spécifiques de la réponse (Kumamoto et al., 2011).

4. Les antigènes du mélanome

L'immunogénicité avérée du mélanome a poussé les chercheurs à découvrir quels étaient les antigènes reconnus par les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs). Les Ag ainsi identifiés dans les mélanomes ont été classés en différentes catégories suivant leur modalité d'expression. (Renkvist et al., 2001).

Il existe des antigènes spécifiques de tumeurs, qui forment une cible privilégiée pour l'immunothérapie car ils écartent les risques de réaction autoimmune, ce sont :

- Les Ag « cancer germ line » ou « cancer-testis ». L'un de ces antigènes MAGE-A1 (Melanoma AntGEN family A) a été le premier Ag tumoral ayant été identifié par la méthode génétique d'identification des antigènes T mise au point chez la souris, par le groupe de Thierry Boon à Bruxelles (De Plaen et al., 1997; van der Bruggen et al., 1991). D'autres Ag apparentés ont ensuite été découverts par la même méthode, la plupart dans le mélanome, donnant naissance à un classement de ces gènes en trois familles : BAGE (Boel et al., 1995), GAGE (Van den Eynde et al., 1995), LAGE dont NY-ESO-1 (Chen et al., 1998; Chen et al., 1997), SSX-2 (Sahin et al., 1995; Tureci et al., 1996). L'expression de ces gènes situés principalement sur le chromosome X est normalement restreinte aux cellules germinales qui n'expriment pas la molécule HLA. Dans le cas des tumeurs, c'est généralement une déméthylation des promoteurs qui va générer une expression aberrante des Ag et les faire apparaître en surface (Ohman Forslund and Nordqvist, 2001; Sang et al., 2011), (<http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>).

- Les Ag résultants d'anomalies génétiques proviennent de protéines générées codées par les gènes altérés lors de la transformation tumorale : mutations et autres erreurs de réparation de l'ADN, translocations et réarrangements chromosomiques comme B-raf, (Dessars et al., 2007). Certaines de ces altérations sont uniques et donc restreintes au patient tandis que d'autres sont partagées car oncogéniques, comme la mutation activatrice de B-raf, ou de p21ras. Il existe d'autres mécanismes générant des antigènes spécifiques de tumeur mais qui ne sont pas représentés spontanément dans le mélanome humain tels que les oncogènes viraux.

- Les antigènes d'expression aberrante tels que les peptides codés par des introns comme NA-17A (Guilloux et al., 1996) ou des pseudogènes (NA-88), ou bien des cadres ouverts de lecture dits ORF (LAGE-1, gp75...).

On trouve également, dans le mélanome, des antigènes du « soi » :

- Les antigènes surexprimés, qui sont des protéines déjà présentes à un taux basal dans la cellule mais qui vont se retrouver plus ou moins amplifiées dans certains cancers. Ce sont souvent des protéines qui vont offrir un avantage de survie à la cellule tumorale, notamment BCLX-L, p53 et la Telomérase dans le mélanome. Ces antigènes sont des cibles potentielles mais problématiques car leur ubiquité génère un risque important d'autoimmunité.

- Les antigènes de différenciation cellulaire, qui sont spécifiques de tissus et sont exprimés à la fois par les cellules saines et les cellules tumorales. Ces antigènes ne peuvent être la cible d'immunothérapie que si les cellules saines qui les expriment ne sont pas vitales à l'organisme. C'est le cas du mélanome, qui présente plusieurs antigènes de différenciation (tels que gp100/Pmel17, tyrosinase, Melan-A/MART-1...) très étudiés pour l'immunothérapie de cette tumeur, car hautement exprimés et partagés par les cellules de mélanome et les mélanocytes. En effet, le déclenchement d'une réaction auto-immune face aux mélanocytes ou aux cellules pigmentaires de l'œil et de l'oreille (tel que le vitiligo ou des rétinopathies) suite à une réaction contre ces antigènes ne présenterait pas de risque majeur pour la vie du patient et peuvent être contrôlable par des anti-inflammatoires (Yeh et al., 2009). Récemment un nouvel antigène de différenciation prometteur nommé MELOE a été découvert grâce à un clone issu de TILs amplifiés (isolés chez un patient resté sans rechute dix ans après leur réinjection) reconnaissant toutes les lignées de mélanomes restreintes A2 (Godet et al., 2010; Godet et al., 2008).

4. 1. Melan-A/MART-1.

C'est une protéine membranaire exprimée spécifiquement par la lignée mélanocytaire à un haut niveau protéique et dans plus de 80% des mélanomes quelque soit leur stade (Coulie et al., 1994; Kawakami et al., 1994a). Melan-A est une protéine membranaire de type III présente dans le mélanosome dans lesquels la mélanine est synthétisée. Il s'agit d'un polypeptide de 118aa qui présente une forte homologie avec la forme murine. Les deux noms de cet antigène, viennent des deux équipes qui l'ont découvert la même année : Melan-A, donné par l'équipe de T. Boon et MART-1 (Melanoma Antigen Recognised by T cells) donné par l'équipe de S. A. Rosenberg.

Le rôle de la protéine Melan-A n'a pas encore été déterminé avec exactitude. Il semble qu'elle participe à la maturation des mélanosomes en régulant directement et de différentes

façons (expression, stabilité, trafic et apprêtement) la protéine gp100 (De Maziere et al., 2002; Hoashi et al., 2005) qui est elle-même impliquée dans la maturation des mélanosomes en participant à la formation de sa matrice membranaire et constitue aussi un antigène de différenciation fréquemment exprimé par les mélanomes (Berson et al., 2001; Berson et al., 2003; Kushimoto et al., 2001; Yasumoto et al., 2004). Melan-A possède une demi-vie de quatre heures avant d'être dégradée par le protéasome (Rimoldi et al., 2001) ou par le lysosome (Levy et al., 2005).

La dégradation de la protéine Melan-A (qu'elle soit naturelle ou par le biais d'une APC) génère différents épitopes reconnus par les lymphocytes T (<http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/differentiation.htm>). Plusieurs d'entre eux sont regroupés au début de la région transmembranaire 26-47 (Figure 2) : les épitopes CD8 immunodominants 26 et 27-35 HLA-A2 (Coulie et al., 1994; Kawakami et al., 1994b) et des épitopes CD4 (Bioley et al., 2006).

Bien que certains lymphocytes T CD8 soient strictement spécifiques du nonamère AAGIGILTV (Derre et al., 2007), il existe généralement une reconnaissance croisée par les TILs du décimère EAAGIGILTV, avec une affinité souvent identique (Romero et al., 1997).

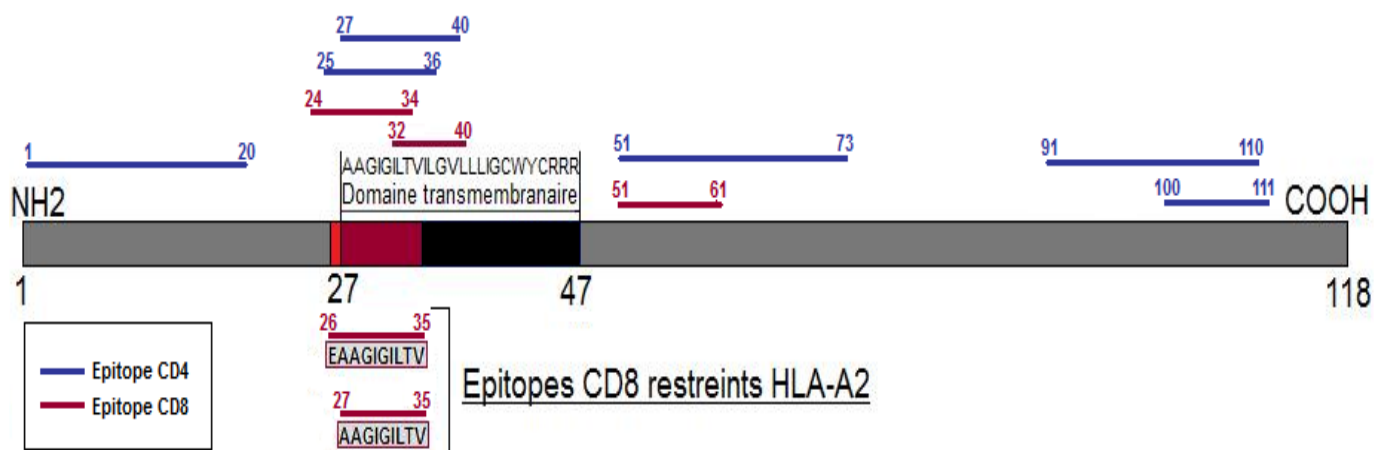


Figure 2 : Schéma de la protéine Melan-A/MART-1 et localisation de ses épitopes.

Ces épitopes Melan-A/A2 ne présentent pas une très bonne affinité de liaison au HLA car il leur manque un résidu d'ancrage en position 2 de la séquence (Valmori et al., 1998). Toutefois, ils sont une cible importante du mélanome car la fréquence du répertoire T CD8 spécifiques est exceptionnelle dans les lymphocytes du sang périphérique (PBL) aussi bien chez les patients que chez les donneurs sains. Cette fréquence très élevée, comparée pour d'autres antigènes du mélanome, a été évaluée par différentes techniques : soit en stimulant

des TILs, soit en marquant les cellules naïves avec des complexes multimériques CMH-peptide (Alanio et al., 2010; Seiter et al., 2002). L'hypothèse proposée pour expliquer un taux si élevé de précurseurs dirigés contre cet antigène du soi, est qu'il y aurait dans le thymus la présentation de nombreux peptides ayant des similitudes de séquence (et probablement de conformation) qui induirait la sélection positive de nombreux thymocytes ayant une réactivité croisée pour les complexes Melan-A/A2. De tels peptides ont été effectivement identifiés dans les bases de données protéiques (Dutoit et al., 2002; Loftus et al., 1996; Loftus et al., 1998). De plus, la faible stabilité de liaison des complexes HLA-A2-peptides Melan-A, liée à l'absence d'un résidu d'ancrage, n'induirait pas la sélection négative.

Afin d'améliorer la stimulation des lymphocytes et le potentiel vaccinal de ces deux épitopes, différentes modifications de la séquence ont été réalisées et étudiées (Valmori et al., 1998). Si le remplacement de l'alanine en position 2 n'a pas montré d'efficacité sur le nonamère, plusieurs décamères portant une modification se sont montrés plus affins que le décamère d'origine. Celui qui a été retenu pour sa stabilité, son affinité, et sa capacité à stimuler efficacement le plus grand nombre de clones spécifiques est le décamère ELAGIGILTV pour lequel l'alanine en position 27 a été remplacée par une leucine (26-36 A27L).

4. 2. NA17-A / GnTV (glucosaminyl N-acetyl-transférase V).

L'antigène NA17-A est dérivé d'un peptide aberrant issu du codage d'un intron de la séquence de la glucosaminyl N-acétyl transférase V (Guilloux et al., 1996), une enzyme impliquée dans l'ajout de chaînes glycosylées sur les protéines. Cette enzyme est surexprimée dans les mélanomes par rapport aux tissus sains et à la majorité des cancers. Les épitopes restreints HLA-A2 qui sont générés : 1-9 VLPDVFIRC et 1-10 VLPDVFIRCV, sont donc spécifiques de tumeur. Bien qu'il soit peu étudié, cet antigène semble un bon candidat pour l'immunothérapie du mélanome car il existe un répertoire T mémoires spécifique chez les patients, de fréquence supérieure à celle de beaucoup d'Ag du type « cancer germ-line » (Labarriere et al., 1998), la séquence présente des résidus prédisant un bon ancrage sur le HLA et cet antigène a la capacité d'être présenté de façon croisée par des DC mises en présence de cellules tumorales apoptotiques (Labarriere et al., 2002a).

4. 3. NY-ESO-1.

NY-ESO est un antigène exprimé par de nombreux types de tumeurs et souvent associé à des stades avancés. Il s'agit d'une protéine antigénique de type « cancer-germ-line », mais dont le rôle demeure inconnu. NY-ESO est très immunogénique, cet Ag est capable de déclencher des réponses humorales et une réponse T générées contre de nombreux épitopes (Gnjatic et al., 2006), une moitié de ceux-ci étant restreinte classe I (HLA-A, B et C) et l'autre classe II (principalement HLA-DR). Certains de ces épitopes ont encore été découverts récemment (<http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/tumorspecific.htm>). L'épitope T CD8 restreint HLA-A2 le plus étudié pour l'immunothérapie est la séquence 157-165 SLLMWITQC. La présence d'une cystéine en position 9 au niveau du second résidu d'ancrage au HLA rend ce peptide peu afin et sujet à des liaisons par pont disulfure. C'est pourquoi des études ont été menées, comme pour le peptide Melan-A, afin d'optimiser cet épitope en remplaçant la cystéine par une valine ou par un autre acide aminé et améliorer ainsi la reconnaissance de clones spécifiques *in vitro* (Chen et al., 2005; Chen, 2000; Romero et al., 2001).

5. L'immunothérapie des cancers :

Les cellules tumorales, suite aux nombreuses mutations génétiques ou épigénétiques qu'elles subissent, expriment souvent des molécules aberrantes parfois antigéniques et immunogènes (capables de recruter les cellules du système immunitaire). Ces antigènes, pouvant être très caractéristiques de la tumeur, sont des cibles privilégiées pour l'immunosurveillance spontanée et pour les immunothérapies. Cependant, les tumeurs développent aussi de nombreux mécanismes qui leur permettent d'échapper ou de résister à l'immunosurveillance, aux immunothérapies, et aux traitements d'une manière générale, de ce fait elles progressent souvent.

Les immunothérapies des cancers sont des traitements basés sur l'induction ou le transfert d'effecteurs de l'immunité chez les patients (anticorps développés chez l'animal, vaccinations, transfert de cellules immunitaires) pour éliminer les cellules tumorales. Le

principe des immunothérapies a été déduit des études réalisées sur les modèles murins de tumeurs, d'abord greffées puis endogènes. Une notion récente issue de ces derniers modèles et essentielle à la réussite de ces approches, est la compréhension du fait que les tumeurs endogènes acquièrent au cours du temps de nombreux mécanismes d'échappement. Par conséquent, le développement d'immunothérapies efficaces implique non seulement de transférer ou d'induire le développement d'effecteurs anti-tumoraux, mais aussi de neutraliser les mécanismes qui s'opposent à leur action. De nombreuses approches d'immunothérapie existent, on peut les classer de la sorte :

- L'administration d'anticorps (Ac) monoclonaux ciblant des molécules de surface des cellules tumorales et permettant leur reconnaissance par des cellules immunitaires et leur lyse directe par ADCC (Antibody dependent cell mediated cytotoxicity), activation du Complément, induction de signaux d'apoptose...,
- Les thérapies visant à stimuler les RI spontanées, innées ou adaptatives : cytokines activatrices, anticorps bloquants...
- Les thérapies visant à renforcer les réponses T par transfert de lymphocytes anti-tumoraux.
- Les thérapies visant à induire de nouvelles réponses T par vaccination.

Récemment, des études suggèrent l'intérêt de réaliser des thérapies combinées (chimio ou radiothérapie + immunothérapie) pour leur action synergique (Hannani et al., 2011; Kepp et al., 2011).

5. 1. L'administration d'anticorps monoclonaux ciblant la tumeur.

L'administration d'Ac monoclonaux déborde le domaine de l'immunothérapie. C'est le cas en particulier des Ac anti-angiogéniques et des Ac qui agissent essentiellement comme des inhibiteurs de récepteurs angiogéniques. On qualifie alors plus particulièrement l'administration de ces Ac de thérapies ciblée. Néanmoins des études récentes ont révélé que beaucoup d'Ac agissent par des mécanismes immunitaires tels que l'activation du Complément ou la lyse dépendante des Ac et peuvent donc aussi même être considérés comme des immunothérapies.

Beaucoup d'Ac ciblent des molécules de surface des cellules tumorales impliquées dans la croissance et la survie de ces cellules. On trouve ainsi les anti-HER2 ciblant les récepteurs tyrosine kinase HER2 aux facteurs de croissance épithéliaux, et les anti-EGFR

utilisés dans le traitement du mélanome, qui ciblent le récepteur au facteur de croissance épidermique impliqué notamment dans l'angiogénèse de la tumeur (Fish-Stegall et al., 2006). Les effets bénéfiques de ces Ac dans certains cancers sont avérés (Ward et al., 1997) et leurs modalités d'action exactes sont en cours d'études, telle que la nature des cellules impliquées dans l'ADCC et la contribution de l'activation du complément ou de l'induction directe de l'apoptose des cellules cancéreuses par suppression d'un mécanisme oncogénique.

Les Ac peuvent également être utilisés comme des véhicules, soit pour apporter de manière ciblée des agents toxiques (toxine ou radioélément) au contact des cellules cancéreuses et via l'interaction de leurs fragments Fab avec leur antigène exprimé spécifiquement par les cellules cancéreuses, soit pour cibler des molécules immunostimulantes au contact des cellules de l'immunité équipée de récepteurs pour les fragments Fc des Ac (Goldenberg and Sharkey, 2007; Milenic et al., 2010).

5. 2. Les thérapies visant à stimuler le système immunitaire.

5. 2. 1. Molécules activatrices des cellules immunitaires :

Les cytokines ont été utilisées en immunothérapie en tant qu'activateurs du système immunitaire et font l'objet d'études depuis une dizaine d'années chez la souris, notamment sous forme combinée à des antigènes ou aux anticorps (protéines de fusion) (Fournier et al., 2011; Lode et al., 1998). On trouve par exemple l'interleukine 12 dont le potentiel anti-tumoral a clairement été démontré chez l'animal (Kumagai et al., 1997). L'IL2, nécessaire en faibles doses à la survie des lymphocytes activés, le facteur de stimulation de colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et l'interféron- α pour stimuler les APC, ont été testés lors d'essais cliniques, parfois en combinaison. Leur effet potentialisateur sur l'amplification et la survie des populations lymphocytaires a été clairement établi, bien qu'il n'y ait pas de corrélation avec un effet clinique. Toutefois, il faut prendre en compte le fait que l'IL2 peut avoir un effet contraire en induisant la prolifération de lymphocytes T régulateurs (Block et al., 2011; de Gast et al., 2000; Di Pucchio et al., 2006; Sikora et al., 2009; Smith et al., 2003; Verra et al., 2003). Récemment, l'IL1 a aussi démontré sa capacité à amplifier une réponse T *in vivo*, incitant à l'utiliser comme adjuvant (Ben-Sasson et al., 2011).

D'autres types de molécules activatrices du système immunitaire : notamment les ligands des PRR tels les récepteurs toll-like sont étudiés afin de stimuler plus spécifiquement les CD qui vont intégrer l'antigène, comme par exemple les motifs CpG (2006; Kreiter et al.,

2011; Miconnet et al., 2002; Speiser et al., 2005; Tacken et al., 2011). Les essais réalisés ont clairement montré l'intérêt de telles molécules pour améliorer l'induction d'une réponse spécifique.

5. 2. 2. Inhibiteurs des voies immunosuppressives :

Afin de stimuler le système immunitaire, en particulier dans le contexte anti-tumoral, il faut également inhiber les mécanismes induisant l'échappement ou la régulation de la réponse immunitaire. Jusqu'à présent, les molécules développées et utilisées de la sorte sont en majorité des anticorps bloquant :

- les anti-CTLA-4, qui tendent à inhiber la voie de co-inhibition des lymphocytes T. Ils ont montré une certaine efficacité mais présentent un risque important d'autoimmunité qu'il faut pouvoir prendre en charge et qui remettent leur utilisation en cause (Callahan et al., 2010; Kahler and Hauschild, 2011).

- Les anti-PD-1, parfois associés avec les anti-CTLA-4, afin de bloquer les voies naturellement impliquées dans l'inhibition de la réponse à médiation cellulaire évitant la survenue d'une réponse chronique (Gajewski et al., 2011; Melief and Finn, 2011).

Récemment, la voie inhibitrice de la molécule BTLA (atténuateur des lymphocytes T et B) est à l'étude ainsi que l'utilisation de molécules inhibitrices spécifiques visant les cellules immunosuppressives (Tregs, cellules suppressives d'origine myéloïde ou MDSC) ou les molécules immunorégulatrices libérée dans le microenvironnement (IDO, TGF- β et IL-10) (Gajewski et al., 2011). D'après certains essais chez la souris, d'aucun suggère par exemple l'utilisation d'anticorps ciblant les lymphocytes T régulateurs tel qu'un anti-CD25, qui éliminerait préférentiellement cette population (mais aussi les lymphocytes T activés chez l'Homme) qui expriment le récepteur à l'IL2, ainsi que l'utilisation d'un anti-GITR (Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family related gene), un agoniste d'une molécule de co-stimulation exprimées par les lymphocytes T et abrogeant l'action des suppressive des Tregs) (Gajewski et al., 2011; Haynes et al., 2008; Mitsui et al., 2010; Rech and Vonderheide, 2009). Une récente étude clinique sur l'effet d'inhibiteurs potentiels de Tregs associés à un protocole de vaccination n'a cependant révélé qu'une efficacité très limitée sur la déplétion en Tregs, et seulement chez un certain nombre de patients (de Vries et al., 2011).

Combiner l'action des mécanismes d'immunosuppression et celle d'activateurs du système immunitaire dans des protocoles d'immunothérapie montre son efficacité dans les modèles murins et représente sans doute la seule voie d'avenir pour l'immunothérapie des tumeurs humaine (2010-Clin Cancer Res-Mitsui_J-Two distinct mechanisms of augmented antitumor activity by modulation of immunostim or inhibitory signals ; Takeda K. et al., JI 2010, Combination therapy of established tumors by antibodies targetting immune activating and suppressing molecules).

5. 3. Les thérapies visant à renforcer les réponses T par transfert de lymphocytes anti-tumoraux.

Le concept de cette immunothérapie consiste à sélectionner et amplifier des lymphocytes spécifiques d'un ou plusieurs antigènes de la tumeur, afin de les réinjecter au patient en grand nombre une fois stimulés *in vitro* (Dudley and Rosenberg, 2003; Dudley et al., 2003; Hershkovitz et al., 2010; Rosenberg and Dudley, 2009). C'est une démarche prometteuse qui a déjà montré des résultats cliniques (Gattinoni et al., 2006). Du fait de leur fréquence élevée, les lymphocytes T spécifiques de Melan-A/A2 sont fréquemment utilisés dans les essais contre le mélanome. Les lymphocytes injectés peuvent avoir plusieurs origines.

La présentation croisée est un phénomène essentiel à l'activation des lymphocytes T CD8 cytotoxiques et doit donc être prise en compte pour le développement des immunothérapies et notamment pour la vaccination (Kurts et al., 2010). L'identification des épitopes tumoraux a conduit à l'utilisation de séquences peptidiques minimales en vaccination. Malheureusement ces peptides ne permettraient pas une présentation efficace. En effet, d'une part ils se chargent sur les CMH-I par la voie exogène, et d'autre part ce chargement s'effectue sur des cellules non présentatrices d'antigènes qui n'expriment pas de molécules de co-stimulation, ce qui conduit à une présentation sous-optimale par ces cellules car peu durable. Une telle présentation conduit à l'induction de réponses cytotoxiques faibles et de durée limitée, voire à l'anergie ou l'apoptose de certains lymphocytes CD8 (Melief and van der Burg, 2008; Zanoni and Granucci, 2011).

5. 3. 1. L'injection de TILs et de PBL enrichis :

Les TILs de certaines tumeurs comme le mélanome ont l'avantage de contenir de nombreux lymphocytes spécifiques de la tumeur susceptibles de répondre à un nombre varié d'antigènes. Dans ce cas ces lymphocytes peuvent être obtenus par culture de fragments de tumeurs. Néanmoins cette approche est lourde et on a donc essayé par ailleurs d'obtenir de tels lymphocytes en induisant leur expansion par stimulation antigénique des PBL du patient en culture. Afin d'obtenir suffisamment de cellules à réinjecter, il faut donc passer par une étape d'amplification et/ou de stimulation *in vitro* de plusieurs semaines.

De nombreux essais cliniques ont ainsi été réalisés, en particulier dans le cadre du mélanome, aussi bien avec des TILs (Besser et al., 2010; Dudley et al., 2010; Labarriere et al., 2002b; Rosenberg et al., 2011a) que des PBL enrichis (Dreno et al., 2002; Dudley et al., 2002; Meidenbauer et al., 2003; Powell et al., 2006; Verdegaal et al., 2011). Des réponses cliniques, avec des régressions parfois complètes, ont ainsi pu être observées, démontrant l'intérêt de cette technique d'immunothérapie. Cette efficacité semble cependant dépendante de la qualité (avidité) des lymphocytes injectés mais aussi de l'administration de ceux-ci dans des conditions particulières comme une situation adjuvante ou après une lymphodéplétion et/ou une myéloablation sévères du patient (Dreno et al., 2002; Gattinoni et al., 2006; Rosenberg and Dudley, 2009).

5. 3. 2. Clones et lymphocytes génétiquement modifiés :

Très peu d'équipes dont la notre ont utilisé des lymphocytes clonés à partir des PBL du patient CD8. Injectés au stade métastatique en l'absence de lymphodéplétion, ces traitements ont induit quelques régression et/ou des stabilisations mais la plupart de ces réponses ont été de courte durée (Vignard et al., 2005; Yee et al., 2002; Yee et al., 2000).

Les résultats obtenus avec des clones autologues, ainsi que la difficulté et la durée d'obtention de ces derniers pour chaque donneur, en plus de la limite que représente la fréquence limitée du répertoire T spécifique de l'antigène d'intérêt, a conduit à l'élaboration d'une nouvelle stratégie. En prenant le problème à sa source, cette stratégie se base sur le récepteur T spécifique de l'antigène cible : il s'agit de transfecter des lymphocytes T cytotoxiques avec un TCR de forte affinité pour un antigène tumoral, puis de les réinjecter au patient après avoir vérifié leur réactivité face à l'antigène (Park et al., 2011; Turtle and Riddell, 2011). Se basant sur des études contemporaines *in vitro* et chez la souris, des essais

de phase I ont déjà été réalisés avec l'observation de réponses cliniques, confirmant l'intérêt de cette approche pour le traitement de cancers variés (Duval et al., 2006; Morgan et al., 2006; Ochi et al., 2011; Wang et al., 2011).

5. 4. Les thérapies visant à induire de nouvelles réponses T par vaccination.

Les vaccinations anti-tumorales ont pour objectif d'induire la différenciation et ou l'expansion des lymphocytes T CD8 cytotoxiques spécifiques d'antigènes de la tumeur du patient. Pour cela, différents agents vaccinaux (peptides, vecteurs viraux, cellules cancéreuses...) ont été étudiés et comparés chez la souris avant d'être évalués en clinique. Dans le cadre du mélanome, la plupart de ces vaccins ont été testés mais ils présentent des défauts importants. Ainsi, pour les vecteurs viraux, ils induisent une réponse anti-virale trop forte qui limite la réponse aux antigènes tumoraux ciblés. Quant aux vaccins ADN, ARN nus, ils restent pour l'instant faiblement antigéniques, sans doute en partie à cause des trop faibles concentrations utilisées. Les vaccins les plus étudiés ont été jusque là les peptides épitopiques, pour leur facilité de préparation et pour la simplicité d'évaluation des réponses T spécifiques qu'ils induisent. Par contre, les risques de tolérogénicité de ces vaccins, révélés par certaines études récentes, suggèrent que les candidats vaccins les plus intéressants sont d'une part les longs peptides contenant des épitopes CD8 et CD4 et d'autre part les vaccins utilisant, ou ciblant directement *in vivo*, des CD.

5. 4. 1. La vaccination épitopique.

Les essais basés sur la vaccination par des peptides épitopique se sont rapidement développés du fait de leur simplicité de production et d'administration. Les peptides épitopiques HLA-A2 dérivés de l'antigène Melan-A (nonamère, décamère et décamère modifié A27L) ont été utilisés dans divers essais, souvent couplés à d'autres antigènes A2 voire à des épitopes viraux stimulant les CD4, et généralement associés dans les essais les plus récents à des solutions adjuvantes afin d'optimiser la réponse anti-tumorale. Tous les essais ont été réalisés sur des patients métastatiques à haut risque et montrent que la vaccination induit des lymphocytes spécifiques de Melan-A avec un phénotype effecteur ou effecteur mémoire chez un certain nombre d'entre eux. Toutefois, le consensus établi en recoupant l'observation des réponses cliniques de différentes études veut qu'il n'y ait pas de

corrélation entre les deux (Cebon et al., 2003; Cormier et al., 1997; Di Pucchio et al., 2006; Jager et al., 2002; Lienard et al., 2004; Speiser et al., 2008; Valmori et al., 2003).

Les peptides courts présentent en fait beaucoup d'inconvénients qui peuvent nuire à leur efficacité (Figure 3). Tout d'abord ils sont rapidement dégradés par des protéases *in vivo* (Brinckerhoff et al., 1999) ensuite, leur chargement exogène sur les CMH-I de toutes les cellules conduit nécessairement à leur présentation par des cellules non présentatrices d'antigènes dont on sait qu'elle peut être toléro-gène (Melief and van der Burg, 2008). De plus, on sait que le priming des T naïfs implique que les antigènes soient présentés plusieurs heures par les CD (Hugues et al., 2006; Jusforgues-Saklani et al., 2008), ce que ne permet pas le chargement exogène à cause du recyclage rapide des CMH-I de surface et la dégradation rapide des peptides courts. Ces limites ont donc conduit à étudier des préparations vaccinales permettant d'induire une présentation des épitopes par les CD, telles que des liposomes, des vecteurs viraux, des protéines couplées ou non à un adjuvant (Robson et al., 2010), des complexes antigène-anticorps capables de se fixer sur les récepteurs aux Fc des APC, des Ag couplés à des Ac spécifiques de récepteurs des CD tels que DC-SIGN ou le mannose récepteur (Romani et al., 2010), les longs peptides et des CD chargées en antigènes par la voie endogène.

5. 4. 2. La vaccination par longs peptides (LP) :

Il est connu depuis longtemps que les longs peptides peuvent être internalisés et donner lieu à une présentation des épitopes par les CD capables de stimuler *in vivo* chez la souris des réponses T CD8 et CD4 helper (Fayolle et al., 1991; Kast et al., 1991). Des données plus récentes obtenues chez la souris montrent par ailleurs que ces longs peptides induisent une réponse T CD8 plus forte et plus durable que les épitopes correspondants et ont corrélié ces différences à la durée de présentation des épitopes dans les organes lymphoïdes secondaires ((Bijker et al., 2007; Melief and van der Burg, 2008), Figure 3).

Lorsque j'ai commencé ma thèse, aucun essai clinique utilisant des LP d'antigènes tumoraux n'avait été réalisé. Toutefois la présentation croisée durable de plusieurs épitopes d'antigènes de mélanome à partir de LP de ces antigènes avait été établie *in vitro* en utilisant des CD monocytoïdes (Faure et al., 2009). Récemment les premiers essais de vaccination utilisant des LP ont été réalisés l'un pour stimuler des réponses contre le VIH chez le macaque (Rosario et al., 2010) et deux autres chez l'Homme pour la prévention de la malaria

(Arevalo-Herrera et al., 2011; Herrera et al., 2011) et pour le traitement de lésions précancéreuses du col utérin induites par le virus papillome HPV-16 (col de l'utérus) (Kenter et al., 2009; Welters et al., 2010). Ces études ont démontré capacité des LP à induire une réponse T *in vivo*. De plus, l'essai de Kenter et al., a pu mettre cette réponse en corrélation avec les résultats cliniques observés contre les lésions précancéreuses du col de l'utérus.

Il apparaît donc majeur, suite à ces résultats encourageants, de tester l'efficacité vaccinale de longs peptides dérivés d'antigènes de tumeurs pour le traitement des cancers non associés à un virus, mais néanmoins immunogéniques comme le mélanome. Dans ce contexte il nous a semblé important de tester préalablement les capacités relatives de longs peptides de plusieurs Ag de mélanome à être cross-présentés durablement par les CD et à induire le priming des lymphocytes T CD8 et CD4.

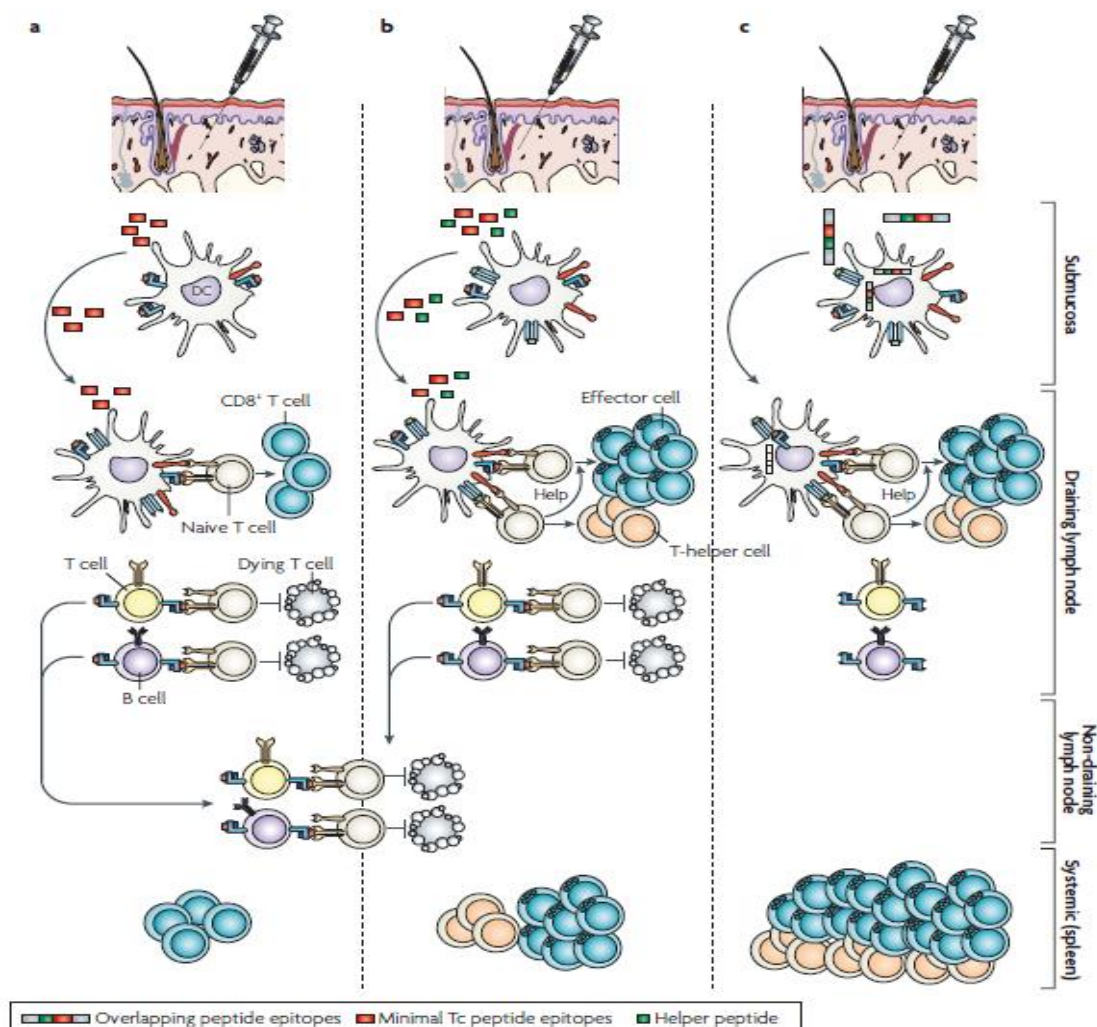


Figure 3 : Vaccination épitopique versus vaccination par longs peptides.

Les peptides épitopiques CD8 et CD4 se fixent de façon exogène sur les CMH de différentes cellules (a, b) et stimulent les lymphocytes T de façon non optimale voire induisent des Tregs, contrairement à des longs peptides incluant des épitopes CD8 et CD4 qui sont exclusivement cross-présentés par les CD.

5. 4. 3. La vaccination par des vecteurs viraux.

Les vecteurs viraux recombinants ont fait l'objet de nombreuses études dans le traitement du cancer, toutefois les résultats sont restés décevants, ne montrant pas d'impact sur la survie des patients. En effet, comme souligné récemment par l'équipe de Rosenberg (Gattinoni et al., 2006), bien qu'il existe une amplification de lymphocytes T spécifiques de la tumeur, celle-ci s'estompe rapidement contrairement à d'autres approches vaccinales comme le transfert de lymphocytes T.

5. 4. 4. La vaccination par des CD chargées en antigènes.

Afin de s'assurer d'une prise en charge exclusive des antigènes vaccinaux par des CD matures, seules capables d'induire une RI efficace, l'idée fut de charger *ex vivo* des CD autologues, avant de les réinjecter au patient (Melief, 2008). Cette approche permet de maîtriser la quantité et la qualité des cellules stimulatrices, en particulier leur maturation et la concentration d'antigènes et la voie de chargement pour une présentation optimale. Généralement les CD sont générées à partir de monocytes ou de progéniteurs myéloïdes CD34⁺ issus du sang, bien que certains essais aient utilisés des PBMC qui contiennent, on le sait, de faibles fractions de CD (Gajewski et al., 2001; Peterson et al., 2003). Le chargement se fait par l'intermédiaire d'un lysat de cellules tumorales ou par les peptides épitopiques, mais dans les deux cas des inconnues importantes subsistent quant à l'efficacité et la durée de présentation des épitopes. De nombreux essais cliniques utilisant des CD ont ainsi été réalisés dans différents types de tumeurs (Draube et al., 2011; Melief, 2008), et notamment dans le mélanome. Les réponses encourageantes rapportées dans plusieurs essais de phase I/ II, (Banchereau et al., 2001; Fay et al., 2006; Gajewski et al., 2001; Hersey et al., 2004; Nestle et al., 1998; Palucka et al., 2006; Peterson et al., 2003), n'ont cependant pas été retrouvées dans un essai de phase III et ont même été interrompues car jugées défavorables (Schadendorf et al., 2006). Une approche alternative en développement est basée sur un ciblage spécifique des CD *in vivo* par différents vecteurs couplés à l'antigène et conjointement à l'administration systémique d'agents de maturation des CD tels que le CD40L (Romani et al., 2010).

A la lumière des résultats obtenus jusqu'à présent utilisant des peptides courts, et ceux présentés dans cette thèse, la faible efficacité de ces différents vaccins à induire des réponses T durables pourrait être due en partie à une présentation des comparée à la présentation prolongée obtenue avec les longs peptides par présentation croisée (Faure et al., 2009).

Résultats

1. Introduction

Dans le cadre de la thématique du laboratoire : « Réponse T antitumorale et immunothérapie », plusieurs projets se sont axés autour des antigènes du mélanome dont certains ont été découverts par l'équipe. L'antigène Melan-A, pour lequel le répertoire T spécifique est très vaste, s'avère être un modèle d'étude approprié pour l'immunothérapie. De nombreux essais cliniques ont déjà été réalisés en utilisant cet antigène pour la vaccination ou la stimulation *in vitro* de lymphocyte T de patients pour un transfert adoptif (Dangoor et al., 2010; Speiser et al., 2008; Vignard et al., 2005). L'épitope CD8 Melan-A 26-35, ayant une faible affinité de liaison au HLA-A2, a été optimisé pour améliorer sa stabilité et par conséquent sa présentation aux lymphocytes T (Blanchet et al., 2001; Valmori et al., 1998; Valmori et al., 1999). Cela a également permis de générer artificiellement des complexes multimériques CMH-peptide-optimisés avec une meilleure stabilité que le peptide naturel ; ces complexes multimériques étant un outil d'analyse et de détection spécifique du répertoire T antigénique qui leur est associé (Altman et al., 1996; Romero et al., 1998a; Romero et al., 1998b). Toutefois, le peptide épitopique modifié ne semble pas présenter d'avantage notable par rapport au peptide naturel dans les essais de vaccinations dont les résultats restent décevants (Hamid et al., 2007; Speiser et al., 2008).

Deux études du groupe de Melief ont démontré dans un modèle murin de vaccination, l'immunogénicité supérieure de longs peptides contenant l'épitope OVA, par rapport à des peptides courts (Bijker et al., 2007; Zwaveling et al., 2002). D'après cette expérience et d'autres observations, C. J. Melief et S. H. van der Burg ont émis l'hypothèse que les peptides courts épitopiques sont inadéquats pour la vaccination, du fait de leur chargement par la voie exogène sur les CMH-I de toutes les cellules, aboutissant à une présentation inadaptée voire tolérogène (Melief and van der Burg, 2008). Ils ont ainsi proposé l'utilisation vaccinale de longues séquences peptidiques dont il est établi depuis longtemps qu'elles peuvent donner lieu à la présentation des épitopes CD8 et CD4 par des cellules dendritiques et stimuler ainsi de fortes réponses T CD8 et CD4 (Fayolle et al., 1991; Kast et al., 1991). Il restait à établir des constructions pouvant vérifier ces hypothèses.

Plusieurs projets sur les longs peptides ont été développés, au sein de notre équipe dont l'un portant sur un long peptide Melan-A 16-40 contenant l'épitope A2 optimisé (A27L) couplé à des glycoconjugués pour permettre son internalisation via des PRR d'endocytose tels

que le récepteur au mannose et DC-SIGN. Les expériences menées par le Dr. P. Larrieu lors de sa thèse ont démontré la capacité de ces LP à être cross-présentés par des cellules dendritiques, capacité également partagée par la séquence peptidique non couplée. En parallèle de cette étude, la présentation croisée durable par des CD dérivées de monocytes d'un long peptide Melan-A 15-40 naturel ainsi que d'un LP dérivé de l'antigène gp100 a été établie par le Dr. F. Faure (Faure et al., 2009). C. J. Melief et son équipe ont par ailleurs apporté la même année les premières preuves d'une certaine efficacité clinique de LP contenant des antigènes de tumeurs virales (HPV) (Kenter et al., 2009).

Partant des résultats préliminaires obtenus dans l'équipe, mon projet de thèse, débuté en septembre 2008, a alors été d'étudier *in vitro* l'immunogénicité de longs peptides dérivés d'antigènes de mélanomes humains contenant un épitope CD8 restreint HLA-A2, optimisés ou non pour l'ancrage à ce HLA. J'ai tout d'abord comparé la cross-présentation par les CD de l'épitope Melan-A 26-35, modifié ou non, à partir des longs peptides Melan-A 16-40 et 16-40_{A27L}, ainsi que le cross-priming de PBL de donneurs sains induit par cette cross-présentation. Les résultats de cette étude ont conduit à la soumission au Journal of Immunology d'un article en révision intitulé : "HLA anchor optimization of the Melan-A-HLA-A2 epitope within a long peptide is required for efficient cross-priming of human tumor-reactive T cells." A la demande des reviewers de l'article, nous avons plus récemment comparé la capacité de ces deux LP à stimuler une réponse CD8 parmi les PBL de patients porteurs de mélanome, puis leur immunogénicité chez la souris HLA-A2, en collaboration avec Armelle Blondel de l'Institut Cochin. Par la suite nous avons tenté d'établir la valeur générale de l'impact de l'optimisation d'ancrage sur l'immunogénicité des LP en utilisant un LP de l'antigène NY-ESO-1, modifié ou non. Cette étude n'a finalement pu aboutir car aucun priming n'a été obtenu avec les PBL de 3 donneurs sains, sans doute du fait du répertoire extrêmement limité des lymphocytes spécifiques de cet épitope chez les individus naïfs. Enfin, nous avons étudié la capacité de plusieurs LP naturels, modifiés ou chimères de longueurs différentes, à induire une présentation croisée et un cross-priming par les CD. Les résultats montrent que la majorité des LP induisent efficacement une présentation croisée mais que l'efficacité de cross-priming est plus hétérogène et sans doute dépendante de la réponse CD4. Pour terminer, nous avons donc commencé l'étude de la réponse CD4 au LP Melan-A modifié afin de préciser la capacité de ce peptide à induire, malgré la modification d'un acide aminé dans plusieurs épitopes CD4 connus, une réponse CD4, puis déterminer l'impact de celle-ci sur la réponse CD8.

2. Matériel et méthode

Cellules et culture :

Les PBMC ainsi que les PBL et les monocytes éutriés de donneurs sains ont été fournis par la plateforme DTC du CHU de Nantes. Les PBL des patients ont été fournis par le service de Dermatocancérologie du CHU de Nantes 5 (Pr Dréno). Le milieu de culture utilisé est le RPMI 1640 complété avec de la L-glutamine et de la pénicilline-streptomycine (10µg/mL) (GIBCO®) ainsi que 10% de sérum de veau fœtal (Laboratoires PAA) pour la culture des lignées tumorale, ou 8% de sérum humain (préparé dans le laboratoire) pour la culture des cellules humaines. Les CD ont été obtenues à partir de monocytes cultivés durant 5 jours à $2 \cdot 10^6$ /mL avec 80ng/mL d'IL4, 90ng/mL de GM-CSF (AbCys) and 1% plasma humain.

Les clones : M77-84 spécifique de Melan-A 26-35/HLA-A2, M17-221 spécifique de NA17-A 1-10/HLA-A2, et M117-167 spécifique de NY-ESO-1 157-165/HLA-A2, sont issus de TILs et ont été préalablement générés dans le laboratoire. Ils sont décongelés et cultivés en présence d'IL2 à 150UI/mL (Proleukine® Chiron).

Peptides synthétiques:

Les peptides Melan-A 21-40 modifié (YTTAELAAGIGILTVL), Melan-A 16-40 naturel (GHGHSYTTAEAAAGIGILTVILGVL) et modifié 16-40_{A27L} (GHGHSYTTAEELAGIGILTVILGVL), les peptides 26-35 (EAAGIGILTV) naturels et modifiés 26-35_{A27L} (ELAGIGILTV), ainsi que les peptides 20mer NA17A chimérique (YTTAEVLPDVFIRCVILGVL) et NY-ESO-1 modifié 151-170C165V (SCLQQLSLLMWITQVFLPVF) ont été obtenus chez MilleGen avec une pureté supérieure à 90%.

Les LP fluorescents Melan-A Ac16-40-IAF_{A27L} et Ac16-40-K-FITC_{A27L} ont d'abord été synthétisés chez NeoMPS puis couplés aux fluorochromes par le Dr E. Duverger (Laboratoire de Neurobiologie de l'Université d'Orléans) avec une pureté supérieure à 70%. Le long peptide Melan-A 16-40 a été couplé à deux autres fluorochromes : le bodipy ou l'acide indocarbocyanine (rot), par P. Henklein avec la collaboration du Dr F. Ebstein (Institut

de Biochimie – Charité – de l’Université de Médecine de Berlin). La localisation des fluorochromes est décrite figure X0A.

Le 30mer NA17A synthétique (VLPDVFIRC VVFPRSP TVFYNI PPMP LPPSQL) et le NY-ESO-1 151-170 naturel (SCLQQLSLLMWITQCFLPVF) sont des dons des Dr C. Sedlik et D. Valmori respectivement. Le peptide épitopique de grade clinique NA17-A (VLPDVFIRCV) est un don du Dr C. Pandolfino.

Les peptides NY-ESO-1 157-165 naturels et modifiés C165V (SLLMWITQV) ont été obtenus chez Eurogentech avec une pureté supérieure à 70%. Le mélange de 9 peptides chevauchant couvrant la séquence du Melan-A 16-40 utilisés pour tester la réponse CD4 comprend les séquences décrites dans la figure X0B. Ils ont été obtenus chez Proteogenix avec une pureté supérieure à 80%. La pureté des différents peptides a été contrôlée par les fournisseurs via une chromatographie en phase inverse. Les peptides lyophilisés ont été repris dans du DMSO à 10mg/mL et conservés à -20°C.

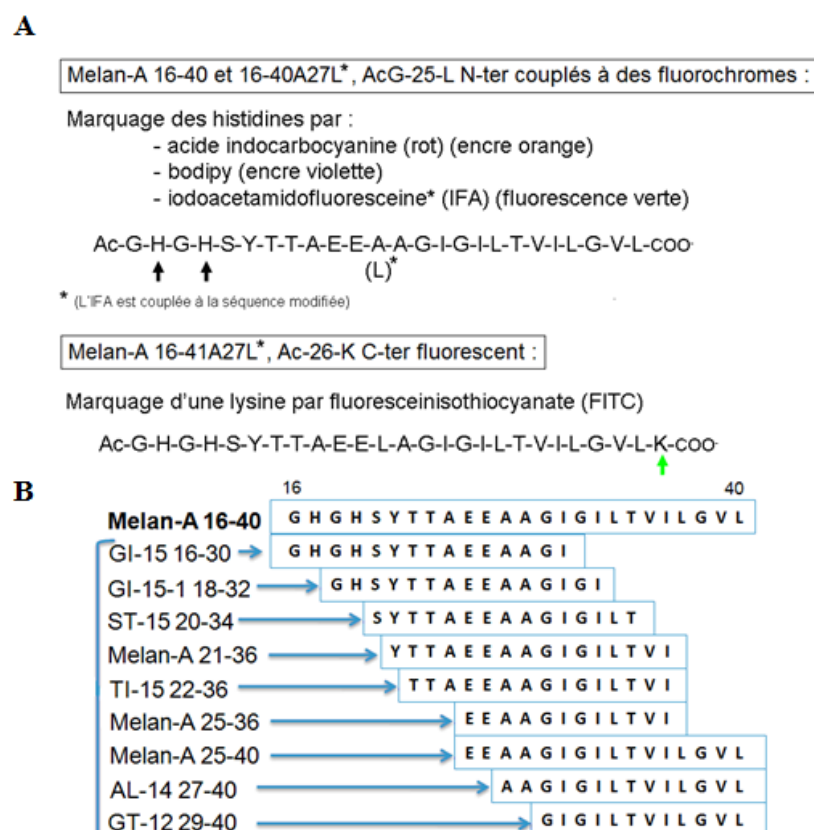


Figure 4 : Informations sur les peptides synthétiques.

A : localisation des fluorochromes sur les LP Melan-A. B : composition des peptides chevauchants couvrant la séquence de Melan-A 16-40.

Expériences de présentation croisée et analyse de la réponse des clones :

Les CD vivantes ou fixées par 0.1% de glutaraldéhyde (Sigma-Aldrich), ont été pulsées durant 3h avec un peptide puis lavées 4 fois. Du TNF- α (10ng/mL) (AbCys) et du Poly I:C (100ng/mL) (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés durant et après le pulse. Après un temps d'incubation de 0 à 96h, le clone est ajouté en ratio 1/1 durant 5h en présence de bréfeldine-A (BFA) (Sigma-Aldrich). La production d'IFN- γ du clone est mesurée ensuite par un marquage intracellulaire associé à un marquage CD8. Chaque condition expérimentale est en duplicate ou en triplicate.

Inhibition de la présentation croisée :

Les CD sont incubées avec des molécules inhibitrices ou compétitrices, 45minutes avant le pulse de peptide, puis durant celui-ci. Les cellules sont lavées 4fois et comptées afin d'évaluer la toxicité de l'inhibiteur, puis elles sont incubées avec le clone en ratio 1/1 en présence de BFA.

Les inhibiteurs des récepteurs scavengers ont été fournis par le Dr Y. Delnest (Institut de Biologie en Santé PBH-IRIS, CRCNA UMR892 Angers), les autres molécules proviennent de chez Sigma-Aldrich.

Stimulation des PBMC ou des PBL par les peptides :

Les PBMC de donneurs sains ou de patients, de même que les PBL, ont été incubés en plaques 96 puits à $1,5 \cdot 10^5$ cellules par puits minimum, respectivement en présence de peptide ou de CD autologues pulsées 3h par un peptide en présence des agents de maturation, dans un milieu contenant 8% de sérum humain. 50UI/ml d'IL2 est ajouté après 3 jours d'incubation et le milieu est renouvelé tous les deux à trois jours jusqu'à analyse.

Analyse des réponses CD8 après priming :

Après 14 jours d'incubation, ou bien 9, 11, 14, 15, 18 et 21 jours si l'expérience le nécessitait, une partie des PBL de chaque puits est prélevée et analysée directement au FACS par un marquage CD8 et tetramer, ou bien stimulée par une lignée tumorale exprimant ou n'exprimant pas l'antigène d'intérêt (Melan-A, NA-17A ou NY-ESO) durant 5 heures en

présence de BFA, avant d'effectuer un marquage CD8, tetramer et IFN- γ pour analyser la réponse au FACS.

Analyse des réponses CD4 spécifiques de Melan-A après priming :

Après les 14 jours de stimulation par le long peptide Melan-A modifié, les PBL ont été restimulés, ou non, durant 5 heures en autoprésentation et en présence de BFA par un mix de peptide chevauchants couvrant la séquence du LP naturel (FigureX0). Un co-marquage CD4 et IFN- γ est ensuite réalisé pour analyser la réponse au FACS.

Souris :

Les souris AAD exprimant un CMH chimérique de classe I composé des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du HLA-A*0201 et du domaine $\alpha 3$ de la molécule H2-Dd murine (Newberg et al., 1996) utilisées dans cette étude sont un présent du Pr VH Engelhard (University of Virginia School of Medicine, Charlottesville). Les expériences ont été réalisées en accord avec le ministère de l'agriculture pour la régulation de l'expérimentation animale.

Immunisation par une préparation de peptide en IFA ou des CD chargées :

Les souris AAD, ont été immunisées soit avec une préparation vaccinale de 50 μ g de peptide 26-35_{A27L}, de LP melan-A 16-40 naturel ou de LP modifié A27L et 50 μ g d'IFA renouvelé après 7 jours, soit des CD autologues dérivées de moelle osseuse (BMDC) chargées en peptide. Après respectivement 18 et 12 jours après la première immunisation, les cellules des ganglions axillaires et des rates ont été extraits pour un test de réponse soit par stimulation en présence de BFA pour une analyse au FACS de l'IFN- γ intracellulaire, soit par ELISPOT-IFN- γ .

Pour obtenir les BMDC, les cellules de moelle osseuse de souris AAD ont été déplétées en hématies et mise en plaque à incuber 6h dans du milieu RPMI 10% SVF, 2mM L-glutamine, 50 μ M de β 2-mercaptoethanol et 50 μ M de streptomycin et 100 μ g/ml de pénicilline. Les cellules non adhérentes ont été récupérées, puis incubées 5 jours dans du milieu supplémenté en GM-CSF avec renouvellement du milieu après 2 et 4 jours. Les CD immatures ainsi obtenues ont été chargées ou non par avec 10 μ g/mL de LP 16-40 naturel ou A27L. Après 16h de chargement, les CD ont été lavées puis immédiatement injectées par voie veineuse dans des souris AAD avec une concentration de $1,8.10^6$ cellules/souris. Après

douze jours, les lymphocytes ont été extraits des ganglions et des rates des souris pour être immédiatement testé.

ELISPOT IFN- γ

Des microplaques PVDF (Millipore) ont été coatées sur la nuit à 4°C avec un anticorps de rat anti-IFN- γ de souris (R4-6A2, Pharmingen) puis lavées et saturées avec du milieu complet. 2.10^5 cellules ont été co-incubées sur la nuit avec 1 μ M de peptide Melan-A 26-35 ou un peptide irrelevant M55-66 dans du milieu contenant 30UI/mL d'IL2 recombinant humain (Roche Applied Science). Après lavage, un anticorps biotinylé de rat anti-IFN- γ de souris (XMG1.2, PharMingen) a été ajouté pour une incubation de 2 heures. Après lavage, une alkaline phosphatase couplée ExtrAvidin (Sigma-Aldrich) a été ajoutée dans les puits pour une incubation d'une heure à température ambiante. Le substrat conjugué de la phosphatase alcaline (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a ensuite été ajouté durant 30min. Les cellules formant des spot d'IFN- γ ont ensuite été comptés en utilisant un ELISPOT BioReader 5000F..

Tri cellulaire :

Les déplétions en CD14⁺, CD4⁺ ou CD19⁺, ont été réalisées avec des billes magnétiques sur colonne de tri (MACS® separation kit) Myltenyi-Biotech. Les tris CD8⁺, CD4⁺ et NKP46⁺ ont été réalisés au FACSAria® par le Dr. Desfrancois-Noël.

Marquages, anticorps et analyses FACS :

Les marquages membranaires, dont le marquage par tetramer-biotine couplé streptavidine-PE ou APC, ont été effectués durant 15 minutes à 4°C en PBS 0,1% BSA. Le marquage intracytoplasmique IFN- γ -PE ou APC a été effectué en PBS 0,1% BSA 0,1% saponine. Les cytochromes utilisés en fonction des expériences couvrent quatre couleurs : FITC, PerCP, PE et APC ; les anticorps utilisés ont été obtenus chez Myltenyi-BiotechTM ou Becton-DickinsonTM. L'analyse des cellules marquées est réalisée au FACSCalibur®, avec les logiciels CellQuest® ou Flowjo®

Statistiques :

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism® et les tests précisés dans la légende des figures.

3. Étude de la capacité de cross-priming d'un long peptide de l'antigène Melan-A/MART-1 contenant l'épitope A2 immunodominant naturel ou optimisé pour un meilleur ancrage au HLA.

3. 1. Un ancrage optimisé de l'épitope immunodominant Melan-A 26-35 est nécessaire pour conférer à un long peptide contenant cet épitope une efficacité de cross-priming de lymphocytes T anti-tumoraux.

« HLA anchor optimization of the Melan-A-HLA-A2 epitope within a long peptide is required for efficient cross-priming of human tumor-reactive T cells »

Joë-Marc Chauvin, Pierre Larrieu, Guillaume Sarabayrouse, Armelle Prévost-Blondel, Renée Lengagne, Juliette Desfrancois, Nathalie Labarrière, Francine Jotereau.

Article en révision soumis à *The Journal of Immunology*

TITLE

HLA anchor optimization of the Melan-A-HLA-A2 epitope within a long peptide is required for efficient cross-priming of human tumor-reactive T cells.

Joë-Marc Chauvin^{*}, Pierre Larrieu[†], Guillaume Sarraeyrouse^{*}, Armelle Prévost-Blondel^{‡,§}, Renée Lengagne^{‡,§}, Juliette Desfrancois^{*,¶}, Nathalie Labarriere^{*}, Francine Jotereau^{*,||}.

^{*}: INSERM U892, F-44093 Nantes, FRANCE

[†]: Ludwig Institute for Cancer Research, Bruxelles, BELGIUM

[‡]: INSERM, U1016, Institut Cochin, F-75014, Paris, France

[§]: University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, CNRS, UMR 8104, F75014, Paris, France

[¶]: Cytometry facility of the IFR26, F-44093, Nantes, France

^{||}: Faculté des Sciences, Université de Nantes, F-44322 Nantes, France

Running title: *High immunogenicity of a Melan-A derived modified long peptide*

¹Corresponding author:

Francine Jotereau, INSERM U 892-CRCNA, IRTUN, 8 quai Moncousu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 1, France. Phone number: (33) 2 28 08 02 44. Fax number: (33) 2 28 08 02 04.
E-mail: jotereau@nantes.inserm.fr

Keywords: Melanoma, CD8+ T cell, Optimized T cell epitope, Long peptide, Vaccination

Word counts: Abstract: 234 Text: 4147

²Grant Support: This work was supported by a grant from ARC 1074 and Cancéropôle Grand Ouest. Joë-Marc Chauvin was supported by a grant from Ligue Contre le Cancer comité 44.

ABSTRACT

The uptake and long term cross-presentation of tumor antigen long peptides (LP) by DC make them attractive cancer vaccine candidates. However, it remains to be established whether LP can prime long-lived tumor-reactive CTL, and whether other cell types are able to cross-present them. Using HLA-A2 healthy donor and melanoma patient-derived PBMC, we studied the *in vitro* cross-priming potential of Melan-A 16-40 LP bearing the HLA-A2-restricted epitope 26-35, or its analogue 26-35A27L and compared it to the priming capacity of the short analogue. We then addressed LP priming capacity *in vivo*, using HLA-A2 mice. We also studied LP cross-presentation by moDC, pDC, monocytes and B cells. We showed that the modified LP gave rise to high and sustained cross-presentation by moDC. This led to cross-priming *vitro* and *in vivo* and to expansion of long-lived tumor-reactive cytotoxic T cells. In contrast, the LP containing the natural 26-35 epitope primed specific T cells poorly, despite its long-lived cross-presentation, and T cells primed against the short analogue were short-lived. We further showed that LP cross-presentation is restricted to monocytes and conventional DC. These results document for the first time the strong immunogenicity of a human tumor antigen LP. Of note, they underscore that this property is critically dependent on sufficient HLA binding affinity and/or TCR ligand potency of the cross-presented epitope. We conclude that LP fulfilling this requirement should be used as tumor vaccines, together with DC maturing agents, especially the Melan-A 16-40 A27L LP, for the treatment of HLA-A2⁺ melanoma patients.

INTRODUCTION

The demonstration that tumor specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) are major effectors of the surveillance of experimental- and virus-associated human cancers, as well as the discovery of human tumor-associated antigens (TAA) recognized by CTL from patients, initiated twenty years ago (1), opened the way to developing cancer vaccines to treat non-viral associated cancers. Immunogenic cancers such as melanoma were particularly targeted. Nonetheless, these treatments have not yielded fully satisfying clinical responses so far (2). This failure has been attributed to immunosuppression and tolerance mechanisms, which develop within the tumor environment. A way to circumvent them would be to induce robust enough CTL responses (3). Because the induction of potent CTL responses requires long-lived cross-presentation by mature DC of high affinity TCR ligands, cancer vaccines should fulfill these requirements. Most tumor antigens elicit anti-tumor T cell responses displaying low avidity, due to limited densities of MHC-peptide complexes on target cells, and/or to low HLA binding affinity of tumor epitopes, resulting from missing anchor residue(s). Paradoxically, this latter defect was documented essentially for immunodominant melanoma epitopes, such as Melan-A 26-35, gp100 209-217 and NY-ESO-1 157-165. The introduction of a missing anchor residue was therefore considered to increase the immunogenicity of these epitopes (4-7). Nonetheless, these analogues used as vaccines were not efficient to treat cancer patients so far, which led to question their potential interest (8, 9).

Another suggested limit of cancer vaccines (3) would be their inability to induce an exclusive and sustained cross-presentation by mature DC, which appears mandatory to mount robust cytotoxic T cell responses. Studies in mice suggested that low immunogenicity of exact epitope vaccines is due to the exogenous and short-term peptide presentation, not restricted to DC (10). In contrast, this study and others showed that LP give rise to sustained cross-presentation by DC, and/or induce strong T cell responses (11, 12). LP (and proteins) are therefore considered as promising cancer vaccines (3). In accordance, *in vitro* studies showed that LP from human melanoma-associated antigens, among which the differentiation antigen Melan-A/MART-1 (thereafter called Melan-A), are efficiently internalized by monocyte-derived DC (moDC), eliciting sustained cross-presentation (11). However, neither the ability of such LP cross-presentation to prime tumor reactive CTL, nor whether other cell types were able to internalize and cross-present LP were formally addressed.

To successfully design new melanoma vaccines, it appears crucial to document, in a preclinical setting, the T cell priming capacity of tumor antigen LP and the impact of an

epitope modification improving the affinity/stability of the HLA-peptide complex on this ability. To address these questions, we chose the Melan-A₂₆₋₃₅/HLA-A2 complex as a model epitope, because 1/ specific T cells have shown anti-melanoma efficacy without dramatic toxicity, in adoptive transfer therapy (13-17) 2/ a uniquely vast specific T cell repertoire is present in HLA-A2 donors (18), which allows the detection of specific responses from naive T cells after a single stimulation; 3/ the A27L modification has been carefully designed to stimulate a repertoire largely cross-reactive with the natural epitope (7), three key properties for use in vaccination.

Here, we therefore compared the capacity of the Melan-A 16-40 LP (16-40 WT) and of its modified analogue (16-40 A27L), to be cross-presented by moDC, and to cross-prime and/or expand tumor-reactive Melan-A specific CTL *in vitro* and *in vivo* in a HLA-A2 mouse model. We also compared Melan-A specific CD8⁺ T cell induction by these LP and by the related short analogue.

MATERIAL and METHODS

Cells and culture:

PBMC were obtained from HLA-A2 healthy donors and melanoma patients. PBL, monocytes and intermediate fractions were isolated by elutriation. Plasmacytoid dendritic cells (pDC) were enriched by an additional CD123⁺ sorting, using magnetic beads (Stem cells). These subpopulations were supplied by the DTC-platform (CHU Nantes, France).

The culture medium used was RPMI 1640 supplemented with L-glutamine and penicillin-streptomycin (10µg/mL) (GIBCO®).

The HLA-A2 tumor cell lines Melan-A^{pos} M113 and Melan-A^{neg} M17 (melanomas) and C4S (colorectal carcinoma) were cultured with 10% fetal bovine serum (FBS), (PAA Laboratories). The M77-84 T cell clone, reactive to the HLA-A2/Melan-A 26-35 complex and 26-35_{A27L} analogue had been obtained from a metastatic lymph node of a HLA-A2 melanoma patient (19). The PBMC, PBL and the T cell clones were cultured with 8% human serum (HS) prepared in our laboratory and 150 IU/ml IL-2 (Proleukine® Chiron).

DC were obtained from monocytes cultured for 5 days at $2 \cdot 10^6$ /mL with 80ng/mL IL4, 90ng/mL GM-CSF (AbCys, Paris, France) and 1% human plasma. CD19⁺ B cells were sorted from PBL with MACS® CD19⁺ magnetic separation kit (Miltenyi-Biotech). MACS® CD19⁺ CD4⁺ and CD14⁺ were used for the CD19⁺, CD4⁺ and CD14⁺ PBMC depletions. Naive and memory T cells were sorted on a FACS ARIA® with a CD3⁺CD45RA⁺CD45RO⁻CD27⁺ or CD3⁺CD45RO⁺ phenotype selection, respectively, to a purity superior to 99%.

Synthetic peptides:

The Melan-A 16-40 (GHGHSYTTAEAAAGIGILTVILGVL) and 26-35 (EAAGIGILTV) WT peptides and their modified (A27L) analogues were purchased from MilleGen. Purity (> 85%) was controlled by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Lyophilized peptides were dissolved in DMSO at 10mg/mL and stored at -20°C. M58-66 was an irrelevant HLA-A2 restricted peptide.

Cross-presentation assay and T cell clone response analysis:

HLA-A2⁺ DC, alive or fixed for 3 min by 0.1% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich), were pulsed 3 h, in duplicate or triplicate wells, with peptides, and washed 4 times. TNF- α (10ng/mL) (AbCys) and PolyI:C (100ng/mL) (Sigma-Aldrich) were added during and following the pulse. M77-84 T cells were added, at a 2:1 ratio, for 5 h in medium containing 10 μ g/mL brefeldin-A (Sigma-Aldrich). The IFN- γ production of the T cell clone was measured by intracellular labeling with CD8 co-labeling.

PBMC or PBL stimulation by the Melan-A peptides:

PBMC ($2 \cdot 10^5$ per well of 96 well plates, or $1 \cdot 10^6$ per well of 24 well plates), were incubated with the peptide concentrations indicated in the Figures for 2 weeks. For PBL stimulation moDC were pulsed for 3 h with 8 μ M peptides, in medium containing TNF- α and Poly I:C, and then washed 4 times before addition of PBL at a 10:1 ratio. IL-2 (50 IU/mL) was added after 3 days.

Immunofluorescent stainings and flow cytometry analysis

Antibodies (Abs) used for surface labeling were: anti-human CD3-PerCP, CD8-APC, CD8-FITC, CD45RA-FITC, CD45RO-APC, CD27-FITC, CD27-APC, CD28-PE, Granzyme A-FITC (Miltenyi-Biotech or Becton Dickinson). Single-stained controls for each fluorochrome were used for compensation settings. $2 \cdot 10^5$ cells were stained in PBS-0.1% BSA with appropriate concentrations of specific mAbs for 20 minutes at 4°C. For intracellular staining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, washed and stained with IFN- γ -PE mAb for 25 min in PBS-0.1% BSA -0.1% saponin. After washing in PBS 0.1%BSA, 10^5 cells were acquired, in the viable cell gate, on a BD® FACS Calibur™ with Cellquest® Pro software.

Tetramer staining

HLA-A*0201/Melan-A 26-35_{A27L} α 3-mutated biotinylated monomers were generated by the recombinant protein facility (INSERM U892, Nantes, France), as described (20). Monomers were tetramerized through binding to streptavidine-PE (BD Pharmingen). Cells were co-

incubated with Melan-A tetramers (10 μ g/mL or, if cells were recently stimulated, 40 μ g/ml) and CD8 mAb for 20 min at 4°C in the dark. 10⁵ cells were analyzed, using a FACSCalibur.

Analysis of specific tumor cell recognition:

T cells were co-cultured, at a ratio 2:1, with HLA-A2 Melan-A⁺ (M113) or, as a negative control, Melan-A⁻ (M17) melanoma lines for 5 h in medium containing brefeldin A. Reactive T cell frequency was analyzed by flow cytometry following anti-CD8, Melan-A tetramer and intracellular IFN- γ or CD107a co-labeling. The Melan-A specific response was obtained by subtracting the response to the negative control from that to M113. In some experiments, the number of Melan-A specific T cells was estimated from the total number of T cells in each well and the fraction of M113-reactive T cells.

Analysis of cytotoxic activity by flow cytometry:

Target cells (HLA-A2 Melan-A^{pos} (M113) melanoma line or, as a negative control, a Melan-A^{neg} (C4S) colon carcinoma cell line) were stained with PKH67 (Sigma-Aldrich) at a concentration of 4 μ M during 1 h and washed twice. Labeled target cells were diluted at 5.10³ cells per 50 μ L of culture medium and incubated, or not, for 4 h with tetramer⁺ T cells at various ratios in 96-well plates, in triplicate. The supernatant of each well was discarded and 150 μ L of culture medium containing propidium iodide (PI) (BD Pharmingen) at 50 μ g/mL was added. Cytotoxicity was analyzed immediately by flow cytometry. The percentage of tumor cells killed was the number of dead tumor cells (PKH67⁺, PI⁺) in the presence of lymphocytes, divided by the total number of target cells (PKH67⁺) minus the number of dead tumor cells in the absence of lymphocytes, divided by the total number of tumor cells.

Mice

AAD mice expressing a chimeric MHC class I composed of the α 1 and α 2 domains of HLA-A*0201 and the α 3 domain of H2-Dd (21) were a kind gift of Pr VH Engelhard (University of Virginia School of Medicine, Charlottesville).

Experiments were performed in compliance with French Ministry of Agriculture regulations for animal experimentation.

Immunization with bone marrow–derived DC (BMDC)

Bone marrow cells from AAD mice were depleted of red blood cells and plated for 6 hours in RPMI 1640 with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (complete medium). Non-adherent cells were suspended (0.5×10^6 /mL) in complete medium containing GM-CSF. Medium was replaced after 2 and 4 days. At day 6, immature DC were cultured in the presence of LPS (500 ng/mL) and IFN- γ (10 ng/ml) either alone or with the Melan-A 16-40 peptide or with its modified (A27L) LP analogue (10 μ g/ml). Sixteen hours later, DCs were washed, and immediately injected intravenously into AAD mice (1.8×10^6 cells / mouse). Twelve days later, fresh splenocytes were tested by IFN- γ ELISPOT.

ELISPOT IFN- γ

PVDF microplates (Millipore) were coated overnight at 4°C with rat anti-mouse IFN- γ antibody (R4-6A2, Pharmingen) and then washed and saturated with complete medium. 2.10^5 splenocytes were incubated overnight with Melan-A 26-35 or M58-66 (1 μ M) in medium containing 30 units/ml human rIL2 (Roche Applied Science). After washing, biotinylated rat anti-mouse IFN- γ mAb (XMG1.2; PharMingen) was added for 2 hours. After washing, alkaline phosphatase-labeled ExtrAvidin (Sigma) was added, and wells were incubated for 1 h at room temperature. Finally, alkaline phosphatase conjugate substrate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) was added for 30 min. IFN- γ spot forming cells (SFC) were counted using a BioReader 5000F ELISPOT reader.

Statistics:

Statistical analyses were done with GraphPad Prism® software. Scatter-dot graphs were made to compare medians of non-Gaussian populations and were analyzed with a non-parametric test (Mann-Whitney or Kruskal-Wallis followed by a Dunns post-test). Bar-graphs were realized to compare means and were analyzed for populations following a Gaussian distribution with an unpaired t-test or ANOVA. The two time-scatter-dot graphs were analyzed with an ANOVA paired test (Gaussian distribution) and a Friedman test (Gaussian approximation) respectively.

RESULTS

Efficient cross-presentation of WT and modified Melan-A 16-40 peptides by moDC.

The cross-presentation by moDC of Melan-A 16-40 (16-40 WT) and of its analogue (16-40 A27L) was evaluated by the IFN- γ response of a CD8⁺ T cell clone (M77-84), reactive to both the natural and the modified 26-35 epitopes. Fixed DC, unable of cross-presenting, but as efficient as live DC to present the WT and analogue epitopes (Figure 1A), were used alongside, to exclude or evaluate a contribution of exogenous presentation of degradation products of the LP in the T cell response.

Both LP induced a significant proportion of IFN- γ secreting T cells only when they were cross-presented by unfixed DC (Figure 1 B). These responses were respectively detectable from 0.5 μ M and 4 μ M for the 16-40 A27L and the 16-40 WT respectively. They increased with the LP concentration, reaching a plateau at 16 μ M and 64 μ M respectively. Below 32 μ M of LP, IFN- γ responses resulted only from cross-presentation. At all concentrations, the response was significantly higher for the modified LP than for the WT one. Therefore, both LP are efficiently cross-presented. Cross-presentation of the modified LP was quite stable for 72 hours (Figure 1C). A similarly long-lasting cross-presentation has been reported elsewhere for the WT LP, with the difference that it strongly decreased with time (11). In contrast with the stable cross-presentation of the modified LP, the exogenous presentation of the analogue short peptide by DC remained very high at 24 hours but decreased rapidly thereafter (Figure 1C). Therefore, both the WT and the modified LP are spontaneously and durably cross-presented by moDC, while exogenous presentation of the short analogue is significantly shorter.

The Melan-A 16-40_{A27L} LP, but neither its WT homologue nor the short analogue, stimulates a very high and long-lasting expansion of Melan-A 26-35-specific CD8⁺ T cells

The capacity of the WT and the modified LP to stimulate Melan-A 26-35 specific CD8⁺ T cells was then examined. As shown in Figure 2A, for a representative donor (out of 4), a single stimulation of PBMC with 8 μ M of the modified LP induced a large expansion of Melan-A specific CD8⁺ T cells in a majority of the culture wells and within two weeks, as measured by tetramer labeling. In contrast, the WT LP induced a limited expansion of these

cells and in a very small fraction of the culture wells even at higher concentrations (32, 64, or 100 μ M). This difference was reproducibly observed in eight independent experiments performed with 4 donor-derived PBMC, as illustrated, in Figure 2B by the mean percentages of wells containing a significant fraction of CD8⁺ tetramer⁺ cells (at least 1%). Since the tetramer used was refolded with the modified epitope A27L, we could not exclude that the natural LP had induced the growth of Melan-A specific cells not detected by this tetramer. To avoid this bias, we measured for two additional healthy donors and two melanoma patients the fraction and total number of CD8 T cells responding to a HLA-A2+ Melan-A expressing melanoma cells among PBMC stimulated by the natural and modified LP. For the healthy donors, in accordance with previous tetramer labeling, we found that high fractions of the culture wells stimulated with the modified LP contained high fractions and high numbers of CD8 T cells reactive against Melan-A expressing melanoma cells, whereas very few of those stimulated with the wt LP did contain such cells (Figure 2C). An even higher difference was observed for one melanoma patient (Figure 2D). Nonetheless the PBMC from another melanoma patient failed to respond to both LP (data not shown).

We, and others, reported earlier that the Melan-A 26-35_{A27L} peptide stimulates a high expansion of specific CD8⁺ T cells *in vitro* from PBMC or PBL (7, 19). We therefore compared side by side in the same experiments, CD8⁺ T cell responses induced by the short and long modified peptides. As shown on Figure 2E for a representative experiment performed from PBMC of one donor out of 6, both peptides induced a reproducible expansion of tetramer⁺ CD8⁺ T cells in most culture wells. At day nine, the tetramer⁺ cells induced by the short analogue were more frequent ($p < 0.01$) than those induced by the modified LP. However, from day 9 to 21, and for most donors, the proportions of tetramer⁺ cells increased in wells stimulated with the modified LP, while it decreased or remained stable in those stimulated with the short analogue (Figure 2E and supplementary Figure 1). Therefore, *in vitro*, the Melan-A modified LP is remarkably more efficient to stimulate a long-term expansion of Melan-A specific CD8⁺ T cells than the natural LP and the modified short peptide.

The tetramer⁺ cells induced by the Melan-A modified LP are tumor reactive.

Because recent reports emphasized the risk that T cells stimulated with the modified epitopes may be less reactive against the natural epitope than T cells stimulated with the latter

(9), we compared the reactivity to HLA-A2⁺ Melan-A⁺ melanoma cells of tetramer⁺ T cells induced by the modified and the natural LP (although the latter were unfrequent). The median fraction of tetramer⁺ cells induced by both LP that reacted against melanoma cells was high (around 60%) and not significantly different (Figure 3A left). A representative example is illustrated in Figure 3B. In addition, tetramer⁺ cells induced by the modified LP express CD107-a (Figure 3A right) and killed the melanoma cell line M113 (Figure 3C), as efficiently as a high affinity Melan-A specific T cell clone (19). Therefore the modified LP stimulates efficiently the growth of T cells that are highly reactive (cytokine production and lysis) against the natural epitope expressed by melanoma cells.

Cross-presentation of the modified LP by moDC efficiently primes naive Melan-A specific T cells and induces their differentiation into effector memory cytotoxic T cells

To further assess whether cross-presentation of the modified LP could prime naive- and/or stimulate memory- Melan-A specific PBL, we used moDC from HLA-A2 healthy donors pulsed with 8μM of the modified LP to stimulate autologous PBL.

As shown in Figure 4A, for one representative donor out of two, cross-presentation of the modified LP by moDC induced the expansion of tetramer⁺ CD8⁺ T cells from total PBL, in a significant fraction of culture wells, while cross-presentation of the natural LP did not. Using cytometry based sorted CD3⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD27⁺ PBL (naive T cells) and CD3⁺ CD45RO⁺ (memory T cells) from two donors, we further showed that Melan-A specific T cells could be efficiently induced from naive precursors (Figure 4B and data not shown). We then compared the phenotype of tetramer positive or negative T cells induced from naïve precursors by the modified LP (Supplementary Figure 2). The expressions of CD27, CD28 and granzyme B are increased in tetramer⁺ cells, whereas those of CD62L, CD57 and CCR7 are decreased. Therefore, cross-presentation of the modified LP by moDC efficiently primes naive Melan-A specific T cells inducing their development into effector memory cytotoxic T cells. We then asked which cell types among PBMC were able to cross-present the modified LP and to prime circulating T cells.

Among blood cells, monocytes, but not plasmacytoid DC nor B cells, cross-present the Melan-A 16-40 A27L peptide and are required for the cross-priming of CD8⁺ T cells.

To ascertain the role of circulating antigen presenting cells (APC) such as monocytes, conventional DC and B cells in the induction of tetramer⁺ cells from PBMC stimulated by the modified LP, PBMC were depleted for CD19⁺, CD4⁺ or CD14⁺ cells. CD19⁺ B cell depletion did not affect the stimulation of tetramer⁺ CD8⁺ T cells. In contrast, the depletion of CD4⁺ cells, i.e. CD4⁺ T cells, monocytes, and conventional DC, and that of CD14⁺ cells, i.e. monocytes, quite abrogated the capacity of LP to induce the growth of tetramer⁺ cells (Figure 5 A, for one representative donor out of two), suggesting that monocytes and/or DC are critical to prime CD8⁺ T cells from the modified LP. In addition, populations of HLA-A2⁺ PBMC, highly enriched (>95%) in monocytes, pDC or B cells, as well as moDC and a HLA-A2⁺ Melan-A- tumor cell line (C4S), were pulsed with the modified LP and cross-presentation was measured with the Melan-A specific T cell clone. As illustrated in Figure 5B, for one representative donor out of 3, only monocytes and moDC, were able to cross-present the analogue epitope from the LP. This suggests that among PBMC, monocytes and/or conventional DC are responsible for the very efficient cross-priming of tumor-reactive CD8⁺ T cells by the modified Melan-A LP.

BMDC cross-presenting the Melan-A 16-40_{A27L} LP, but not its WT homologue, induce a significant expansion of Melan-A26-35-specific T cells in vivo

The capacity of the WT and the modified LP to stimulate Melan-A 26-35 specific cells was then examined *in vivo*. HLA-A2 transgenic AAD mice were immunized with BMDC previously incubated with each peptide for 16 hours to favor cross-presentation. Twelve days later, the number of IFN γ -secreting splenocytes was determined by an *ex vivo* ELISPOT assay. As shown in Fig 6, a single immunization with DC incubated with 1 μ M of the modified LP induced a large expansion of Melan-A specific splenocytes, and no specific response towards M58-66 used as an irrelevant HLA-A2 restricted peptide ($p < 0.05$). In contrast, Melan-A 26-35 specific cells were not efficiently induced in mice immunized with DC incubated with the WT LP. Overall, these results show that only *Melan-A 16-40_{A27L} LP* induced a significant proportion of IFN- γ secreting T cells after cross-presentation by BMDC *in vivo* and are relevant with data obtained *in vitro*.

DISCUSSION

Here we showed that a Melan-A LP, bearing an anchor optimized analogue of the immunodominant CD8 epitope (26-35/HLA-A2) gave rise to a sustained high level of cross-presentation by moDC and exhibited *in vitro* and *in vivo* a unique ability to generate a large and long-lived expansion of highly tumor reactive CD8⁺ T cells from PBMC. In contrast, the WT LP failed to efficiently induce such cells. It is noteworthy that specific T cells primed by the short epitope proliferated poorly, and/or died rapidly. Finally we showed that monocytes and moDC, but not B cells, pDC, nor tumor cells, were able to cross-present the modified Melan-A LP. These findings support the unique immunogenicity of tumor derived LP provided the cross-presented epitope has a sufficient HLA-binding affinity and/or TCR ligand potency.

The much higher capacity of the modified LP to induce the growth of Melan-A specific T cells compared with the WT LP was initially observed by labeling with a tetramer containing the modified decapeptide. Since the natural LP could induce the cross-presentation and priming of T cells specific for the natural nonamer and decamer not labeled by this tetramer (22), the induction of Melan-A specific T cell by the natural LP might have been underestimated. Therefore, for two healthy donors and two melanoma patients, we quantified the melanoma reactive CD8 T cells induced by both LP. This approach confirmed the extremely low capacity of the natural LP to induce melanoma specific T cells. In addition, we did not observed any melanoma reactive T cells in the tetramer negative fraction of cells stimulated with the natural LP. Therefore, the total or at least the major fraction, of T cells reactive with the WT epitopes are labeled by the modified tetramer.

The cross-presentation of the modified LP by DC induced a significantly higher T cell response than the WT LP. However, since the analogue epitope itself triggers a stronger T cell response than its WT counterpart (Figure 1A and (23)), it is not possible to know whether the modified LP induces a higher level of cross presentation (i.e. the presentation of higher densities of MHC peptide) than its WT homologue. Nonetheless, the significantly longer half-life of the HLA-A2/A27L analogue complex, compared to the WT (7), could logically result in a higher density of the former on DC.

Sustained TCR-ligand interaction between naive T cells and DC is critical for efficient T cell priming (24). The observation that DC pulsed with the modified LP acquired a high

level of epitope cross-presentation, which was stable for at least 72h, may explain why this LP primed naive T cells so effectively. Faure et al (11) previously reported a similarly long-lasting cross-presentation of the WT Melan-A LP. Nonetheless, our results showed that this LP was inefficient to induce the expansion of Melan-A specific T cells *in vitro* and *in vivo*. The mechanistic basis of this major difference between the two LP is difficult to precise, although it clearly depends on the A27L anchor modification. Anchor optimized residues, through the enhancement of MHC-peptide affinity/stability, might increase the duration of the T cell/DC interaction, which is critical for T cell priming. In addition, these residues may increase the strength of the TCR/MHC-peptide interaction due to the higher stability of this complex or to subtle alteration of the MHC-analogue peptide conformation (25).

Although at equimolar concentrations the short analogue induced a much higher T cell clone response than the modified LP by pulsed DC, the latter induced a much higher expansion of long-lived PBMC-derived tetramer⁺ cells. Therefore, lymphocyte stimulation by the Melan-A A27L, short and long peptides, is qualitatively different. As suggested by the group of Melief from *in vivo* data (10), this may result from a potentially tolerogenic presentation of the exact epitopes due to their presentation: 1/ by non-professional APC, 2/ for limited duration, and 3/ in the absence of CD4⁺ T helper cells. In accordance, potentially explaining the different life duration of CD8⁺ T cell expansion induced by the short and long modified Melan-A peptides, we found that the latter was cross-presented exclusively by monocytes and DC and that its presentation by DC lasted about 48 hours longer than that of the modified short peptide.

The WT 16-40 Melan-A sequence used in the present study also contains 3 overlapping CD4 peptides presented by HLA-DR1, DR3 and DQ6 alleles (26). Since these peptides encompass the alanine at position 27, the A27L modification, might affect the corresponding CD4 responses. Nonetheless the 26-35 A27L peptide was unexpectedly shown capable to activate a HLA-DQ6 restricted CD4⁺ T cell clone (26). We have observed that PBMC stimulation by the Melan-A modified LP also induced the growth of CD4⁺ T cells reactive with a mix of 15 overlapping 12 mer peptides covering the natural 16-40 sequence of Melan-A (Chauvin unpublished results). We are currently addressing a potential helper role of these cells in the priming efficiency and in the quality of the specific CD8⁺ T cells induced by the modified LP.

Among PBMC, LP cross-presentation, appeared restricted to monocytes and moDC. Although not completely delineated, the role of inflammation induced monocyte-derived DC in the

induction of T cell responses has been directly established in the mouse (27). Our data showed that monocytes, purified by elutriation, efficiently cross-presented the modified LP. It may be that this process, and/or the culture, during the cross-presentation assay, could provide pro-inflammatory danger signals, endowing these cells with a LP cross-presentation capacity. Therefore, it is likely that the induction of Melan-A specific CD8 T cell by adding LP to PBMC resulted from epitope cross-presentation by monocytes or blood DC. In support of this, the depletion of PBMC in monocytes (CD14+) abrogated the induction of Melan-A specific T cells by the modified LP. This induction was also strongly reduced when CD4+ cells, corresponding to subsets of monocytes, DC and T cells were depleted. This might result from a defective cross-presentation due to monocyte or blood DC depletion and/or from a lack of help by Melan-A specific CD4+ T cells. Nonetheless, preliminary experiments in which purified CD8 T cells were stimulated by autologous monocytes loaded with the modified LP, in the presence or absence of CD4, showed that Melan-A specific CD8⁺ T cells were induced in the absence of CD4 T cells, although their presence enhanced CD8⁺ T cell expansion (Chauvin unpublished results).

A role of pDC in antigen presentation has been proposed, on the basis of their capacity to express both MHC-I and -II molecules and to cross-present soluble or particulate antigens to CD8⁺ T cells following TLR stimulation (28). We did not observe any LP cross-presentation by these cells either ex-vivo, or following a 3-day maturation by IL-3 or CpG (data not shown). It may be that intracellular components required for LP cross-presentation, are distinct from those allowing protein or particular antigens reported to be cross-presented by these cells, and are lacking in pDC or that cross-presentation by these cells requires a specific context.

We showed that cross-presentation of the modified LP by Mo-DC induced the priming and expansion of naïve CD8⁺ T cells and their differentiation within two weeks into effector memory T cells. It is likely that this cross-presentation stimulate memory T cells as well. In support of this, the modified LP induced a higher expansion of Melan-A specific CD8⁺ T cells from PBMC of a melanoma patient. PBMC of melanoma patients may contain more memory Melan-A specific CD8⁺ than those from healthy donors, mainly composed of naïve T cells (29, 30). The PBMC from another melanoma patient failed to respond to both LP. This lack of reactivity may reveal the heterogeneity of the immunological status of cancer patients reported recently by several groups.

Both the Melan-A 26-35 epitope and its A27L analogue, in association or not with adjuvants, have been used as cancer vaccines to treat metastatic HLA-A2⁺ melanoma patients. Comprehensive analysis of patient T cell responses confirmed the previous *in vitro* observation that the short analogue induced a higher expansion of Melan-A 26-35 CD8⁺ T cells than the WT epitope (9). Nonetheless, these expansions remained ten times lower than expansions induced by an Influenza virus-derived epitope (31) and were not associated with clinical responses. The present demonstration that the modified Melan-A LP induces *in vitro* a significantly higher and longer expansion of tumor reactive CD8⁺ T cells than the short analogue, supports the superior immunogenicity of LP compared with the exact epitopes proposed by the group of Melief, on the basis of a mouse study (10, 32). In accordance, strong T cell responses correlating with clinical responses have been observed in women with HPV-16 associated vulvar neoplasia vaccinated with HPV-16 LP (33, 34).

Recent clinical studies of adoptive T cell transfer in melanoma patients have shown that some characteristics of transferred tumor infiltrating lymphocytes significantly associated with objective responses is the long persistence following infusion and the expression of CD27 (35, 36). The Melan-A specific T cells primed by the modified LP shared these properties while T cells primed by the short analogue proliferated for a limited time and/or rapidly died *in vitro*.

In summary, the present study documented, for the first time directly, the unique capacity of a tumor antigen LP in priming specific tumor reactive CTL through a preferential uptake and durable cross-presentation by APC, and induction of a very high and durable expansion of primed cells. Importantly, our results also underlines that LP immunogenicity is strongly conditioned by a sufficient MHC binding affinity and/or TCR ligand potency of the cross-presented epitope, an observation which may be an *in vitro* manifestation of the impact of the strength of MHC binding of CD8 epitopes on the immunodominance hierarchy of CD8⁺ T cell responses (37). This last study clearly established that induction of strong T cell responses have two major requirements: a sufficient TCR repertoire and a sufficient MHC binding affinity of the epitope.

Overall, the present study strongly supports the development of tumor antigen derived LP fulfilling these requirements, and their use as cancer vaccines in combination with DC maturing agents, with a special emphasis for the use of the Melan-A 16-40 A27L LP, for the treatment of HLA-A2⁺ melanoma patients.

REFERENCES

1. van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254:1643-1647.
2. Rosenberg, S. A., and M. E. Dudley. 2004. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14639-14645.
3. Melief, C. J., and S. H. van der Burg. 2008. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat Rev Cancer* 8:351-360.
4. Chen, J. L., P. R. Dunbar, U. Gileadi, E. Jager, S. Gnjatic, Y. Nagata, E. Stockert, D. L. Panicali, Y. T. Chen, A. Knuth, L. J. Old, and V. Cerundolo. 2000. Identification of NY-ESO-1 peptide analogues capable of improved stimulation of tumor-reactive CTL. *J Immunol* 165:948-955.
5. Rosenberg, S. A., J. C. Yang, D. J. Schwartzentruber, P. Hwu, F. M. Marincola, S. L. Topalian, N. P. Restifo, M. E. Dudley, S. L. Schwarz, P. J. Spiess, J. R. Wunderlich, M. R. Parkhurst, Y. Kawakami, C. A. Seipp, J. H. Einhorn, and D. E. White. 1998. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4:321-327.
6. Valmori, D., V. Dutoit, D. Lienard, D. Rimoldi, M. J. Pittet, P. Champagne, K. Ellefsen, U. Sahin, D. Speiser, F. Lejeune, J. C. Cerottini, and P. Romero. 2000. Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8⁺ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients. *Cancer Res* 60:4499-4506.
7. Valmori, D., J. F. Fonteneau, C. M. Lizana, N. Gervois, D. Lienard, D. Rimoldi, V. Jongeneel, F. Jotereau, J. C. Cerottini, and P. Romero. 1998. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol* 160:1750-1758.
8. Iero, M., P. Filipazzi, C. Castelli, F. Belli, R. Valdagni, G. Parmiani, R. Patuzzo, M. Santinami, and L. Rivoltini. 2009. Modified peptides in anti-cancer vaccines: are we eventually improving anti-tumour immunity? *Cancer Immunol Immunother* 58:1159-1167.
9. Speiser, D. E., P. Baumgaertner, V. Voelter, E. Devere, C. Barbey, N. Rufer, and P. Romero. 2008. Unmodified self antigen triggers human CD8 T cells with stronger tumor reactivity than altered antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3849-3854.
10. Bijker, M. S., S. J. van den Eeden, K. L. Franken, C. J. Melief, R. Offringa, and S. H. van der Burg. 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. *J Immunol* 179:5033-5040.
11. Faure, F., A. Mantegazza, C. Sadaka, C. Sedlik, F. Jotereau, and S. Amigorena. 2009. Long-lasting cross-presentation of tumor antigen in human DC. *Eur J Immunol* 39:380-390.
12. Kast, W. M., L. Roux, J. Curren, H. J. Blom, A. C. Voordouw, R. H. Melen, D. Kolakofsky, and C. J. Melief. 1991. Protection against lethal Sendai virus infection by in vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2283-2287.
13. Benlalam, H., V. Vignard, A. Khammari, A. Bonnin, Y. Godet, M. C. Pandolfino, F. Jotereau, B. Dreno, and N. Labarriere. 2007. Infusion of Melan-A/Mart-1 specific tumor-infiltrating lymphocytes enhanced relapse-free survival of melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 56:515-526.

14. Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, P. F. Robbins, J. C. Yang, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, R. Sherry, N. P. Restifo, A. M. Hubicki, M. R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C. A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, D. E. White, and S. A. Rosenberg. 2002. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298:850-854.
15. Khammari, A., N. Labarriere, V. Vignard, J. M. Nguyen, M. C. Pandolfino, A. C. Knol, G. Quereux, S. Saiagh, A. Brocard, F. Jotereau, and B. Dreno. 2009. Treatment of metastatic melanoma with autologous Melan-A/MART-1-specific cytotoxic T lymphocyte clones. *J Invest Dermatol* 129:2835-2842.
16. Morgan, R. A., M. E. Dudley, J. R. Wunderlich, M. S. Hughes, J. C. Yang, R. M. Sherry, R. E. Royal, S. L. Topalian, U. S. Kammula, N. P. Restifo, Z. Zheng, A. Nahvi, C. R. de Vries, L. J. Rogers-Freezer, S. A. Mavroukakis, and S. A. Rosenberg. 2006. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314:126-129.
17. Vignard, V., B. Lemerrier, A. Lim, M. C. Pandolfino, Y. Guilloux, A. Khammari, C. Rabu, K. Echasserieau, F. Lang, M. L. Gougeon, B. Dreno, F. Jotereau, and N. Labarriere. 2005. Adoptive transfer of tumor-reactive Melan-A-specific CTL clones in melanoma patients is followed by increased frequencies of additional Melan-A-specific T cells. *J Immunol* 175:4797-4805.
18. Alanio, C., F. Lemaitre, H. K. Law, M. Hasan, and M. L. Albert. 2010. Enumeration of human antigen-specific naive CD8⁺ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood* 115:3718-3725.
19. Gervois, N., Y. Guilloux, E. Diez, and F. Jotereau. 1996. Suboptimal activation of melanoma infiltrating lymphocytes (TIL) due to low avidity of TCR/MHC-tumor peptide interactions. *J Exp Med* 183:2403-2407.
20. Bodinier, M., M. A. Peyrat, C. Tournay, F. Davodeau, F. Romagne, M. Bonneville, and F. Lang. 2000. Efficient detection and immunomagnetic sorting of specific T cells using multimers of MHC class I and peptide with reduced CD8 binding. *Nat Med* 6:707-710.
21. Newberg, M. H., D. H. Smith, S. B. Haertel, D. R. Vining, E. Lacy, and V. H. Engelhard. 1996. Importance of MHC class I alpha2 and alpha3 domains in the recognition of self and non-self MHC molecules. *J Immunol* 156:2473-2480.
22. Derre, L., M. Ferber, C. Touvrey, E. Devedre, V. Zoete, A. Leimgruber, P. Romero, O. Michielin, F. Levy, and D. E. Speiser. 2007. A novel population of human melanoma-specific CD8 T cells recognizes Melan-AMART-1 immunodominant nonapeptide but not the corresponding decapeptide. *J Immunol* 179:7635-7645.
23. Valmori, D., J. F. Fonteneau, S. Valitutti, N. Gervois, R. Dunbar, D. Lienard, D. Rimoldi, V. Cerundolo, F. Jotereau, J. C. Cerottini, D. E. Speiser, and P. Romero. 1999. Optimal activation of tumor-reactive T cells by selected antigenic peptide analogues. *Int Immunol* 11:1971-1980.
24. Mempel, T. R., S. E. Henrickson, and U. H. Von Andrian. 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427:154-159.
25. Chen, J. L., G. Stewart-Jones, G. Bossi, N. M. Lissin, L. Wooldridge, E. M. Choi, G. Held, P. R. Dunbar, R. M. Esnouf, M. Sami, J. M. Boulter, P. Rizkallah, C. Renner, A. Sewell, P. A. van der Merwe, B. K. Jakobsen, G. Griffiths, E. Y. Jones, and V. Cerundolo. 2005. Structural and kinetic basis for heightened immunogenicity of T cell vaccines. *J Exp Med* 201:1243-1255.
26. Bioley, G., C. Jandus, S. Tuyaerts, D. Rimoldi, W. W. Kwok, D. E. Speiser, J. M. Tiercy, K. Thielemans, J. C. Cerottini, and P. Romero. 2006. Melan-A/MART-1-

- specific CD4 T cells in melanoma patients: identification of new epitopes and ex vivo visualization of specific T cells by MHC class II tetramers. *J Immunol* 177:6769-6779.
27. Leon, B., M. Lopez-Bravo, and C. Ardavin. 2007. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26:519-531.
 28. Mouries, J., G. Moron, G. Schlecht, N. Escriou, G. Dadaglio, and C. Leclerc. 2008. Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* 112:3713-3722.
 29. Dutoit, V., V. Rubio-Godoy, M. J. Pittet, A. Zippelius, P. Y. Dietrich, F. A. Legal, P. Guillaume, P. Romero, J. C. Cerottini, R. A. Houghten, C. Pinilla, and D. Valmori. 2002. Degeneracy of antigen recognition as the molecular basis for the high frequency of naive A2/Melan-a peptide multimer(+) CD8(+) T cells in humans. *J Exp Med* 196:207-216.
 30. Pittet, M. J., A. Zippelius, D. Valmori, D. E. Speiser, J. C. Cerottini, and P. Romero. 2002. Melan-A/MART-1-specific CD8 T cells: from thymus to tumor. *Trends Immunol* 23:325-328.
 31. Ayyoub, M., A. Zippelius, M. J. Pittet, D. Rimoldi, D. Valmori, J. C. Cerottini, P. Romero, F. Lejeune, D. Lienard, and D. E. Speiser. 2003. Activation of human melanoma reactive CD8⁺ T cells by vaccination with an immunogenic peptide analog derived from Melan-A/melanoma antigen recognized by T cells-1. *Clin Cancer Res* 9:669-677.
 32. van der Burg, S. H., and C. J. Melief. 2011. Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies. *Curr Opin Immunol* 23:252-257.
 33. Kenter, G. G., M. J. Welters, A. R. Valentijn, M. J. Lowik, D. M. Berends-van der Meer, A. P. Vloon, F. Essahsah, L. M. Fathery, R. Offringa, J. W. Drijfhout, A. R. Wafelman, J. Oostendorp, G. J. Fleuren, S. H. van der Burg, and C. J. Melief. 2009. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 361:1838-1847.
 34. Welters, M. J., G. G. Kenter, P. J. de Vos van Steenwijk, M. J. Lowik, D. M. Berends-van der Meer, F. Essahsah, L. F. Stynenbosch, A. P. Vloon, T. H. Ramwadhoebe, S. J. Piersma, J. M. van der Hulst, A. R. Valentijn, L. M. Fathery, J. W. Drijfhout, K. L. Franken, J. Oostendorp, G. J. Fleuren, C. J. Melief, and S. H. van der Burg. 2010. Success or failure of vaccination for HPV16-positive vulvar lesions correlates with kinetics and phenotype of induced T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11895-11899.
 35. Rosenberg, S. A., and M. E. Dudley. 2009. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol* 21:233-240.
 36. Rosenberg, S. A., J. C. Yang, R. M. Sherry, U. S. Kammula, M. S. Hughes, G. Q. Phan, D. E. Citrin, N. P. Restifo, P. F. Robbins, J. R. Wunderlich, K. E. Morton, C. M. Laurencot, S. M. Steinberg, D. E. White, and M. E. Dudley. 2011. Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T Cell Transfer Immunotherapy. *Clin Cancer Res*.
 37. Kotturi, M. F., I. Scott, T. Wolfe, B. Peters, J. Sidney, H. Cheroutre, M. G. von Herrath, M. J. Buchmeier, H. Grey, and A. Sette. 2008. Naive precursor frequencies and MHC binding rather than the degree of epitope diversity shape CD8⁺ T cell immunodominance. *J Immunol* 181:2124-2133.

FIGURES

Figure 1

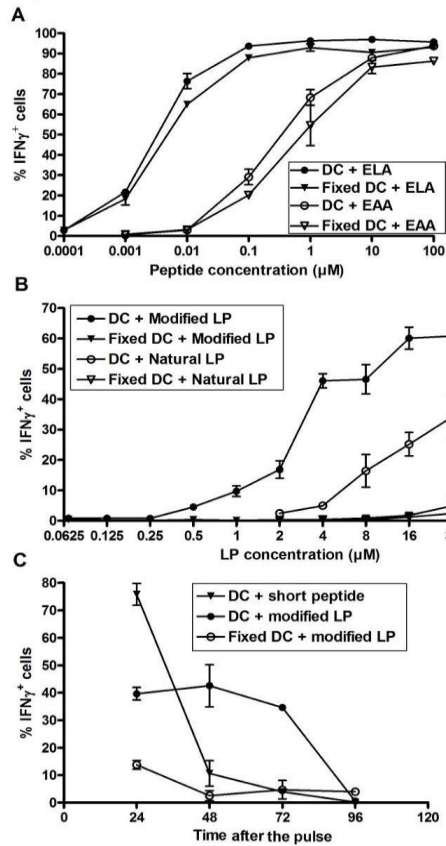


Figure 3

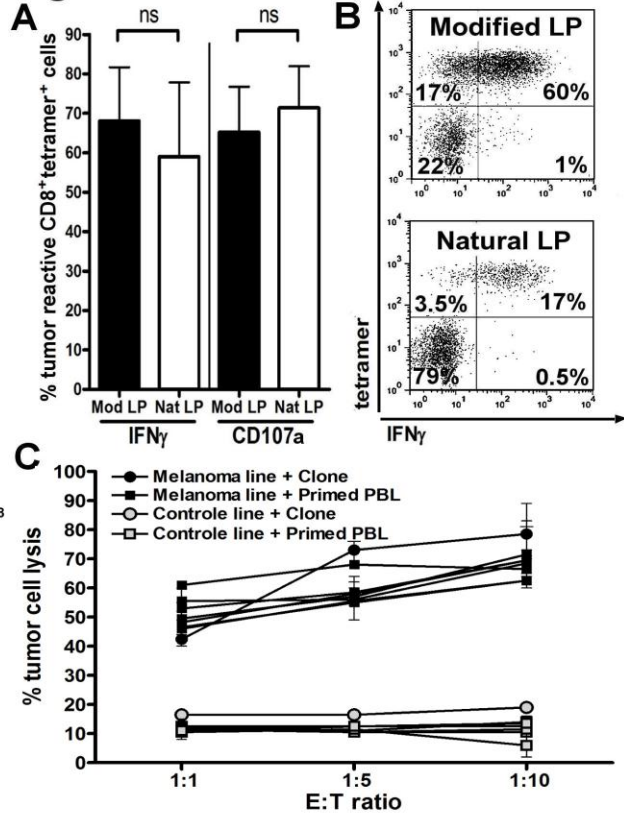


Figure 2

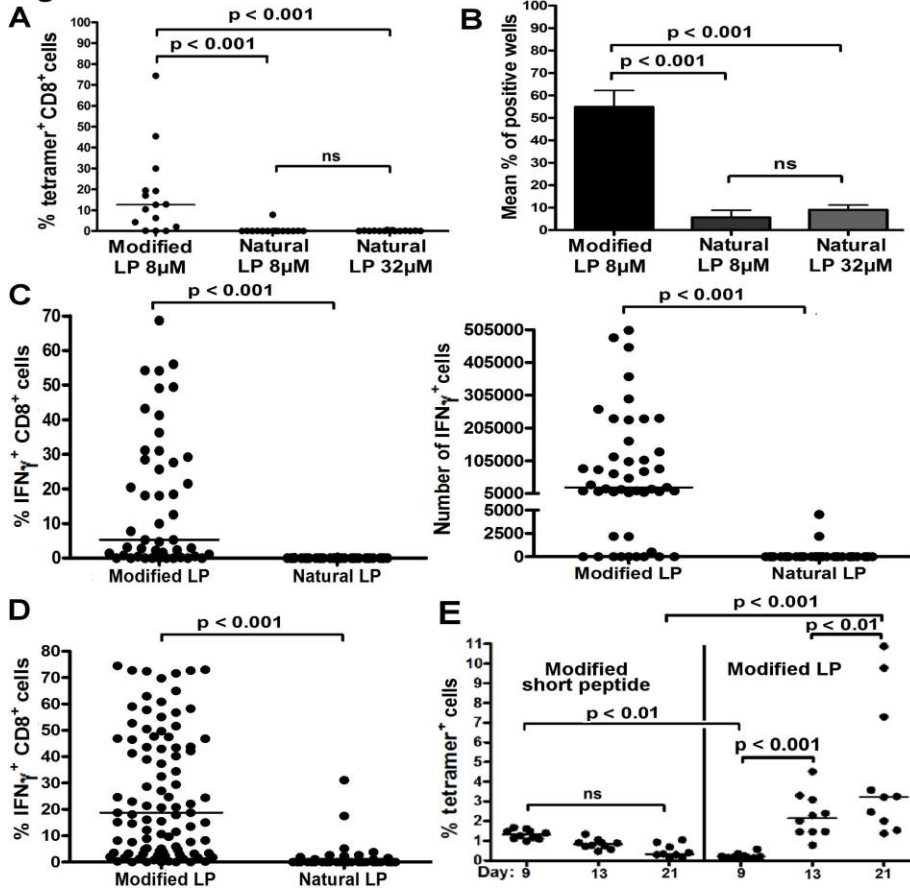


Figure 4

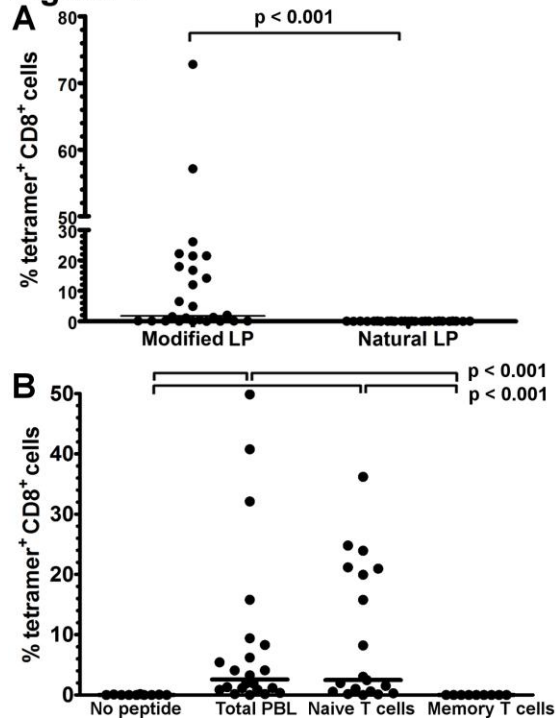


Figure 5

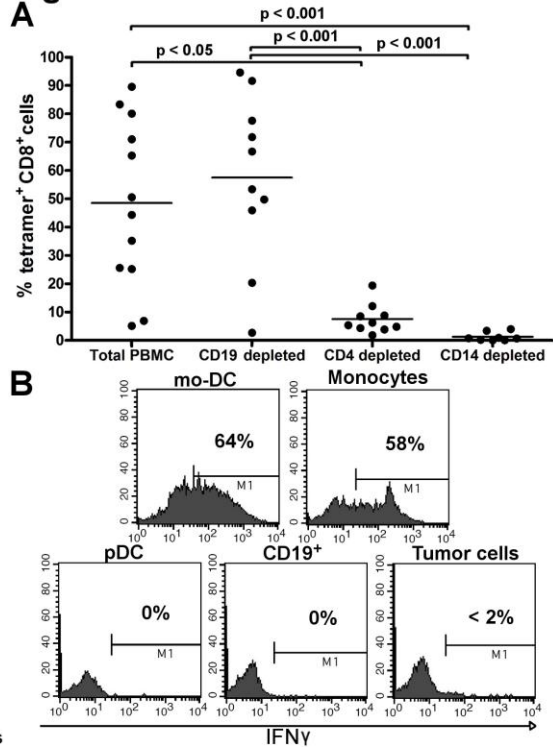
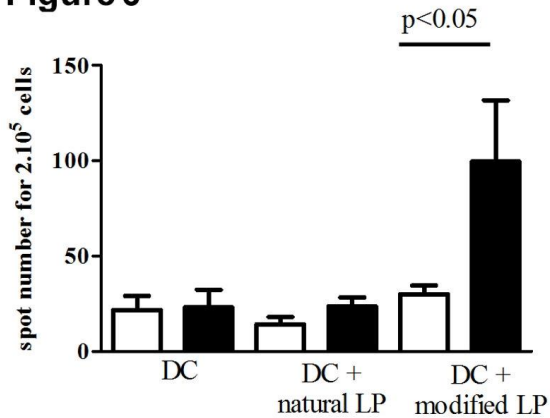
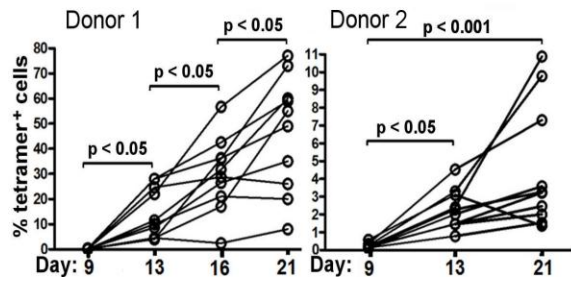


Figure 6



Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2

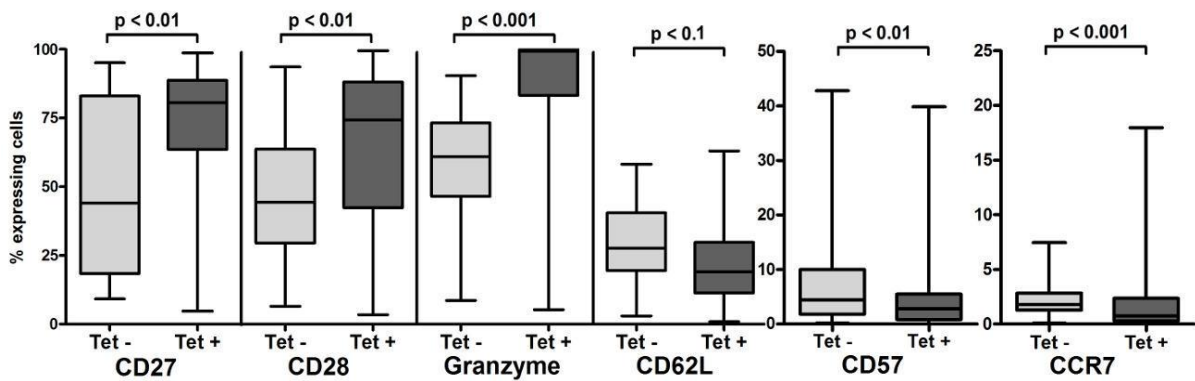


FIGURE LEGENDS

Figure 1: Relative levels and duration of exogenous- and cross-presentation of the natural and A27L modified Melan-A/A2 epitopes respectively from short and long peptides, by HLA-A2 moDC. In triplicates for each condition, immature DC were pulsed for 3 hours in the presence of TNF- α and poly I:C with the indicated concentration of **A:** Melan-A natural (EAA) or modified (ELA) 26-35 short peptide, **B:** Melan-A natural or modified LP. The clone was added at 1:1 E:T ratio for 6 hours and the response was measured by IFN- γ -labeling. **C:** The cross-presentation of the modified Melan-A LP by moDC is long lasting, in contrast with the exogenous presentation of the short peptide. The DC were pulsed with 1 μ M of the modified short peptide or with 8 μ M of the modified LP and the clone response was analyzed as above, at indicated time points after the antigen pulse.

Figure 2: The modified LP, but not its wt counterpart, induces a long lasting expansion of Melan-A specific CD8⁺ T cells and this expansion is also stronger and longer than that induced by the analogue epitope. **A:** Percent tetramer (Melan-A 26-35_{A27L}/HLA-A2) labeled CD8⁺ cells in individual culture wells (each dot represent the % of specific T cells in a culture well) amongst PBMC from a HLA-A2 healthy donor, 14 days after a single stimulation with the indicated LP. The lines within each group of plots show the median, and P values represent statistical results from a non parametric Mann-Whitney test. **B:** Mean fraction of culture wells in which PBMC stimulation, with the indicated LP, had induced a significant expansion of tetramer⁺ Melan-A specific T cells (at least 1% of the stimulated PBMC), at 14 days after a single stimulation, in four distinct experiments performed with PBMC from three donors. P values were obtained with a Bonferroni test from a positive one-way analysis of variance (ANOVA) test. **C:** Fraction among CD8⁺ cells (left) and total number of T cells (right) specifically secreting IFN γ to M113, a HLA-A2 Melan-A^{pos} melanoma line, in each culture wells of PBMC from a healthy donor (representative experiment), 14 days after a stimulation with 8 μ M of natural or modified LP. The lines in each group of plots show the median, and P values results from a Mann-Whitney test. **D:** The same experiment and statistical analysis were performed as in C with PBMC from a patient bearing a metastatic melanoma. The Figure represents the fraction of IFN γ ⁺ Melan-A specific CD8⁺ T cells. **E:** Percent tetramer⁺ cells in individual culture wells of PBMC from a HLA-A2 donor stimulated once (at day 0) by the modified short peptide (left), or by the modified LP (right), at day 9, 13 and 21 post-stimulation. Results shown are a representative experiment out of 4. Lines within

plot groups represent the median and P values results from a non parametric Kruskal-Wallis test associated with a Dunns post-test.

Figure 3: The majority of tetramer positive CD8⁺ cells induced (as in Figure 2A) by PBMC stimulation with the LP are tumor-reactive and highly lytic. **A:** Mean fraction among CD8⁺ cells of the tetramer⁺ responding to M113, a HLA-A2 melanoma cell line expressing Melan-A. After gating on CD8⁺ T cells, tetramer and IFN γ or tetramer and CD107a staining were measured. Unpaired T-tests were used **B:** Representative dot plots showing the tetramer and IFN- γ labeling of CD8⁺ cells in response to M113 melanoma cells, as in A. **C:** Lysis of the HLA-A2 Melan-A^{pos} melanoma cell line M113, compared with lysis of a HLA-A2 Melan-A^{neg} colon-carcinoma cell line used as control, by the Melan-A specific CTL clone M77-84, and by PBMC from various culture wells stimulated 14 days before by the modified LP and shown to contain at least 40% tetramer⁺ CD8⁺ cells (primed PBL). Primed PBL were mixed at the indicated tetramer⁺CD8⁺/tumor cell ratios and lysis was measured by a flow cytometry assay as described in Material and Method.

Figure 4: The cross-presentation by moDC of the modified Melan-A LP, but not that of its WT homologue, induces an efficient cross-priming of naive PBL, from HLA-A2 healthy donors. **A:** Percent of tetramer⁺ among CD8⁺ cells in individual culture wells of PBL from a representative HLA-A2 donor stimulated 14 days by moDC previously pulsed 3 hours with 8 μ M of the indicated LP. Medians and p-value from a Mann-Whitney test are shown. **B:** Percent of tetramer⁺ among CD8⁺ cells in individual culture wells of sorted naive or memory PBL from another HLA-A2 donor, stimulated 14 days by moDC pulsed (or not) with 8 μ M of the modified LP. The "no peptide" control corresponds to unstimulated total PBL. Medians and p statistical results from a non parametric Kruskal-Wallis test completed by a Dunns post-test are figured.

Figure 5: Among blood cells, monocytes, but not pDC nor B cells, cross-present the Melan-A 16-40 A27L peptide and are required for the priming of CD8⁺ T cells among PBMC. **A:** PBMC depletion for CD4⁺ and CD14⁺ respectively reduces or abrogates the capacity of the modified Melan-A LP to stimulate Melan-A specific CD8⁺ T cells. Medians and p statistical results from a non parametric Kruskal-Wallis test completed by a Dunns post-test are figured. **B:** Cross presentation of the modified Melan-A LP by various cell types measured as in Figure 1.

Figure 6: Expansion of Melan-A26-35-specific T cells in mice immunized with BMDC presenting the Melan-A 16-40_{A27L} LP. The number of Melan-A 26-35-specific T cells was

evaluated directly *ex vivo* by IFN- γ ELISPOT using splenocytes from AAD mice immunized with BMDC (n=3), BMDC incubated with Melan-A 16-40_{A27L} LP (n=4), and its WT homologue (n=3). 12 days after immunization, splenocytes were exposed to Melan-A 26-35 (black bars) or the M58-66 irrelevant peptide (white bars). Results are expressed as the number of spot-forming cells per 2.10^5 splenocytes. Data are mean of triplicates $\pm$ SD. Melan-A 26-35-specific T cells were significantly more frequent in mice immunized with BMDC incubated with the modified LP than with WT LP ($p<0.05$) as assessed by Mann-Whitney U test.

Supplemental Figure 1: The modified LP induces a long lasting expansion of Melan-A specific CD8⁺ T cells among HLA-A2⁺ PBMC stimulated as in Figure 2. P-values in each figure result from a paired and ANOVA (gaussian) or Friedman (non gaussian) tests respectively.

Supplemental Figure 2: Comparison of CD27, CD28, Granzyme B, CD62L, CD57 and CCR7 expression by the induced tetramer⁺ (tet+) and the tetramer negative (tet-) CD8⁺ T cell fractions, 14 days after a single stimulation of HLA-A2 PBMC by the modified Melan-A LP. The boxes represent the range, median and interquartiles of expressing cells, from pooled data obtained in healthy donors. Statistical values were obtained from a Mann-Whitney test.

3. 2. Le LP Melan-A 16-40 A27L stimule des réponses plus importantes que le LP naturel chez les PBMC de patients.

A la demande des rapporteurs nous avons complété cette étude, par la comparaison des capacités de priming des LP naturel et modifié vis à vis de PBMC de patients atteints de mélanome. Comme chez les donneurs sains, nous avons observé que seul le LP modifié peut induire avec une forte fréquence l'amplification de lymphocytes T spécifiques de l'épitope, qu'il soit modifié (analyse tetramer) ou naturel (présenté par une lignée tumorale) (Figure W1). Cependant, contrairement aux donneurs sains, pour un patient, quasiment aucune réponse des PBL n'a été induite par le LP modifié. Ceci suggère que les PBL de certains patients présentent une caractéristique qui limite la stimulation par le long peptide Melan-A modifié. Ce défaut ne semble pas lié au caractère mémoire des lymphocytes spécifiques de Melan-A-A2 puisque que chez un autre patient la présence de T mémoires décrite dans la littérature est fortement suggérée par une réponse encore plus forte que celle observée avec des PBL naïfs.

Nous avons de plus, à la demande des rapporteurs, comparé l'efficacité de priming des deux LP non seulement en comparant le % des cellules marquées par le tétramère modifié, et en s'assurant qu'aucune cellule non marquée par ce tétramère ne réagissait aux cellules tumorales donc au peptide naturel, mais aussi en comparant les % de lymphocytes réactifs aux cellules tumorales induits par les deux LP (par marquage intracellulaire de l'IFN- γ). Cette comparaison a donné des résultats essentiellement calqués sur ceux obtenus par marquage tétramère pour les donneurs sains mais par contre clairement inférieurs pour le patient mélanome non répondeur. De plus, dans certaines expériences de stimulation par les deux longs peptides, nous avons compté le nombre de cellules T CD8 dans tous les puits, ce qui nous a alors permis de quantifier puits par puits le nombre absolu de lymphocytes T spécifiques (produisant de l'IFN- γ) ayant été stimulés par chaque long peptide. Ceci nous a permis d'établir formellement la forte capacité du long peptide modifié à stimuler l'expansion des T CD8 spécifiques contrairement au LP naturel.

Les causes de la non réponse au LP modifié de certains patients restent à étudier. Si cette non réponse est révélatrice révèle d'un statut immunitaire déprimé, la stimulation des PBMC par le LP constituer une approche simple permettant de révéler un facteur prédictif de réponse à une vaccination voire à une autre forme d'immunothérapie spécifique d'antigène.

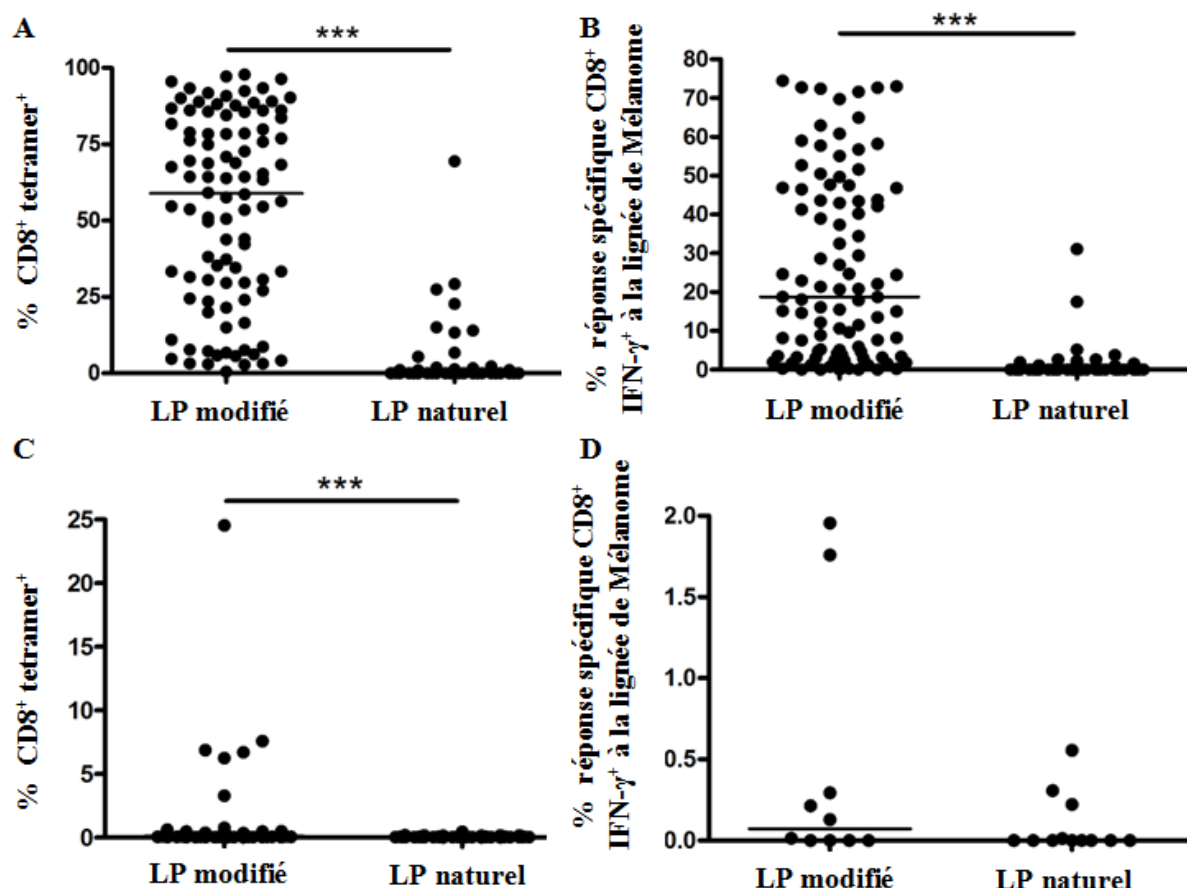


Figure W1 : Le LP Melan-A 16-40 A27L induit une amplification conséquente de lymphocytes T spécifiques et tumeur-réactifs chez des patients atteints de mélanome.

Des PBMC de deux patients ont été stimulés par 8μM de LP Melan-A 16-40 naturel ou modifié. A, C : Analyse CD8⁺ tetramer⁺ des puits. B, D : Analyse de la réponse IFN-γ des puits de priming après 5h de stimulation par deux lignées tumorales en parallèle, l'une exprimant Melan-A, l'autre non. Le graphique représente la différence de réponse entre ces deux lignées tumorales. Tous les puits présentant une réponse supérieure à 1% des CD8 correspondent à des puits présentant une fraction marquée à plus de 1% par le tetramer. *** : p < 0,001% T-test non paramétrique.

3. 3. Le LP Melan-A 16-40 A27L est plus immunogénique que le LP naturel dans un modèle murin de vaccination.

Afin de valider *in vivo* l'immunogénicité du LP Melan-A modifié nous avons comparé la réponse T spécifique de l'épitope naturel Melan-A 26-35 induite par ce peptide à celle induite par le LP naturel dans un modèle de souris présentant un HLA hybride souris-humain A2. Deux modalités d'immunisation ont été utilisées : l'administration des LP et d'IFA en intradermique et l'administration *iv* de CD chargées *ex vivo* par l'un ou l'autre de ces LP. La réponse a été mesurée par ELISPOT IFN-γ. Cette étude a été réalisée en

collaboration avec le Dr A. Blondel codirigeant l'équipe INSERM-CNRS intitulée « Etude de la réponse immune et de sa régulation dans le mélanome. » à l'Institut Cochin (Paris).

Plusieurs expériences de vaccination par peptide en IFA n'ont pas permis de révéler par analyse en cytométrie du marquage tétramère ou de la réponse IFN- γ à des lignées tumorales, l'induction d'un répertoire T spécifique de Melan-A A2 pour aucun des deux LP, et ce en dépit de l'observation d'une réaction inflammatoire notable (augmentation de volume associé à une augmentation de la concentration de lymphocytes) dans une majorité des ganglions de souris immunisées avec le LP modifié contrairement à celles immunisées avec le LP naturel. Cependant, des mesures de la réactivité des lymphocytes ganglionnaires et spléniques *ex vivo* par ELISPOT ont permis de visualiser l'induction d'une réponse CD8 spécifique du peptide ELA plus forte par le LP modifié (Figure W2A, W2B). Malheureusement la réponse au peptide court naturel n'a pas été mesurée dans cette expérience. La réponse à l'épitope naturel a cependant été évaluée en utilisant comme cibles les lignées de mélanome humaine M113 et murine TIII exprimant HLA-A2 et Melan-A (humain ou murin respectivement). De façon inexplicée, la différence de réponse entre les souris immunisées par le LP modifié et celles immunisées par le LP naturel est retrouvée par ELISPOT pour les lymphocytes spléniques (figure W2D et W2F) mais pas pour les lymphocytes ganglionnaires ont une réponse équivalente à ces lignées (Figure W2C et W2E).

Les cellules de ganglion des souris immunisées par le LP naturel ou modifié de la même expérience ont été stimulées *in vitro* durant 5 jours avec le peptide court Melan-A 26-35 A27L puis poolées afin de mesurer leur réponse aux trois différents peptides utilisés (Figure W3). On constate que, quelque soit le peptide utilisé pour la re-stimulation (court modifié, long modifié ou long naturel), le nombre de spots obtenu est plus élevé avec les lymphocytes des souris immunisées par le LP modifié qu'avec ceux des souris immunisées par le long peptide naturel. Cependant, ces réponses restent faibles. Ces résultats soulèvent deux hypothèses : soit une différence initiale de priming entre le LP modifié et le naturel, amplifiée par le « boost » de la stimulation *in vitro*, soit une amplification spécifique par le peptide court modifié du répertoire préalablement stimulé par le LP modifié contrairement au LP naturel, et qui serait donc plus spécifique que celui généré en réponse à l'épitope naturel. Pour s'affranchir de cette ambiguïté, nous avons changé de stratégie pour l'expérience suivante et choisi d'utiliser le peptide court Melan-A 26-35 naturel pour mesurer la réponse des cellules.

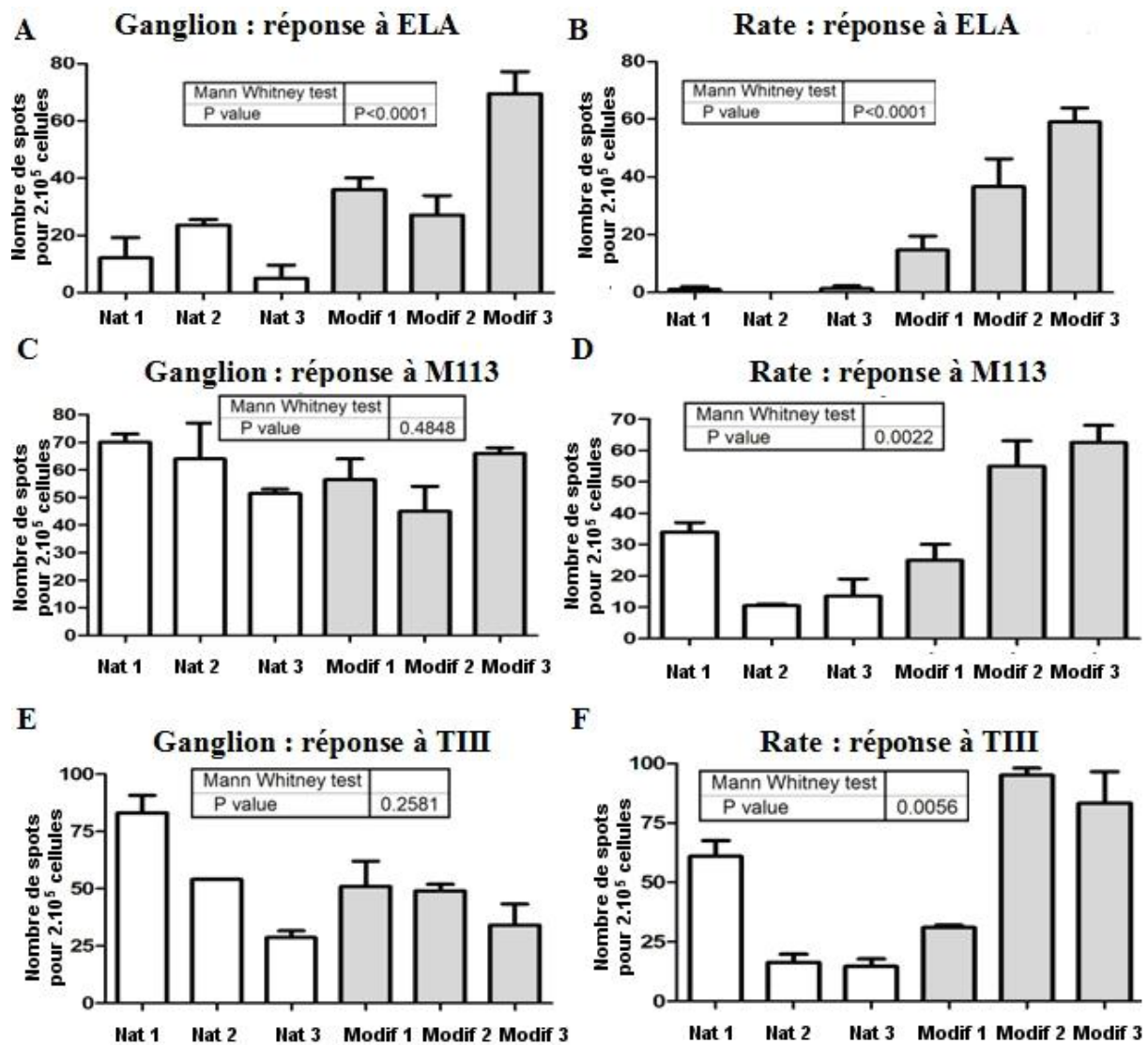


Figure W2 : Les lymphocytes de souris immunisées avec le LP Melan-A modifié reconnaissent mieux la cellule tumorale humaine que ceux des souris immunisées avec le LP naturel.

Des souris AAD ont été immunisées deux fois (18 jours au total) par le LP Melan-A naturel (Nat 1, 2, 3) ou modifié (Modif 1, 2, 3). Les cellules des ganglions et de la rate ont été prélevées et stimulées 24h *in vitro* par le peptide court 26-35A27L (ELA). La réponse des cellules de ganglions et de la rate au peptide court (A, B), à la lignée de mélanome humaine M113 (C, D) et à la lignée de mélanome murine TIII transfectée HLA-A2 (E, F) ont été analysée par ELISPOT-INF- γ .

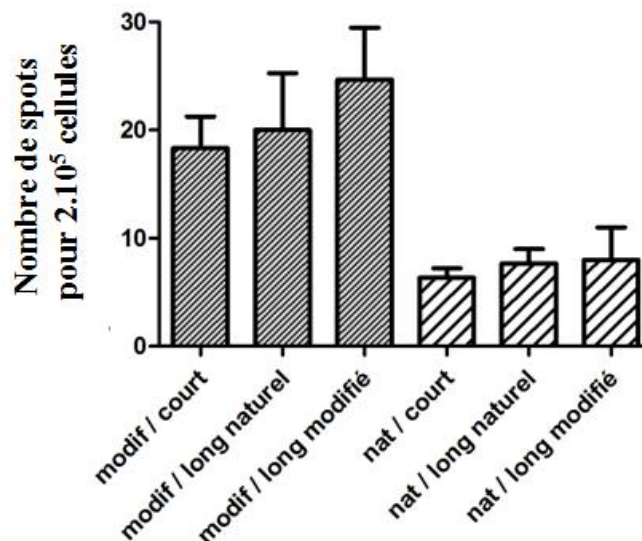


Figure W3 : La restimulation avec le 26-35_{A27L} des lymphocytes de souris AAD génère plus de réponse aux épitopes naturels et modifiés si elles ont été immunisées avec le LP modifié par rapport au LP naturel.

Cellules de ganglions de souris immunisées par LP modifié (hachures foncées) ou naturel (hachures claires), restimulés 5 jours *in vitro* par le peptide court 26-35 modifié puis testé par ELISPOT-INF- γ en réponse au peptide court modifié, au long peptide naturel ou au long peptide modifié.

Dans la dernière expérience que nous avons pu mener avec les souris AAD nous avons choisi de les immuniser deux fois avec des CD autologues chargées ou non par le LP Melan-A 16-40 naturel ou par le LP modifié. Les cellules de la rate et des ganglions ont été récupérées après trois semaines d'immunisation puis ont été testées en ELISPOT pour leur réponse soit au peptide court Melan-A 26-35 naturel soit à un peptide irrelevant, soit à une lignée de mélanome humaine exprimant ou n'exprimant pas Melan-A (Figure W4). Les résultats indiquent que seuls les lymphocytes des souris immunisés par les CD chargées par le LP modifié peuvent répondre à l'épitope naturel (Figure W4A) et ce de manière significative, mais aussi, que la réponse observée aux cellules de mélanome Melan-A⁺ est plus élevée pour les lymphocytes des souris immunisées avec le LP modifié que celles immunisées avec le LP naturel (Figure W4B). Toutefois, dans ce dernier cas la différence observée n'est pas significative.

L'ensemble de ces résultats, obtenus dans un modèle murin humanisé, tend fortement à confirmer *in vivo* l'immunogénicité supérieure du LP modifié comparé au LP naturel. Après avoir supplémenté ces résultats, il restera à vérifier l'efficacité de cette vaccination dans un modèle de mélanome humain chez la souris.

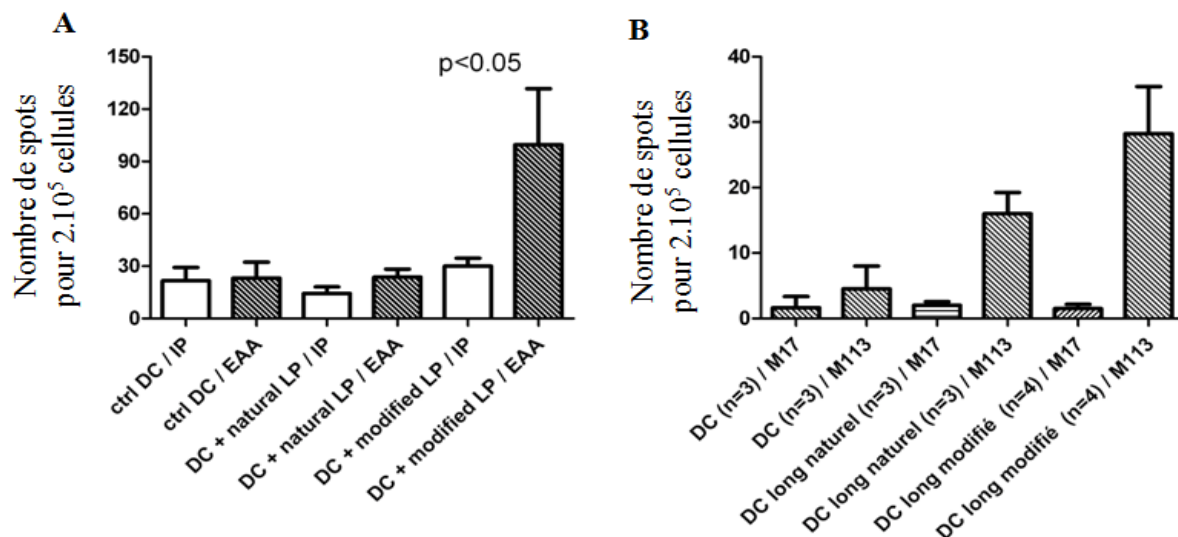


Figure W4 : Le LP Melan-A modifié montre son immunogénicité comparé long peptide naturel dans un modèle murin.

Réponses ELISPOT-IFN- γ *ex vivo* des lymphocytes T spléniques (A) et des ganglions lymphatiques (B) de souris immunisées par injection de cellules dendritiques (DC) non chargées (ctrl), chargées 16h par le LP naturel ou par le LP modifié. Les réponses sont mesurées *ex-vivo* après A : stimulation par à un peptide irrelevant (IP), par l'épitope Melan-A naturel (EAA) ou modifié (ELA), et B : stimulation par une lignée de mélanome humaine exprimant (M113) ou non (M17) l'antigène Melan-A.

4. Étude *in vitro* de la capacité du long peptide Melan-A 16-40 modifié à stimuler des lymphocytes T CD4 et rôle des CD4 dans le priming des CD8.

4. 1. Introduction

Après avoir démontré que la capacité du long peptide Melan-A 16-40 à générer le priming d'une forte proportion de lymphocytes spécifiques de l'épitope-A2 dépend de la présence d'un épitope modifié capable de se lier stablement au HLA-A2, nous avons voulu savoir si cette forte réponse dépend ou non de l'induction par ce long peptide d'une réponse CD4. En effet, il est connu que le déclenchement d'une réponse CD8 optimale et mémoire nécessite un help de CD4 spécifiques du même antigène même si l'activation simultanée de CD4 et de CD8 de spécificité distinctes peut aussi aboutir à un « help » par des mécanismes

non spécifiques d'antigènes tels que la sécrétion d'IL-2 et/ou le « licensing » des CD (Rocha and Tanchot, 2004).

Trois épitopes de restrictions HLA-DQ6, DR1 et DR3 sont présents dans le peptide Melan-A 16-40 naturel (Bioley et al., 2006). Ces épitopes sont donc susceptibles d'être présentés par les CD qui internalisent le LP. Néanmoins une telle présentation, si elle existe, ne suffit pas pour que le LP naturel puisse induire une réponse CD8 efficace comme le montre nos résultats. Deux des peptides décrits comme des épitopes CD4 de ce long peptide contiennent l'alanine en position 27. La question se posait donc de savoir si les séquences peptidiques dérivées du long peptide modifié, contenant la leucine en position 27, conservaient ou non la propriété d'épitopes CD4. Nous avons montré *in vitro* que contrairement aux lymphocytes stimulés par le peptide court modifié, les populations CD8 stimulées par le LP modifié ont une prolifération et une réponse durables, ce qui suggère la possibilité d'un help CD4 et/ou l'implication d'autres cellules immunitaires (monocytes, lymphocytes B, NK, DC maturées ou non).

Pour vérifier l'impact des CD4 sur l'induction d'une réponse T cytotoxique par le LP Melan-A modifié, nous avons procédé à des expériences de stimulation de lymphocytes CD8 triés, par des monocytes autologues chargés par ce LP, en présence ou non de lymphocytes CD4, et utilisé des peptides dodécameriques couvrant la séquence du LP naturel pour évaluer l'induction par le LP modifié de réponses CD4 spécifiques des épitopes naturels.

4. 2. Influence des CD4 sur le priming des CD8 spécifiques de Melan-A/A2.

Des expériences précédentes d'abord faites par Pierre Larrieu puis moi avaient montré qu'une déplétion des PBMC en cellules CD14⁺, CD4⁺ mais pas CD19⁺ (lymphocytes B) inhibait, voire empêchait le priming de lymphocytes T CD8 spécifiques de Melan-A/A2 par le LP modifié. La déplétion en CD4 incluait cependant à la fois une déplétion des T mais aussi d'une bonne partie des monocytes CD4^{low} présents dans les PBMC. Cette expérience ne permettait pas de conclure quant au rôle des T CD4 sur le priming.

Pour répondre à cette question, et en même temps à celle d'un rôle possible des cellules NK pouvant elles aussi avoir une influence sur le priming CD8 par leurs sécrétions de cytokines pro-inflammatoires, la réponse CD8 spécifique de Melan-A/A2 a été comparée après une stimulation par le LP modifié des lymphocytes T CD8 seuls, ou réassociés soit à des T CD4, soit à des cellules NK (figure X1A un donneur et X1B trois donneurs représentatifs).

Ces populations ont été triées avant d'être mises en présence de monocytes autologues chargés par le long peptide A27L. On constate tout d'abord pour le donneur montré figure X1A, un impact statistique des T CD4⁺ mais pas des NK, sur la fréquence des CD8 spécifiques de Melan-A/A2 (Figure X1A). Cependant, comme le montre la Figure X1B l'augmentation de fréquence des CD8 en présence des CD4, n'est pas obtenue pour tous les donneurs. Il y a donc, chez certains donneurs, une influence directe des lymphocytes T CD4 sur le priming de CD8 spécifiques de Melan-A/A2. Un tel effet pourrait être dû soit à la simple présence de T CD4 capables de sécréter des cytokines dans les conditions de la culture, soit à un effet de coopération de CD4 spécifiques du long peptide au priming des CD8.

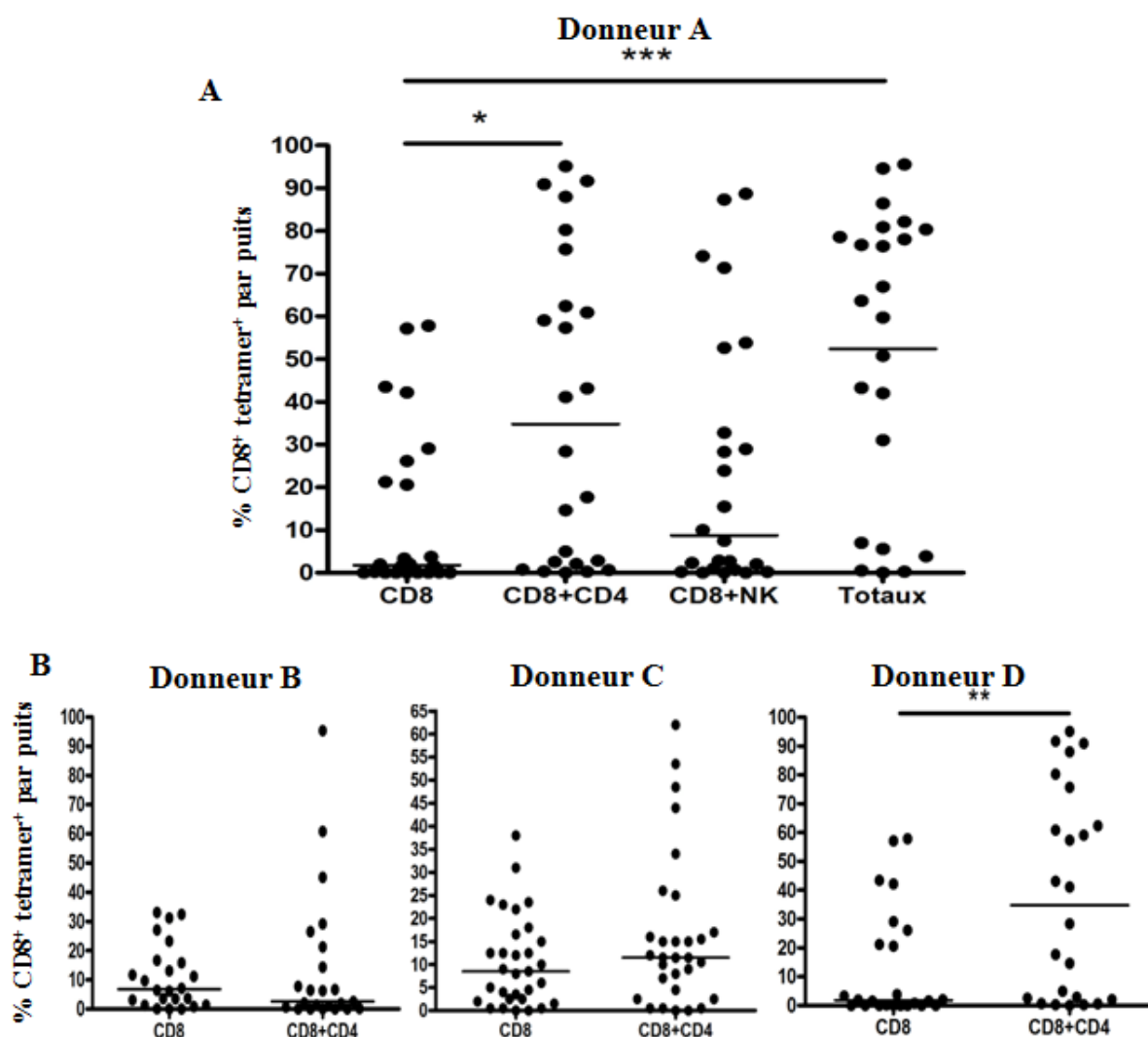


Figure X1 : Impact des T CD4⁺ sur la proportion de T CD8⁺ Melan-A spécifiques.

A, B : Les lymphocytes T CD8, CD4 et les cellules NK (A) de différents donneurs ont été triés par FACSaria. Les PBL totaux ainsi que les CD8 seuls ou réassociés aux CD4 ou aux NK autologues suivant les proportions initiales présentes dans les PBMC ont été incubés en présence de LP Melan-A 16-40_{A27L} à 8μM et de monocytes autologues. La fraction des cellules marquées par le tétramère modifié a ensuite été mesurée. Statistiques : ANOVA non paramétrique (A) et t-test non paramétrique (B), * : p < 0,1 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001.

Afin de valider l'hypothèse de l'effet des CD4 sur l'amplification des CD8, et d'améliorer si possible la réponse CD4, l'expérience de stimulation des CD8 en présence de CD4 a été renouvelée en ajoutant aux monocytes des agents de maturation des DC et les cellules tétramères⁺ ont été comptées dans tous les puits (Figure X2). L'analyse confirme l'influence positive des CD4 sur la fréquence des CD8 spécifiques de l'épitope mais aussi l'expansion de ces cellules (Figure X2B). Les CD4 favorisent donc la prolifération de cette population.

L'impact des agents de maturation des DC sur l'amplification des CD8 spécifiques, en présence ou non des CD4, a été évalué (figure X2C). A l'aide d'un test ANOVA à deux entrées, on mesure l'impact des deux facteurs. Les CD4 ont comme observé précédemment une influence très significative sur le nombre de lymphocytes CD8 spécifiques (colonnes blanches par rapport aux noires). Les agents de maturation augmentent eux-mêmes la prolifération des lymphocytes CD8 spécifiques dans les deux conditions (CD8 seuls ou CD8 + CD4), montrant donc un effet cumulatif de ces agents avec la présence des CD4. L'expérience comprenait également un essai de maturation avec de l'IFN- α , mais les puits ainsi traités ont présenté des signes de mortalité et des réponses moindres que dans la condition sans agent de maturation (résultats non figurés), suggérant une certaine toxicité de l'IFN- α .

L'analyse de différents marqueurs phénotypique nous a également permis de constater que la présence des CD4 avait une autre influence sur les lymphocytes spécifiques CD8⁺tetramer⁺ en favorisant fortement l'expression de la molécule de co-stimulation CD28 (figure X2D).

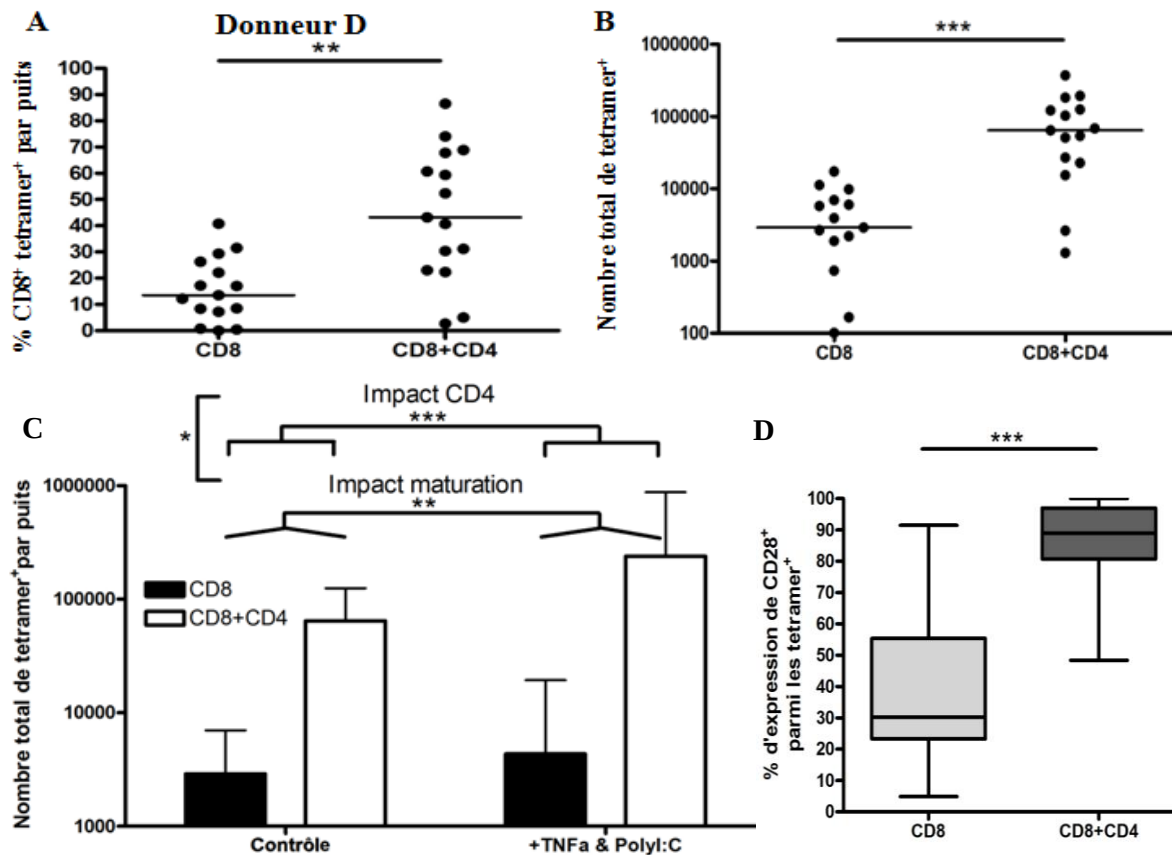


Figure X2 : Impact des T CD4⁺ et des agents de maturation des APC sur le nombre des T CD8⁺ Melan-A spécifiques.

Les lymphocytes T CD8 et CD4 du donneur sélectionné ont été triés par FACSaria, puis incubés en présence de LP Melan-A 16-40_{A27L} à 8μM, de monocytes autologues suivant les proportions initiales dans les PBMC. Des agents de maturation (TNFα et PolyI:C) ont été ajouté dans la moitié des puits. L'analyse des puits a été effectuée après 14 jours de culture. A : Proportion de cellules CD8⁺tetramer⁺ par puits. B, C : Nombre de cellules tetramer⁺ par puits. D : expression du CD28 parmi les cellules CD8⁺tetramer⁺. Statistiques : A, B, D : T-test non paramétrique, C : ANOVA non paramétrique à 2 voies. Impact des CD4, *** : p < 0,001 ; Impact des agents de maturation, ** : p < 0,01 ; Effet cumulatif, * : p < 0,1.

4. 3. Réponse CD4 spécifique et amplification de la réponse.

Nous avons voulu ensuite confirmer l'existence d'une réponse CD4 spécifique à la stimulation par le LP Melan-A 16-40_{A27L} chez différents donneurs HLA-A2 de phénotype de classe II inconnu. Des PBMC de donneurs sains ont été stimulés durant deux semaines par le LP puis, nous avons mesuré la capacité des CD4 à produire de l'IFN-γ en réponse à l'auto-présentation d'un mix de peptides chevauchants de 12 à 15 acides aminés couvrant la séquence du LP naturel (Figure X3). Les PBMC ont ensuite été restimulés durant huit jours par ce mix de peptides pour vérifier si les réponses pouvaient se conserver et tenter de les

amplifier (Figure X3B et C). Le mix de peptides, plutôt que le LP, a été utilisé pour la re-stimulation du fait que l'on estime qu'après quinze jours de culture en IL2, il n'y a plus d'APC professionnelles capables d'apprêter les LP. Le fait d'utiliser des peptides naturels permet d'évaluer la capacité de réactivité croisée de la réponse CD4 induite par le LP modifié aux épitopes naturels.

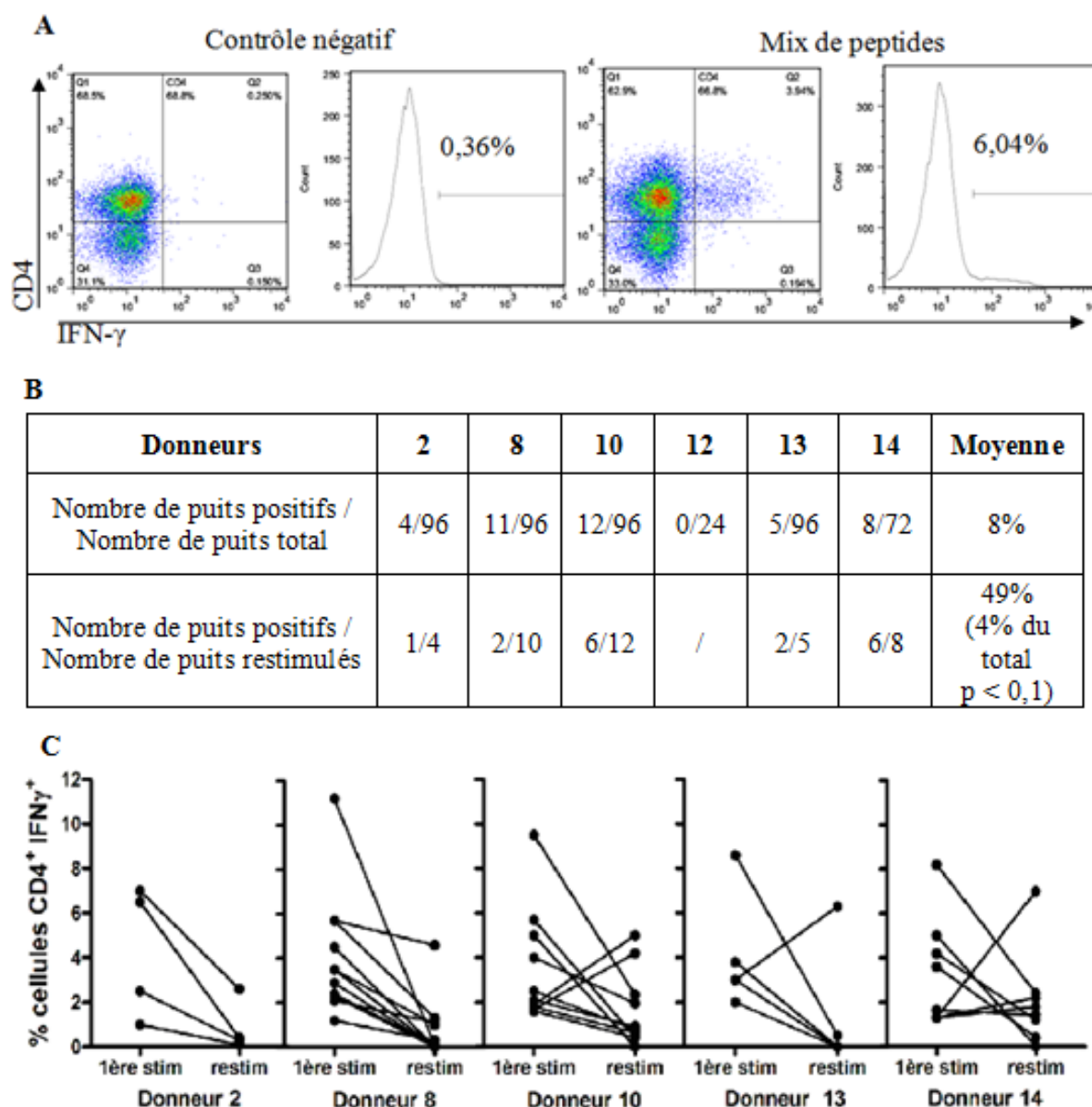


Figure X3 : Réponses CD4 spécifiques au LP 16-40_{A27L} après stimulation puis perte des réponses après re-stimulation par le mix de peptides chevauchants.

A, B, C : Les réponses sont considérées positives lorsque la production d'IFN- γ est supérieure à 1% et égale ou supérieure au double de la production spontanée en absence de peptide. A : Exemple d'une réponse CD4⁺ IFN- γ positive dans un puits de priming en réponse au mix de peptides. B : Fréquence des puits positifs pour différents donneurs après une stimulation par LP modifié 8 μ M de 15 jours ou une deuxième par mix de 9 peptides à 1 μ M/peptide de 8 jours. Statistique : T-test apparié. C : % de CD4 répondeurs au mix de peptide après la première et la seconde stimulation.

Sur six donneurs testés, nous avons pu mesurer une réponse CD4 spécifique chez cinq d'entre eux (Figure X3B et C). Cette réponse est présente à une fréquence moyenne de 8,3% des puits de stimulation, tous donneurs confondus. Le % des CD4 répondeurs est majoritairement compris entre 1 et 6% et peut s'élever jusqu'à 11%. Après huit jours de restimulation par le mix de peptide, on observe une baisse significative du nombre de puits positifs, ainsi qu'une tendance pour la majorité des puits, à une baisse de la proportion de CD4 répondeurs. De nombreuses tentatives d'amplification par re-stimulation ou par culture sur feeders (résultats non figurés) indiquent les mêmes résultats suggérant une difficulté à conserver par ces techniques d'amplification les lymphocytes CD4 spécifiques obtenus après le priming.

4. 4. Des lymphocytes CD4 stimulés par le LP modifié reconnaissent des peptides de séquence naturelle.

Un puits d'un des donneurs dont nous savions que la réponse CD8 spécifique de Melan-A/A2 avait été amplifiée par la présence des CD4, a été utilisé pour tester la réponse des lymphocytes CD4 aux différents LP Melan-A naturels, (Figure X4). Ce puits a également été sélectionné car il présentait une fraction de CD4 répondeurs stable après amplification (Figure 4XB). Nous avons constaté que la diminution de fréquence des CD4 répondeurs s'accompagnait généralement d'une diminution de la fraction CD4 totale au cours de la culture par rapport à la fraction CD8, comme pour le cas du puits sélectionné (Figure X4A).

L'analyse de la réponse aux différents peptides (Figure 4XC) montre que la population polyclonale reconnaît deux des peptides testés : les séquences 22-36 et 25-36. La région 22-36 contient donc l'épitope. Or, cette région contient l'acide aminé 27 qui a été modifié dans la séquence du LP utilisé pour la stimulation. Un long peptide modifié contenant la séquence 22-36_{A27L} stimule donc la croissance de lymphocytes T CD4 qui réagissent aussi à la séquence 22-36 naturelle qui correspond à un épitope reconnu par les lymphocytes CD4 de patients.

Il reste à déterminer par d'autres analyses, quelle est la restriction HLA de ces lymphocytes afin de déterminer s'il s'agit ou non de la restriction déjà décrite pour cet épitope. Quoiqu'il en soit, cette expérience révèle clairement la présence de régions épitopiques modifiées capables de générer efficacement une réponse CD4 spécifique de la séquence naturelle à partir du long peptide modifié.

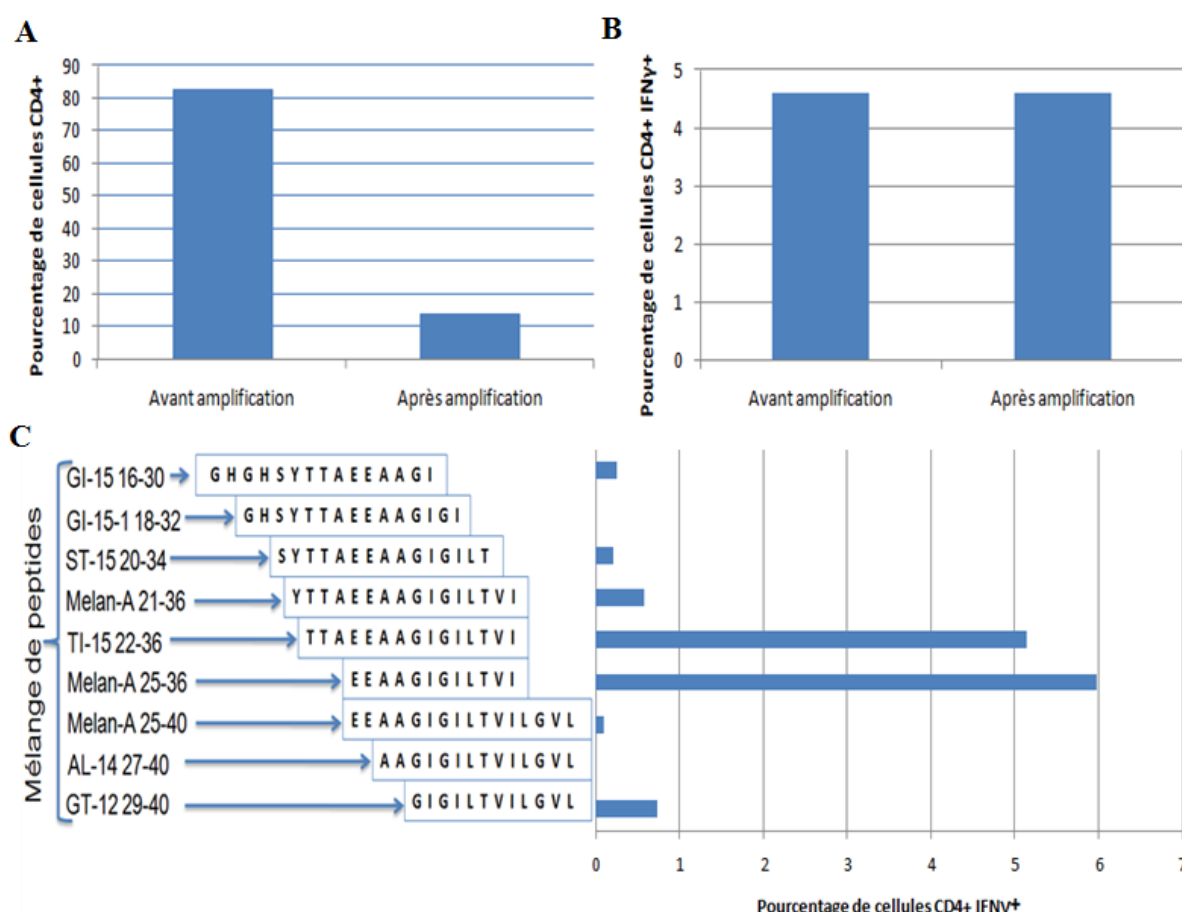


Figure X4 : Analyse de la réactivité du puits 24 du donneur 8 aux différents peptides du mélange en autoprésentation.

A : pourcentage de cellules CD4 dans le puits avant et après amplification. B : pourcentage de cellules CD4⁺ IFN γ ⁺ en réponse au mélange de peptides indiqué en C. C : détail de la réponse CD4 spécifique aux différents peptides. Le pourcentage de cellules CD4⁺ IFN γ ⁺ correspond aux valeurs obtenues après analyse par cytométrie, comme présenté dans la Figure X3. La réponse IFN- γ est considérée positive au-delà de 1% après retranchement du contrôle négatif non stimulé.

Des expériences complémentaires seront nécessaires pour mieux caractériser la réponse CD4 induite par le LP modifié. Cependant les résultats obtenus montrent déjà que le LP 16-40_{A27L} est capable de générer une réponse CD4 spécifique de l'antigène Melan-A naturel et ce chez la majorité des donneurs testés et donc de façon relativement indépendante du type HLA de classe II.

5. Étude des voies d'internalisation et de présentation croisée du LP Melan-A 16-40_{A27L}.

5. 1. Introduction

Les voies de la présentation croisée sont encore mal définies car il existe plusieurs routes possibles en fonction des APC et des antigènes étudiés (Burgdorf and Kurts, 2008). La capacité des DC à cross-présenter l'épitope A2 à partir du LP Melan-A soulève plusieurs questions fondamentales : quel est le mécanisme d'internalisation, quelle est, ou quelles sont les voies d'apprêtement en épitopes CD8 (et CD4) ?

Nous avons tenté de répondre à ces questions en développant une approche en deux temps. Dans une première phase, nous avons utilisé des drogues inhibitrices pour tenter de répondre, au moins partiellement, à ces questions et orienter la suite de l'étude en fonction des résultats obtenus. Ceux-ci suggèrent une voie dépendante du protéasome qui serait délétère dans la génération de l'épitope CD8.

La seconde phase a été entamée par d'autres membres de l'équipe, grâce à une approche de microscopie confocale permettant de visualiser l'internalisation d'un LP fluorescent en présence de molécules inhibitrices ou de siRNA. Nous avons tout d'abord testé quatre longs peptides fluorescents pour leur capacité à être cross-présentés par les DC et montré ainsi que seul l'un d'entre eux avait cette capacité. Les résultats obtenus en microscopie confocale avec ce peptide montrent une co-localisation de celui-ci dans des endosomes précoces des DC durant les 15 premières minutes après la mise en contact puis dans des lysosomes. Ils montrent également l'implication du protéasome et de la molécule TAP dans le routage du long peptide. L'étude se poursuit avec l'analyse en complément d'un LP fluorescent de NY-ESO et les résultats obtenus vont prochainement faire l'objet d'un article.

5. 2. L'internalisation du LP est un phénomène actif qui implique l'actine.

Afin de déterminer les mécanismes d'endocytose impliqués dans l'internalisation du LP Melan-A 16-40_{A27L}, plusieurs molécules inhibitrices ont été utilisées : les cytochalasine D et B deux inhibiteurs distincts de la polymérisation de l'actine associée à l'endocytose et à la motilité cellulaire, la monodensyl-cadaverine qui inhibe endocytose médiée par les vésicules

à clathrine et l'amiloride qui inhibe l'endocytose impliquant les canaux sodiques et calciques. La réponse d'un clone spécifique de l'épitope A2 a été évaluée par sa production d'IFN- γ après stimulation par des DC pulsées par le LP en présence ou absence d'inhibiteur (Figure Y1). La réponse à des CD chargées par le peptide court modifié (ELA), est mesurée en parallèle, comme contrôle positif, permettant de distinguer un éventuel effet des drogues sur la viabilité des CD ou sur l'expression de CMH-I par ces cellules, d'un effet inhibiteur de la présentation croisée. Les cytochalasines et l'amiloride n'induisent pas de variation mesurable de la présentation exogène du peptide court modifié (ELA). Ceci permet d'évaluer l'influence de ces molécules à la présentation croisée du LP (Figure Y1A, B, C). On peut constater que la cytochalasine D inhibe de manière dose dépendante la présentation croisée et probablement l'endocytose de ce LP, qui dépendrait donc d'un remaniement de l'actine (Figure Y1A). La cytochalasine B en revanche n'induit pas d'inhibition notable (Figure Y1B), indiquant que son action sur la polymérisation de l'actine n'affecte pas l'endocytose du LP. L'amiloride (Figure Y1C) n'induit pas d'inhibition de la réponse du clone, ce qui suggère que l'internalisation n'est pas dépendante d'échanges ioniques à la membrane. La monodensyl-cadaverine a été testée sur des CD de trois donneurs différents (Figure Y1D). Les résultats ont été poolés pour prendre en compte la variation inter-donneur. L'analyse montre qu'elle induit une inhibition dose-dépendante de la présentation. Cependant la même inhibition étant observée pour la réponse au peptide court, cet effet n'est pas spécifique de la présentation croisée.

Ces résultats montrent que le LP est internalisé par une endocytose active dépendante de l'actine mais pas à priori des vésicules à clathrine. D'autres inhibiteurs, tel qu'un inhibiteur des caveolea, ainsi que l'approche siRNA, devront être utilisés pour déterminer avec plus de précision le mécanisme de l'endocytose de ce LP.

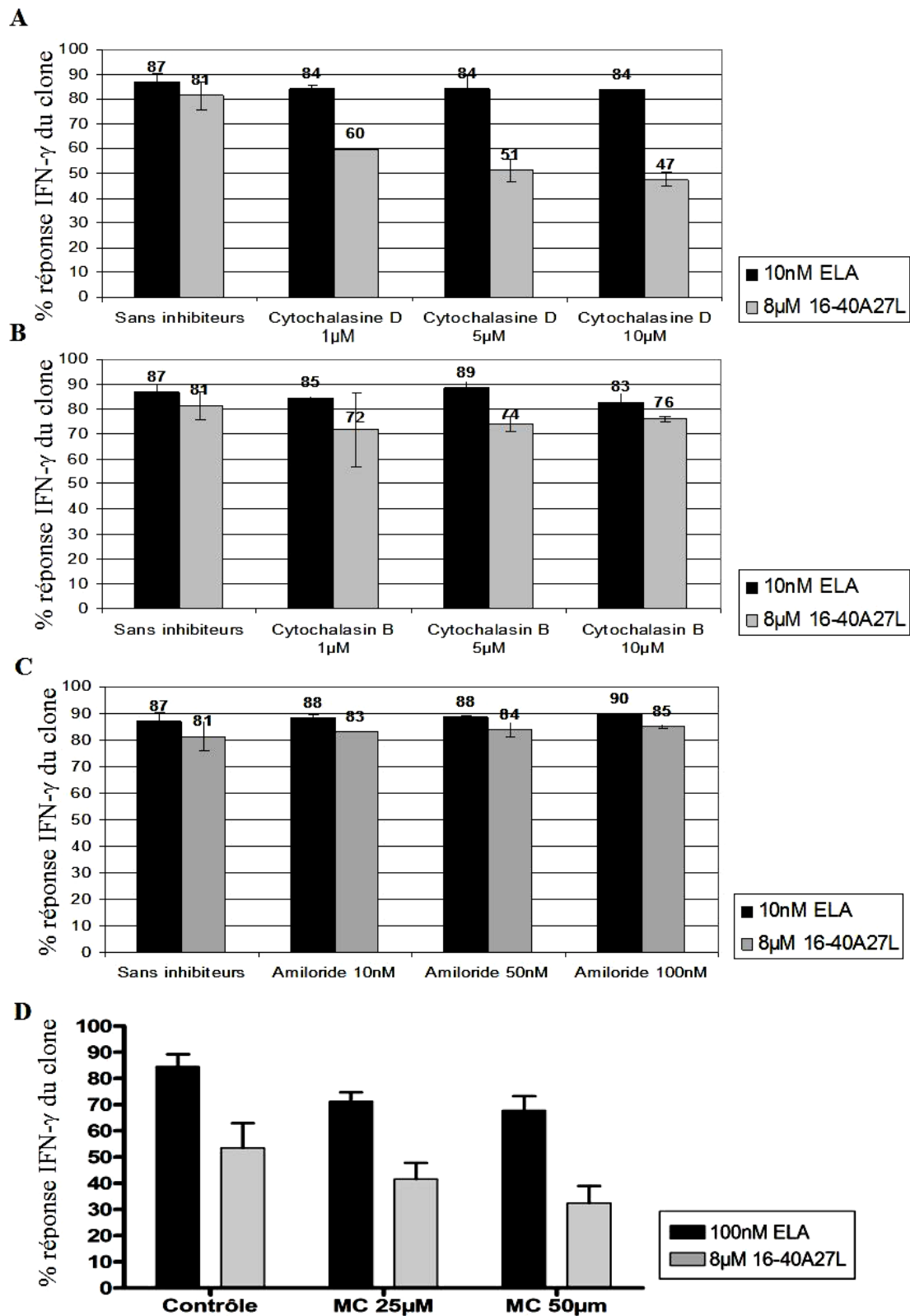


Figure Y1 : La cytochalasine D inhibe spécifiquement présentation croisée, contrairement aux autres inhibiteurs de l'internalisation testés.

La réponse IFN- γ d'un clone Melan-A/A2 spécifique est mesurée envers des cellules dendritiques incubées avec des inhibiteurs avant et durant le pulse de peptide. ELA = peptide épitopique Melan-A modifié. A, B, C : moyennes et écartypes de triplicats sur un donneur. D : moyennes et erreur standard sur 3 donneurs. MC = Monodensyl-cadaverine.

5. 3. L'internalisation et la présentation croisée sont influencées par les interactions des récepteurs membranaires mais ne dépendent ni des récepteurs scavengers ni des récepteurs aux intégrines.

Nous avons ensuite recherché l'implication dans l'endocytose des LP des principaux PRR d'endocytose connus. Pour cela avons incubées les CD avec divers ligands des récepteurs scavengers (Figure Y2A), des récepteurs aux lectines et aux intégrines (Figure Y2A et B). D'autre part nous avons également recherché l'impact sur la présentation croisée d'un traitement des cellules dendritiques par des Ac anti CMH de classe I ou anti HLA-A2. Certaines de ces expériences n'ont été réalisées qu'une fois. Les résultats obtenus présentés ci-dessous devront donc être confirmés. Comme le montre la figure Y2A les lipoprotéines acétylées de faible densité (acétyl-LDL), qui ciblent une partie des récepteurs scavengers, n'ont pas d'effet, les LDL oxydées (ox-LDL) telle que l'albumine maléylée (mBSA) inhibent la réponse du clone mais à la fois au peptide exogène et au long peptide. Cette inhibition de l'ordre de 12% n'est donc pas spécifique de la présentation croisée du LP. D'après le comptage des CD, ce résultat ne serait pas dû à une toxicité des agonistes utilisés. Des résultats similaires sont observés après incubation des CD avec des composants de la matrice extracellulaire contenant ou non des motifs RGD agonistes des récepteurs aux intégrines (Figure Y2A). Nous n'observons pas non plus d'effet après incubation des CD avec le Mannan, agoniste des récepteurs aux lectines de type C (Figure Y2B).

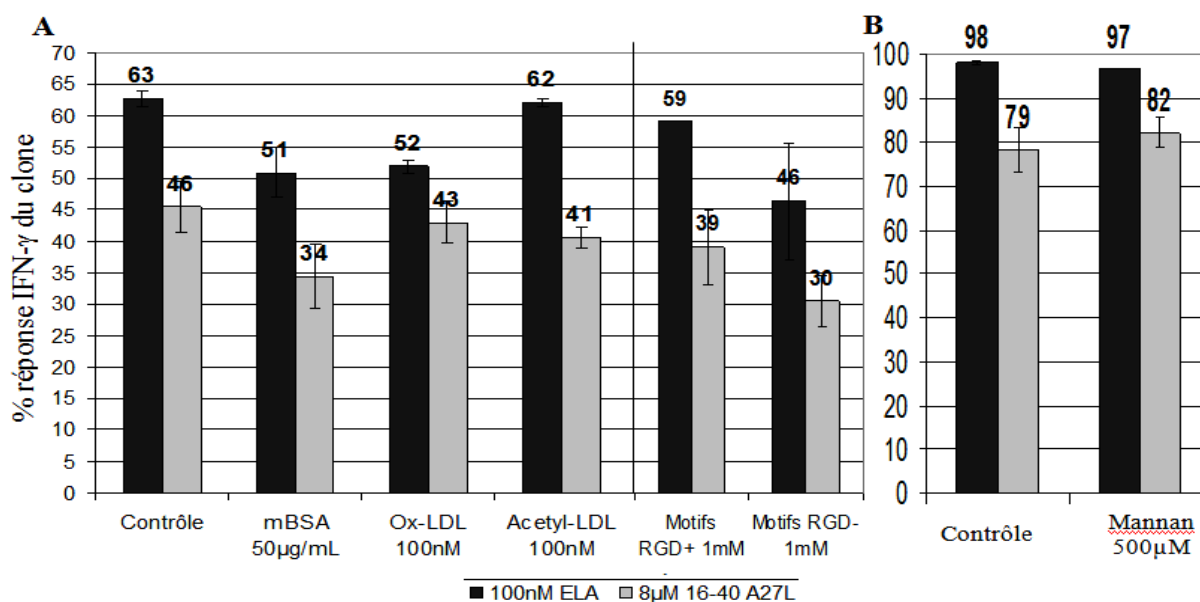


Figure Y2 : L'engagement de PRR d'endocytose n'influence pas spécifiquement la présentation croisée du LP modifié.

Ox-LDL : LDL oxydées, mBSA : sérum albumine bovine maléylée, RGD : acide arginyl-glycyl-aspartique, + : témoin positifs, - : éléments de fibronectine sans motifs RGD.

Globalement, ces résultats préliminaires suggèrent que la présentation croisée du LP Melan-A ne dépend pas des récepteurs de type lectin C ni des récepteurs scavengers.

Afin de tester si l'endocytose pourrait résulter d'une interaction du LP avec des molécules de CMH-I conduisant secondairement à une internalisation du complexe, les CD ont été traitées avec des AC anti-CMH-1, anti-HLA-A2 et avec un Ac contrôle de même isotype (IgG2a). Les résultats de la figure Y3 montrent que ces Ac n'affectent pas la présentation du peptide court. Par contre, l'Ac anti-CMH-1, et plus encore l'Ac anti HLA-A2, augmentent la présentation croisée comparé à l'Ac contrôle. Il manque toutefois dans cette expérience le contrôle de présentation croisée sans Ac qui permettrait de confirmer que l'isotype contrôle n'a pas d'influence en lui-même sur la présentation croisée. En l'état, ces résultats suggèrent que l'endocytose du LP ne se fait pas via l'internalisation des CMH, suite à l'ancrage par l'épitope, mais que l'endocytose des CMH-I provoquée par la liaison aux Ac pourrait augmenter la présentation croisée en favorisant le renouvellement/recyclage de ces CMH.

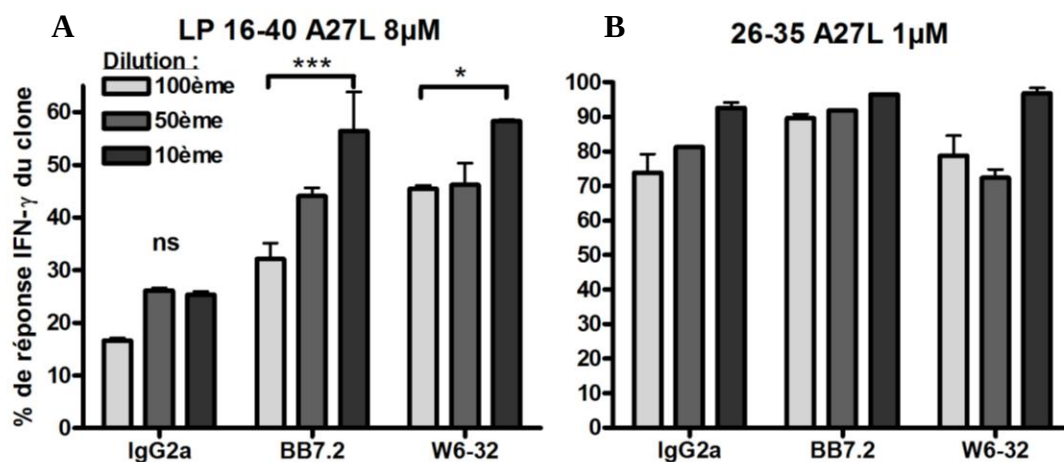


Figure Y3 : Le traitement des CD par des anticorps anti-CMH-I augmente la présentation croisée du LP comparée à un Ac contrôle.

Des DC ont été incubées 30 minutes avant puis durant le pulse de peptides avec des anticorps. IgG2a : anticorps isotype contrôle. BB7.2, W6-32 : anticorps bloquant les CMH-I issus d'ascites générés chez la souris. Test ANOVA à deux entrées (Anticorps/Concentration). Figure A : la concentration et l'anticorps utilisé ont un effet très significatif sur les résultats ; la concentration n'a pas le même effet sur tous les anticorps ; *** : $p < 0,001$; * : $p < 0,1$.

5. 4. Il existe une voie de dégradation du LP secondaire, délétère pour l'épitope et dépendante du protéasome.

En parallèle des expériences précédentes, nous avons voulu déterminer quelle(s) étai(en)t la/les voie(s) de dégradation intracellulaire du LP grâce à l'utilisation d'inhibiteurs d'activités protéolytiques (Figure Y4). La Figure Y4A montre la réponse du clone après incubation des DC avec des inhibiteurs du protéasome : le MG132, qui bloque l'activité chemotrypsine, la lactacystine bloquant l'activité de la sous unité 20S et l'époxomycine bloquant les hydrolases. La réponse du clone à la présentation du peptide exogène n'est pas modifiée par ces inhibiteurs, ce qui permet d'évaluer leur effet sur la réponse à la présentation croisée. On constate que la lactacystine n'a pas d'effet (Figure Y4A) Cependant, dans les deux expériences réalisées j'ai pu noter la toxicité importante de cette molécule pour les CD, suggérant qu'une augmentation de la présentation croisée pourrait compenser cette toxicité. L'époxomycine ne semble pas avoir d'effet notable. En revanche, on observe une tendance du MG132 à augmenter la réponse du clone de façon dose dépendante. Cet effet a été confirmé par son observation répétée dans cinq expériences. De plus, un effet similaire est observé avec une molécule analogue utilisée en clinique : le bortézomib (résultat non figuré). Ces résultats suggèrent donc qu'il existe une voie de dégradation du LP internalisé dépendante d'une activité chemotrypsine du protéasome qui est délétère pour la génération de l'épitope.

Dans la suite des expériences ont été utilisés : la leupeptine (inhibitrice des protéases à sérine et à cystéine), la pepstatine A (qui inhibe les protéases acides), l'ammonium chloride (ou NH_4Cl , inhibant l'acidification des compartiments) (Figure Y4B), l'hydrochloride F6 (qui bloque l'activité isopeptidase-ubiquitine pouvant avoir un rôle indirect dans la dégradation dépendante de l'ubiquitinylation des protéines), ainsi que le protéase inhibiteur AM114 (qui bloque les activités chemotrypsine-like dont la sous unité 20S du protéasome) (Figure Y4C). On constate que les inhibiteurs de la dégradation en milieu acide n'ont aucun effet sur la réponse du clone ce qui suggère que la présentation de l'épitope n'est pas dépendante de ce mécanisme. L'effet du NH_4Cl a été testé plusieurs fois, mais un effet toxique a été noté dans la majorité des cas (non figuré) ne permettant pas de confirmer ce résultat. L'effet de cette molécule a été retestée par J. Ménager dans une autre expérience qui a mis en évidence un effet potentialisateur de la présentation croisée suggérant par conséquent une implication délétère de l'acidification des compartiments sur la génération de l'épitope.

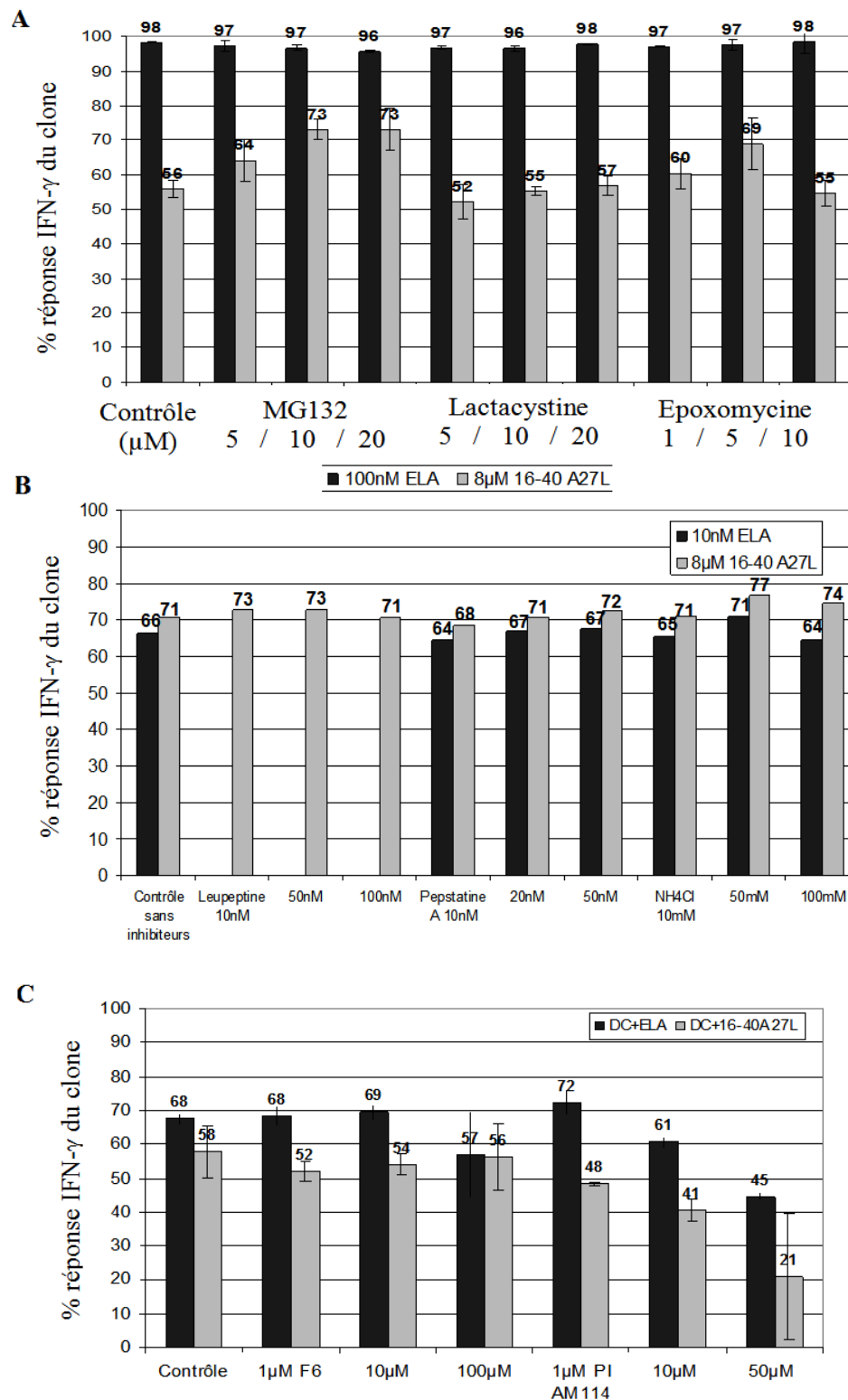


Figure Y4 : Une fraction du LP emprunte une voie de dégradation délétère dépendante du protéasome.

La réponse du clone spécifique de Melan-A/A2 est mesurée en réponse à des DC pulsées et incubées avec des inhibiteurs des voies de dégradation peptidiques. PI : protéase inhibiteur.

La leupeptine elle, ne semble pas avoir d'impact sur la réponse du clone aux concentrations utilisées (Figure Y4B). Toutefois cette expérience ne bénéficie pas du témoin de présentation exogène. Elle nécessiterait d'être complétée afin de confirmer le résultat qui suggère que les protéases à sérine et à cystéines ne sont pas impliquées dans la génération de l'épitope. Enfin, dans la Figure Y4C, l'expérience montre que l'hydrochloride F6, aux concentrations testées n'a pas d'effet lui non plus sur la réponse du clone, indiquant que les mécanismes d'ubiquitinylation ne seraient pas requis pour la dégradation du LP. On note par contre l'effet très inhibiteur de l'AM114 sur la réponse du clone aussi bien à la présentation exogène qu'à la présentation croisée, résultat qui se rapproche de celui de la lactacystine en s'accompagnant d'une toxicité observée sur les DC (mortalité importante).

De tous ces inhibiteurs d'activité protéolytique testés, seul le MG132 permet d'affirmer qu'une fraction du LP emprunte une voie de dégradation dépendante du protéasome et suggère que cette voie est délétère pour la génération de l'épitope. L'étude de la voie de présentation croisée du LP Melan-A a été poursuivie par J. Ménager sous la direction du Dr Y. Guilloux.

5. 5. Analyse de la présentation croisée de longs peptides fluorescents pour la mise au point d'une étude de l'internalisation par microscopie confocale.

Une approche plus directe, afin d'étudier la voie d'internalisation et de présentation croisée est l'utilisation de LP fluorescents visualisables par microscopie confocale afin d'identifier leur trajet intracellulaire via un co-marquage vésiculaire et de réaliser des inhibitions ciblées au niveau des compartiments empruntés. Ceci nécessitait tout d'abord la synthèse de LP fluorescents capables d'être internalisés et de donner lieu à une présentation croisée similaires à celles du LP non marqué. Deux LP naturels et deux modifiés fluorescents ont été synthétisés. Les LP naturels ont été obtenus par couplage des histidines situées en position N terminale avec des encres -bodipy ou acide indocarbocyanine (rot)-. L'un des deux peptides modifiés a été couplé à la fluorescéine, le second a été couplé en position C terminale sur un résidu de lysine surnuméraire également à la fluorescéine. Des DC ont été pulsées avec ces différents peptides, en présence de MG132 dans le cas des peptides naturels (afin de potentialiser la réponse du clone), en utilisant le protocole habituel à l'exception du fait que les DC ont été lavées une fois de plus avant l'incubation avec le clone. En effet, l'observation au microscope a révélé le fait que les encres rendaient les peptides particulièrement adhérents

(au plastique et entre eux sous forme d'agrégats). Les résultats de la réponse à la présentation croisée sont montrés figure Y5.

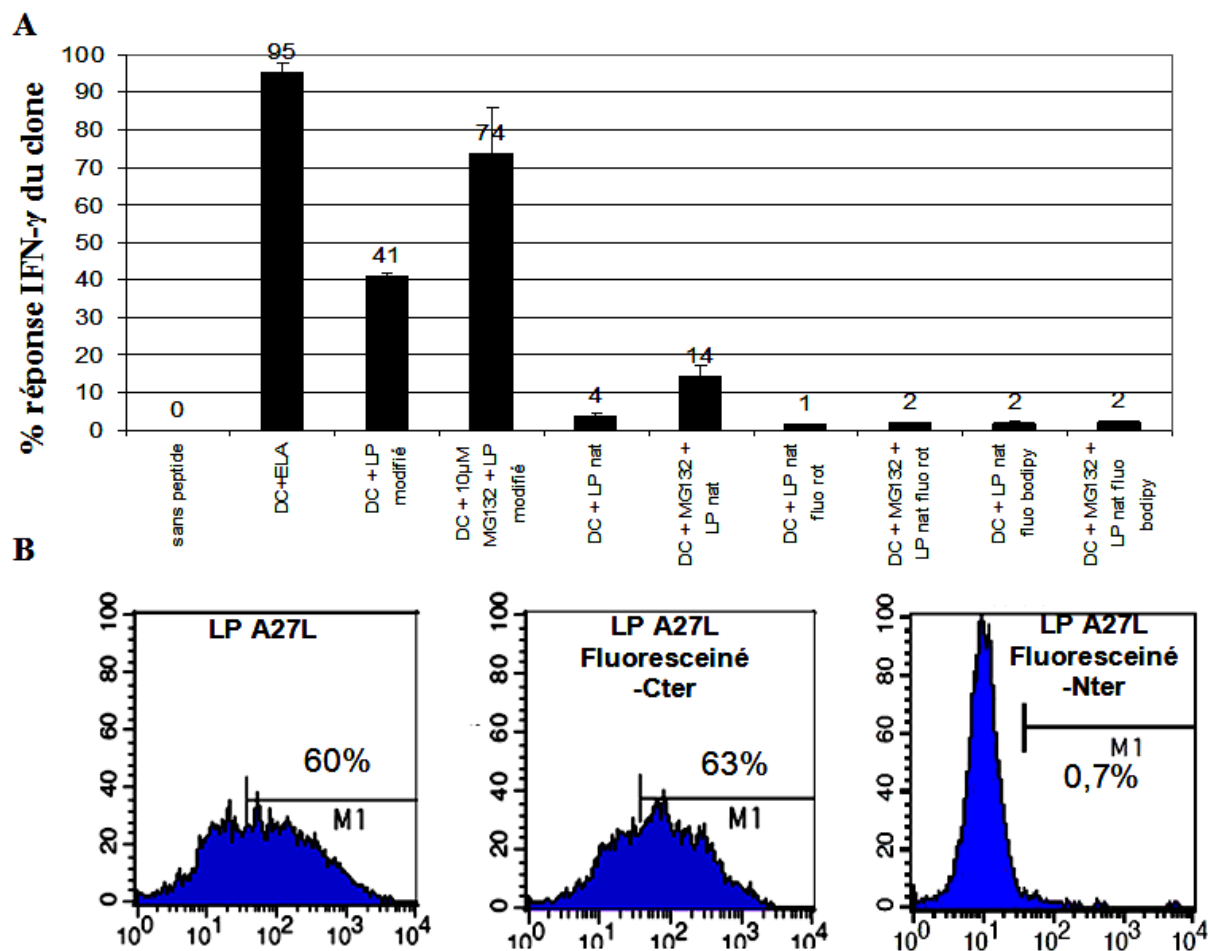


Figure Y5 : Présentation croisée d'un LP Melan-A 16-41_{A27L} fluorescent couplé en position C terminale contrairement aux LP couplés en position N terminale.

LP 16-40 modifié A27L : 8μM, LP naturel et LP naturels fluorescents : 64μM. A, B : Comparaison de la réponse d'un clone spécifique à des DC pulsées par différents longs peptides fluorescents ou non. A : Réponse du clone à la présentation croisée des LP naturels fluorescents couplés sur les histidines côté N-terminal de la séquence en présence ou absence de MG132. B : Comparaison de la réponse à la présentation croisée d'un LP 16-41_{A27L} couplé en position C terminale et d'un LP 16-40_{A27L} couplé sur les histidines du côté N terminal de la séquence avec le LP 16-40_{A27L} non fluorescent.

On peut constater qu'aucun des deux peptides naturels couplés ne permet d'obtenir une réponse du clone même en présence de MG132 contrairement au peptide naturel non couplé (Figure Y5A) et en comparaison avec le témoin du LP modifié. Ces peptides couplés à des encres, très adhérents et dont les agrégats se révèlent difficiles à éliminer des puits des plaques de culture s'avéraient d'avance de mauvais outils pour la microscopie confocale. La figure Y5B montre le résultat brut obtenu après analyse au FACS dans l'une des expériences

réalisées pour comparer la réponse du clone à la présentation croisée des LP modifiés couplés ou non à la fluorescéine. On constate que le LP couplé en N terminal ne génère aucune réponse, ce qui suggère qu'il ne donne pas lieu à une présentation croisée contrairement au LP couplé en C terminal qui génère une réponse similaire au LP modifié non couplé. Ces observations suggèrent que le couplage en N terminal génère un changement de conformation ou un encombrement stérique qui empêchent la DC de dégrader convenablement le LP pour générer l'épitope. L'internalisation du LP couplé FITC en position C terminale quant à elle capable de générer une réponse T. Ce LP a permis ensuite de visualiser par microscopie confocale la cinétique et les compartiments d'internalisation de ce LP dans des CD en collaboration avec le Dr. Y. Guilloux J Ménager et R. Oger. Cette étude a montré une co-localisation du LP fluorescent dans les CD avec des endosomes d'abord, puis avec des lysosomes (résultats non figurés).

6. Étude de la présentation croisée de longs peptides dérivés de trois antigènes du mélanome et de leur capacité de cross-priming.

6. 1. Introduction

L'impressionnante capacité du LP Melan-A modifié à générer un priming des CD8 spécifiques, comparé à la séquence naturelle, nous a conduits à vouloir vérifier si ce phénomène pouvait être reproduit avec un autre antigène comportant un épitope CD8 de faible affinité pour le HLA. Nous avons alors choisi de travailler sur l'épitope NY-ESO-1 156-165 qui présente une cystéine en position 9 et dont plusieurs analogues modifiés en cette position sont capable de stimuler, plus fortement que l'épitope naturel, une réponse CD8 cross-réactive avec l'épitope naturel (Romero et al., 2001).

Par ailleurs, dans la perspective d'étudier, à moindre coût, la présentation croisée et le priming de multiples épitopes CD8, nous avons tenté d'identifier un peptide Melan-A plus court que le 16-40 dans lequel nous pourrions insérer à la place de l'épitope 26-35 les épitopes CD8 d'autres antigènes. Pierre Larrieu avait préalablement observé que le fragment Melan-A 21-40 ne donne pas lieu à une présentation exogène mais en plus, induit une présentation croisée de l'épitope 26-35 aussi forte que le LP 16-40. Nous avons choisi de

tester la capacité de cross-priming de ce LP, puis la capacité d'un LP chimère dérivé de ce dernier par remplacement de la séquence 26-35 par la séquence de l'épitope NA17-A 1-10 à induire une cross-présentation de cet épitope et un cross-priming. Le peptide 21-40 présente également, comparé au 16-40, l'intérêt d'une synthèse plus aisée du fait de son caractère moins hydrophobe. Nous avons par ailleurs comparé la présentation croisée de l'épitope NA17-A induite par ce peptide chimère avec celle induite par un LP de cet antigène préalablement rapportée par le groupe d'Olivier Lantz.

A l'aide de clones CD8 précédemment obtenus dans le laboratoire nous avons pu analyser et comparer les capacités de ces LP à générer une réponse T par présentation croisée. L'étude s'est ensuite poursuivie par l'analyse des capacités de ces LP à stimuler une réponse T spécifique chez des donneurs sains.

6. 2. Le LP Melan-A 21-40_{A27L} permet une présentation croisée durable mais un priming induisant une amplification plus précoce et peu durable de lymphocytes spécifiques comparé au 16-40_{A27L}.

Réduire la taille du LP en utilisant un 20mer au lieu d'un 25mer avait pour but d'obtenir des résultats optimisés avec un LP plus aisé à synthétiser du fait de l'élimination des acides aminés très hydrophobes en début de séquence. Il restait à vérifier le potentiel de ce 20mer en termes de présentation croisée et de priming de lymphocytes spécifiques de mélanome par rapport au 25mer.

La réponse du clone spécifique des épitopes Melan-A naturel et modifié a été comparée face à des DC pulsées 3 heures par le 20mer Melan-A 21-40_{A27L}, en comparaison avec le 25mer (16-40_{A27L}) et plusieurs jours après le pulse (Figure Z1). La comparaison des deux longs peptides (Figure Z1A) montre que le niveau de réponse du clone est en moyenne supérieur de 20% par rapport au 16-40_{A27L} à chaque concentration. De plus, les CD fixées ne sont reconnues que pour des concentrations supérieures à 8µM. Le 21-40_{A27L} est donc bien présenté exclusivement de façon croisée par les CD. Une présentation croisée équivalente est obtenue pour des concentrations 8 fois inférieures du peptide 21-40, ce qui indique également que la séquence hydrophobe en N-terminale présente dans le 16-40_{A27L} n'est pas indispensable au transport et au découpage intracellulaire du peptide pour la génération de l'épitope. L'analyse de la cinétique de présentation croisée après un pulse des CD par 8µM de

21-40_{A27L} (Figure Z1B), montre de plus que la présentation de l'épitope dure au moins jusqu'à 72h, même si on constate dans cette expérience une diminution importante de la réponse après 48h. Le 21-40_{A27L} semble donc posséder des capacités de présentation croisée supérieures à celle du peptide Melan-A 16-40_{A27L} en terme de concentrations requises mais la durée de cette présentation semble plus limitée comparée au peptide 16-40.

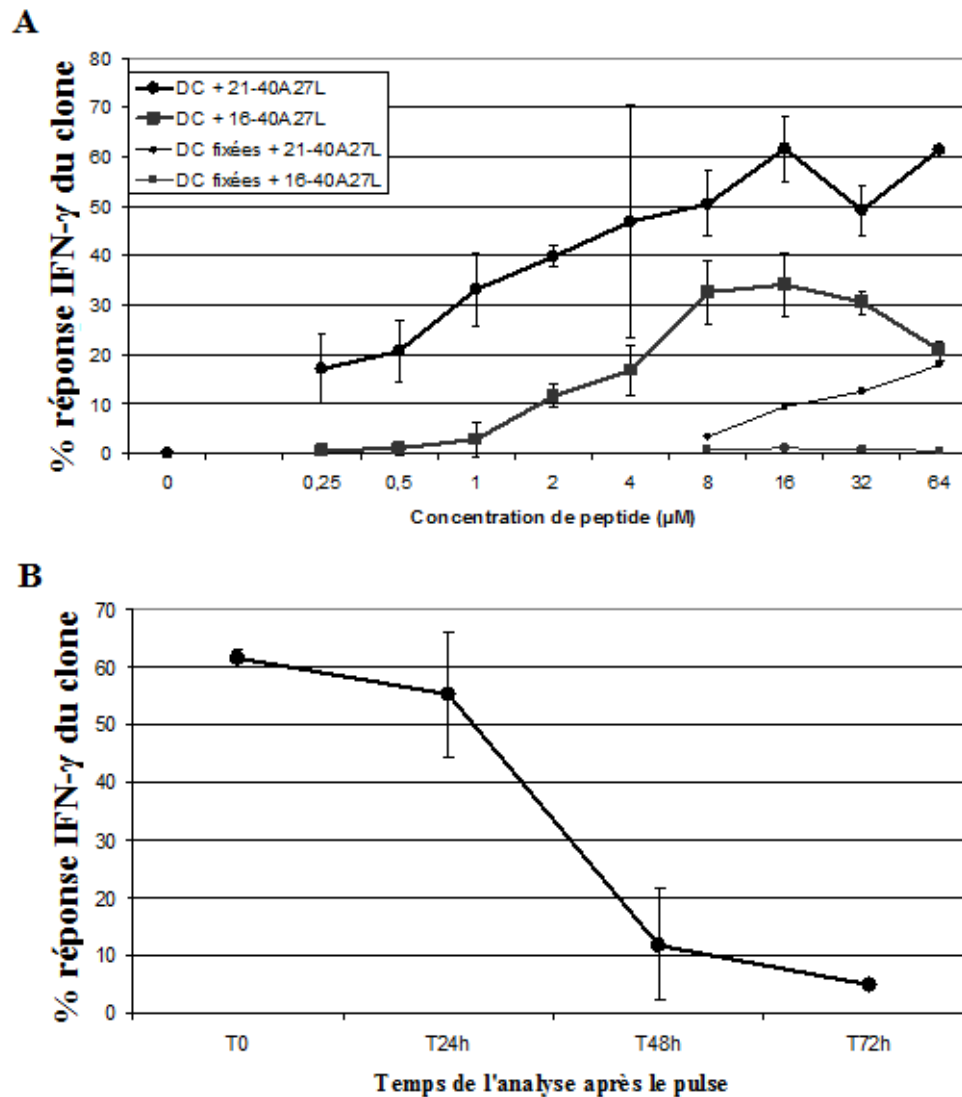


Figure Z1 : Présentation croisée efficace et à long terme du peptide Melan-A 21-40 modifié A27L.

A, B : Réponse IFN- γ du clone spécifique M77-84 aux DC vivantes ou fixées pulsées. A : Comparaison de la réponse à la présentation croisée du 21-40 ou du 16-40 modifiés à différentes concentration. Conditions réalisées en duplicates. B : Analyse de la réponse du clone à différents temps d'incubation (T) après le pulse des DC par 8 μ M de 21-40_{A27L}. Conditions ont été réalisées en triplicates.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux capacités de priming du 21-40_{A27L} en comparaison avec le 16-40_{A27L} (Figures Z2 et Z3). Dans une première expérience, nous avons également comparé le priming induit par ces deux LP avec ceux induits par le LP naturel et le peptide court modifié 26-35_{A26L} (Figure Z2). Si le nombre de puits analysé (douze à quatorze) et les faibles fréquences de lymphocytes tetramer⁺ obtenues chez ce donneur n'apportent pas d'évidences statistiques des différences de fréquence des cellules, observées précédemment entre le LP modifié et le peptide court modifié entre 9 ou 14 jours de stimulation (figure Z2A), on observe tout de même une tendance du 21-40_{A27L}, comme du peptide court modifié, à générer des lymphocytes spécifiques de façon précoce (à J9) qui diminuent ensuite (J14) à l'opposé du 16-40_{A27L}. Par ailleurs, l'analyse de la réponse IFN- γ à la cellule tumorale des cellules tétramères⁺ générées par ces différents LP montre ne montre pas de différence significative. Le peptide court en revanche, semble générer moins de tetramer⁺ répondeurs que les LP, avec une différence statistique observée par rapport au 21-40_{A27L} (Figure Z2B). Le 21-40_{A27L} est donc capable de générer des lymphocytes spécifiques de l'antigène présenté par les cellules tumorales.

Nous avons voulu confirmer chez un second donneur la tendance observée d'une diminution des lymphocytes tetramer⁺ au cours du temps (Figure Z3). L'expérience a donc été reproduite. La présence de lymphocytes tetramer⁺ (Figure Z3A et C) et leur fréquence dans la fraction des CD8⁺ (Figure Z3B et D) a été analysée. L'observation des puits de culture au microscope (données non figurées) permet déjà de noter une différence de prolifération générale des cellules entre les deux conditions de stimulation. En effet, celle-ci démarre plus précocement avec le 21-40_{A27L}, ce qui suggèrerait une stimulation précoce. A J11 toutefois, les deux longs peptides génèrent une fraction similaire de cellules tetramer⁺. Cependant, dès J14 puis encore plus nettement à J18, on observe une différence statistique entre les deux (Figure Z3A et B) qui confirme : la fréquence supérieure des cellules tétramères⁺ dans les puits stimulés par le 16-40_{A27L} (Figure Z3A et B), l'augmentation de la fréquence des tétramères⁺ entre J11 et J18 pour les puits positifs stimulés par le 16-40_{A27L}, et à l'inverse la diminution du pourcentage de ces cellules dans les puits stimulés par le peptide 21-40_{A27L} (Figure Z3C et D). Ces résultats confirment la stimulation d'une réponse à la fois précoce et peu durable de lymphocytes spécifiques par le 20mer par rapport au 25mer.

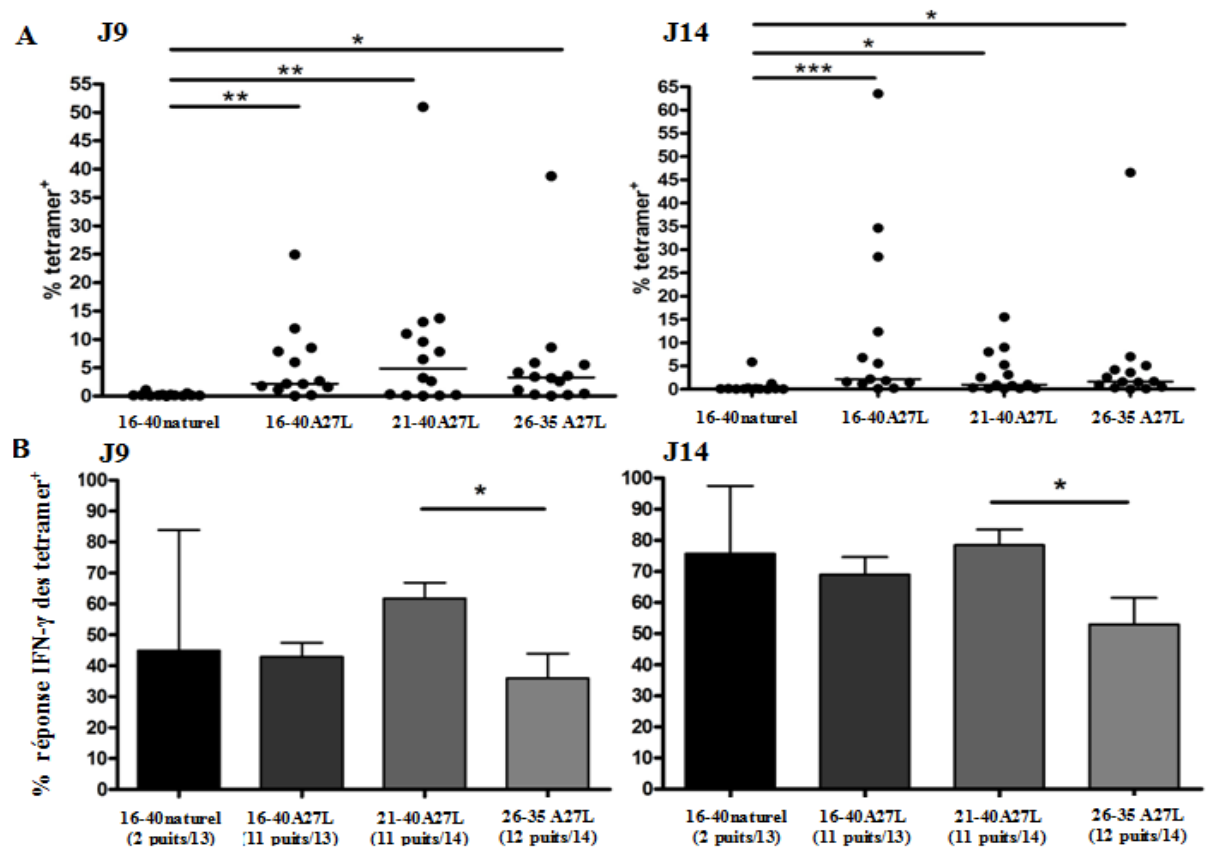


Figure Z2 : Le 21-40_{A27L} génère des lymphocytes spécifiques capables de répondre précocement à la cellule tumorale.

Les PBMC d'un donneur ont été stimulés par 1µM de peptide 26-35_{A27L}, 8µM de LP 16-30, 21-40_{A27L} ou 16-40_{A27L} durant 14 jours. A : Analyse de la fréquence des lymphocytes tetramer⁺ après 9 ou 14 jours de stimulation par différents peptides. B : Réponse IFN-γ à une lignée de mélanome (M113) des lymphocytes tetramer⁺ après 9 ou 14 de stimulation en ratio 1 cellule tumorale pour 1 lymphocyte.

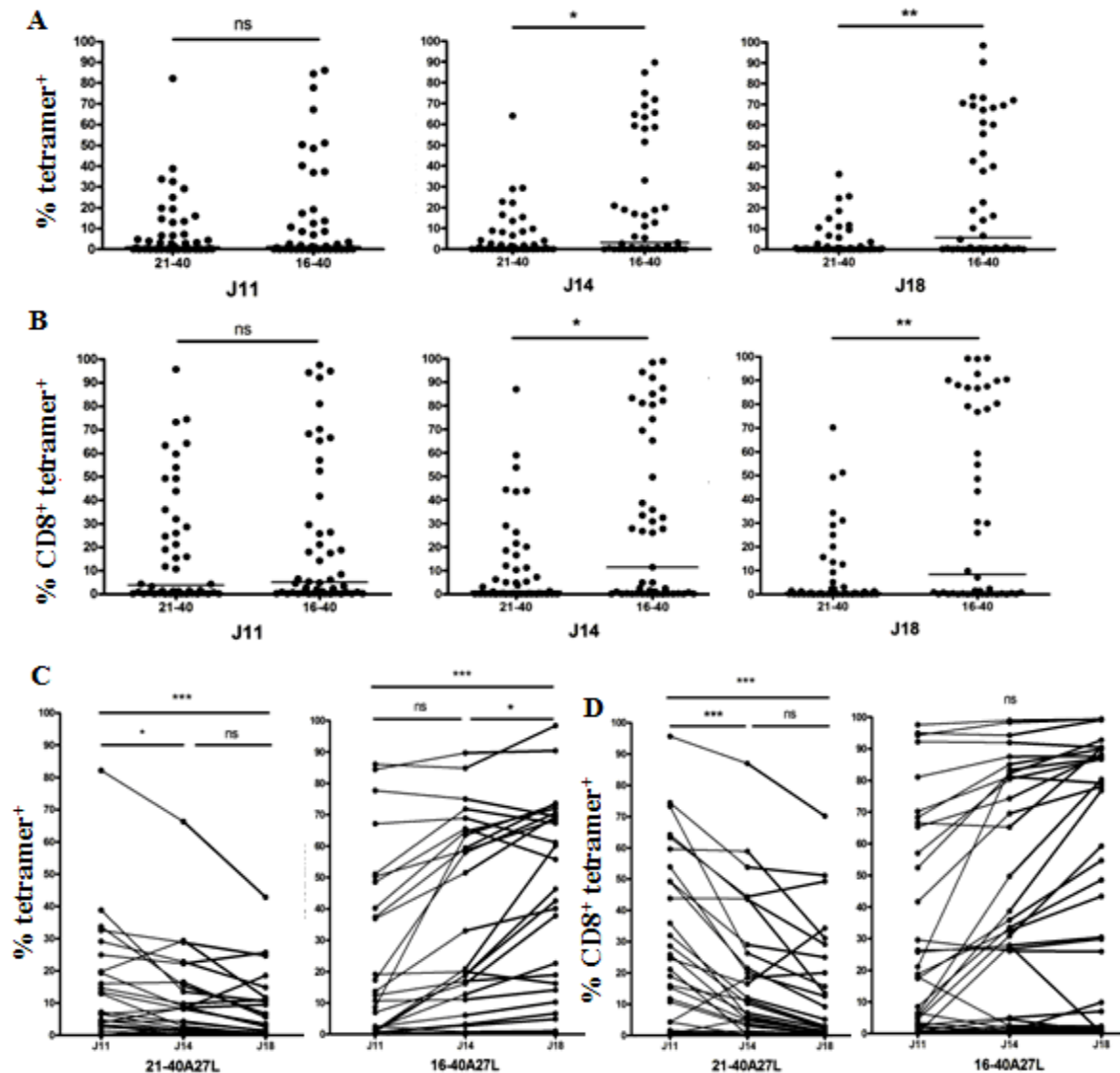


Figure Z3 : Le 21-40_{A27L} stimule efficacement des réponses spécifiques mais moins durablement que le 16-40_{A27L}.

Des PBMC d'un donneur sain ont été stimulés par 8 μ M de LP 21-40 ou de 16-40 modifié. Un marquage CD8-tetramer a été réalisé après 11, 14 et 18 jours de culture. A : pourcentage de tetramer⁺ parmi les lymphocytes. B : pourcentage des tetramer⁺ parmi la fraction CD8⁺. C : évolution du pourcentage des tetramer⁺ parmi les lymphocytes au cours du temps. D : évolution du pourcentage des tetramer⁺ parmi la fraction CD8⁺ au cours du temps.

6. 3. Un 30mer contenant l'épitope NA17A génèrent une présentation croisée par des CD plus durable qu'un 20mer chimère.

L'antigène NA17-A ne contient pas d'épitope CD4 connu. Nous avons donc inclus son épitope CD8 : NA17A1-10 dans la séquence Melan-A 21-40 à la place de l'épitope CD8 Melan-A sachant que nous détruisons ainsi les épitopes Melan-A CD4 de cette séquence. Nous avons ensuite voulu savoir dans quelle mesure ce long peptide chimère permettait

d'induire une présentation croisée de l'épitope NA17-A CD8 et sa durée. Nous avons posée les mêmes questions avec le 30mer naturel NA17-1 1-30 contenant un épitope CD4 viral.

Les Figures Z4A et B montrent que ces deux LP induisent une présentation croisée comparable de l'épitope NA17-A. En effet, on obtient une réponse gamme dépendante, avec des concentrations pouvant descendre jusqu'à 0,02 μ M (Figure Z4B), et une reconnaissance quasi inexistante des CD fixées (Figure Z4A). Nous avons ensuite étudié la durée de ces présentations croisées (Figure Z4C). Le peptide court quant à lui, est présenté de façon dégressive mais pendant au moins quatre jours après le pulse, ce qui indique une très grande stabilité de liaison au HLA-A2. La présentation croisée à partir des deux LP est également durable. Cependant, la présentation croisée induite par le peptide chimère diminue régulièrement de sorte que son niveau reste inférieur à la présentation exogène du peptide court alors que la présentation croisée induite par le 30mer reste stable et devient de ce fait supérieure à la présentation exogène du peptide court à partir du troisième jour suivant le pulse.

Nous avons ensuite testé la capacité de priming des deux longs peptides en comparaison avec le peptide court sur un donneur sain en vérifiant la présence de lymphocytes spécifiques de l'épitope à l'aide de tétramères. Nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de ces lymphocytes après quinze jours de stimulation, ni après un essai de tri des cellules tetramer⁺.

Ces expériences démontrent que des longs peptides synthétiques contenant l'épitope NA17A sont capables d'induire une présentation croisée, durable par des CD en particulier le 30mer.

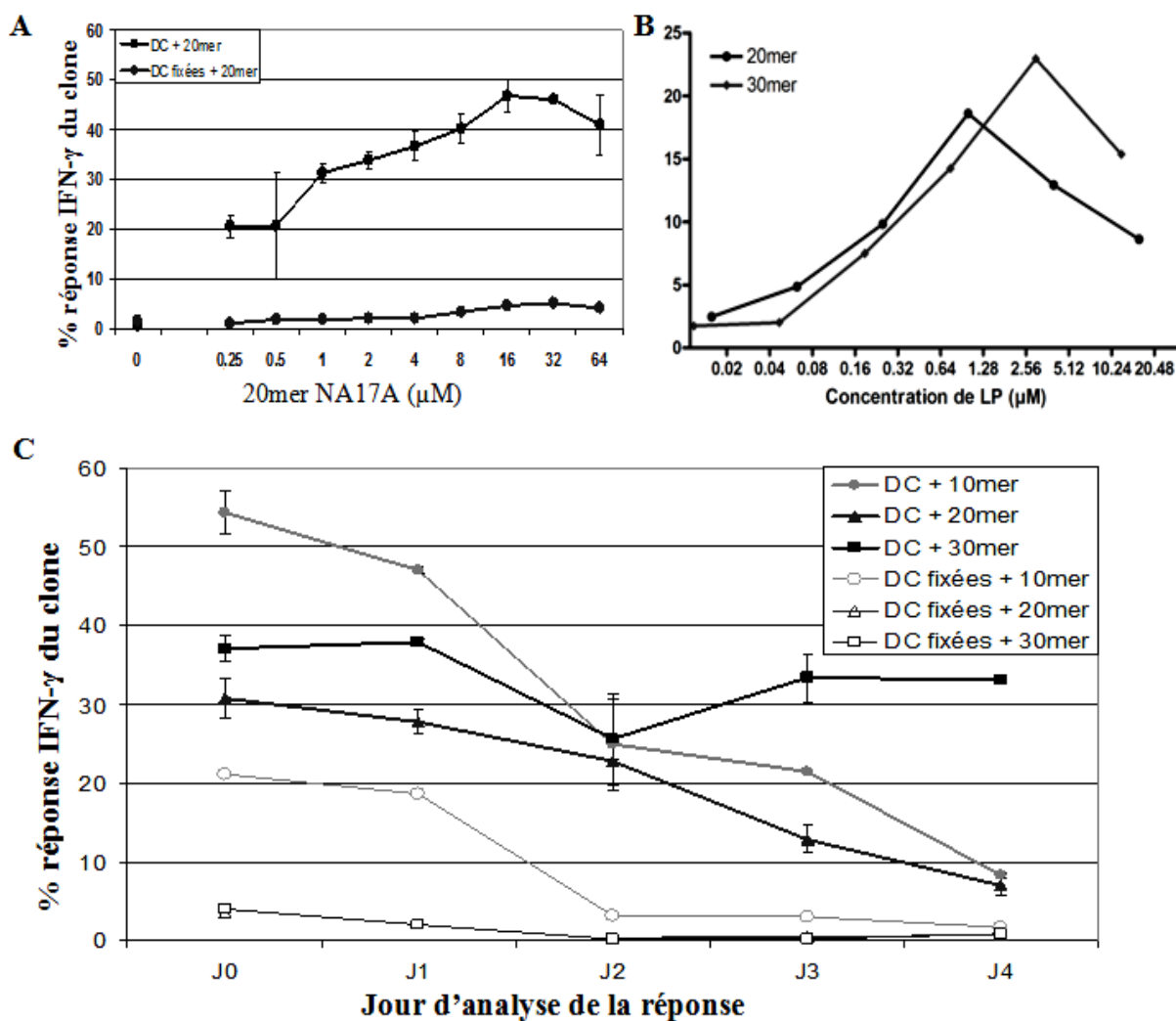


Figure Z4 : Comparaison de la présentation croisée à long terme et de la présentation exogène.

Analyse de la réponse IFN- γ du clone spécifique NA17A à la présentation de l'épitope par des DC, fixées ou non au glutaraldehyde 0,01%, pulsées par des peptides de 10, 20 ou 30mer. A : Analyse d'une gamme de concentration de 20mer NA17A réalisée en duplicates. B : Comparaison d'une gamme de concentration de 20mer et de 30mer NA17A. C : Analyse de la réponse à long terme après le pulse de 10μM de peptide. Condition réalisées en duplicate.

6. 4. Un long peptide NY-ESO contenant un épitope-A2 optimisé pour la liaison au HLA induit une présentation croisée durable contrairement à la séquence naturelle.

Afin de tenter de confirmer avec un second épitope l'importance de la stabilité de liaison au HLA d'un épitope CD8 pour la capacité de cross-priming d'un LP nous avons choisi l'antigène de tumeur « cancer-germ-line » NY-ESO, qui est un candidat intéressant pour l'immunothérapie du mélanome, puisque l'expression d'épitopes est restreinte aux

cellules tumorales. Nous avons choisi plus précisément l'épitope 156-165 dont la stabilité de liaison au HLA-A2 semble limitée du fait de la présence en position 9 d'une cystéine qui est un mauvais résidu d'ancrage à ce HLA. De plus cette cystéine permet la création de ponts disulfures interpeptidiques ce qui limite l'efficacité de stimulation des lymphocytes CD8 spécifiques par le peptide court. Ce problème se pose également, si l'on souhaite utiliser un long peptide, tel le 151-170 qui entoure l'épitope, pour optimiser le potentiel vaccinal de cet antigène grâce à la présentation croisée. Nous avons par conséquent voulu comparer et évaluer la capacité d'un long peptide NY-ESO 151-170 contenant un épitope optimisé C165V (Chen et al., 2000) à générer une réponse T CD8 par présentation croisée par rapport à un LP de séquence naturelle.

A l'aide d'un clone spécifique de l'épitope naturel NY-ESO-1, nous avons tout d'abord comparé la présentation exogène et croisée, par l'intermédiaire d'un long peptide, de l'épitope modifié (Figure Z5). Le clone, bien que spécifique de l'épitope naturel, répond très peu à la présentation de celui-ci par des DC (figure Z5A). En revanche, le peptide optimisé offre une réponse dose dépendante et supérieure à 60% entre 0,1 et 1 μ M de peptide (Figure Z5B). Cette réponse à la présentation exogène est confirmée avec des DC fixées avant le chargement du peptide. On peut alors constater que le long peptide contenant l'épitope optimisé induit une réponse dose dépendante du clone par présentation croisée uniquement (Figure ZC5) puisque les DC fixées et pulsées avec le long peptide ne permettent pas d'induire de réponse.

L'étude menée par Cerundolo V. et son équipe sur l'épitope NY-ESO avait démontré l'efficacité d'agents réducteurs pour empêcher la formation de ponts disulfure, et par conséquent améliorer la réponse du clone au peptide naturel. Il paraissait donc intéressant de vérifier si ce même phénomène se produisait avec des longs peptides afin d'améliorer le chargement des APC *in vitro*, ces données pouvant être utiles à l'élaboration d'un protocole de vaccination. Nous avons donc voulu vérifier, en incubant les APC avec du dithiothreitol durant le pulse de peptide, si l'on observait ces mêmes résultats avec le LP naturel qui contient deux cystéines, mais aussi le modifié qui en contient une (Figure Z6). Nous avons tout d'abord validé ce phénomène avec notre clone en utilisant des cellules T2 comme APC (Figure Z6A). Le peptide optimisé étant déjà fortement reconnu et ne présentant pas de cystéine, il n'apparaît pas de différence de réponse avec l'utilisation de DTT (Figure Z6B).

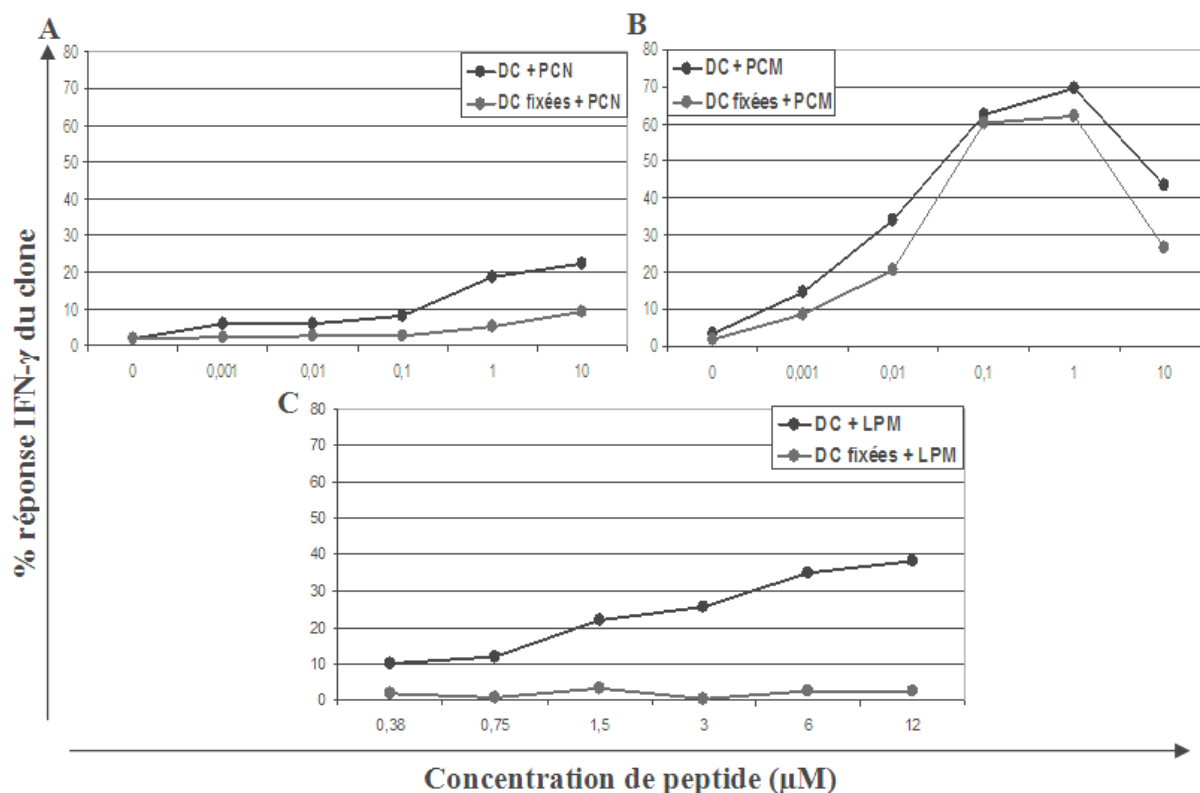


Figure Z5 : Comparaison de la réponse d'un clone spécifique de l'épitope A2 NY-ESO-1 à la présentation exogène du peptide court naturel (PCN) ou modifié (PCM) ou à la présentation croisée du LP modifié.

Analyse de la réponse IFN- γ d'un clone à des DC fixées ou non au glutaraldehyde 0,01% et pulsées 3h par une gamme de concentration de A : peptide court naturel (PCN), B : peptide court modifié (PCM) ou C : long peptide modifié (LPM) NY-ESO.

Les résultats obtenus avec les longs peptides ont d'abord été observés avec des cellules T2 (données non figurées) puis confirmés avec des DC (Figure Z6C et D). Ils montrent qu'effectivement, l'agent réducteur améliore l'efficacité de présentation des peptides comportant une cystéine. Cet effet est positif avec le long peptide naturel, dont la réponse générée par présentation croisée est augmentée pour des concentrations inférieures à 10 μ M. En revanche, on observe contre toute attente un effet délétère sur la réponse du clone avec le LP modifié offrant une réponse similaire, voire moindre à celle du LP naturel aux fortes concentrations de peptide. L'utilisation d'agents réducteurs, si elle est efficace avec les séquences naturelles riches en cystéines, perd alors son intérêt avec le LP modifié.

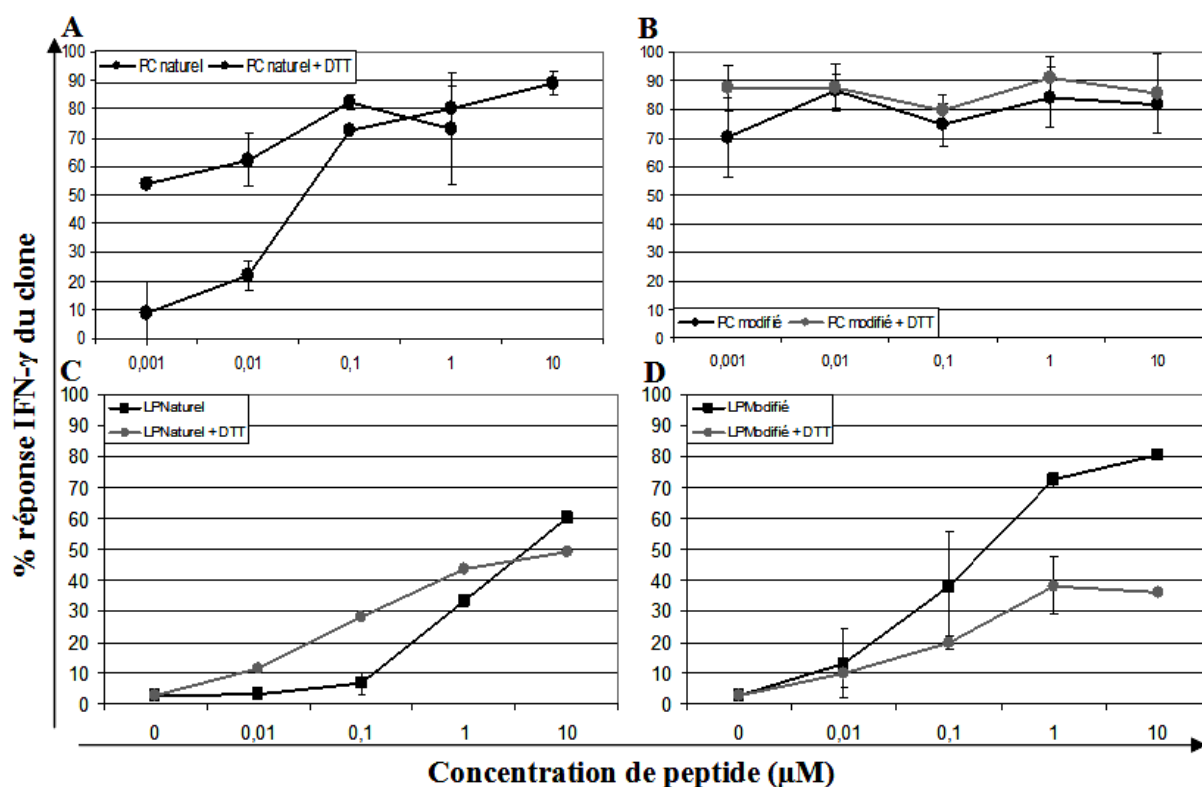


Figure Z6 : Impact d'un agent réducteur sur la présentation des épitopes NY-ESO-1 naturels et modifiés.

Analyse de la réponse IFN- γ d'un clone à des T2 (A et B) ou des DC (C et D) pulsées 3h en présence ou absence de 200 μ M d'agent réducteur dithiothreitol (DTT) par une gamme de concentration de A : peptide court naturel (PCN), B : peptide court modifié (PCM), C : long peptide naturel (LPN), ou D : long peptide modifié (LPM) NY-ESO.

Il était important également de déterminer la durée de capacité de la présentation croisée induite par les LP naturel et modifié (Figure Z7). On constate, aussi bien avec le peptide court que le long peptide naturel, que la réponse du clone est rapidement perdue à partir de 24h (Figure Z7A et C). En revanche, les réponses au peptide court et au LP modifiés persistent au moins quatre jours avec la concentration de peptide la plus élevée (Figure Z7A et C). La diminution de réponse observée au cours du temps coïncide avec la concentration initiale de peptide. Le profil de réponse obtenue entre le peptide court modifié et le long peptide modifié indique que l'épitope est présenté de manière aussi stable dans un cas comme dans l'autre, bien que le chargement exogène génère des réponses comparables pour des concentrations au moins 10 fois inférieures à celles utilisées pour la présentation croisée du LP. Ceci confirme, comme observé pour les autres longs peptides étudiés, que pour un même nombre de molécules, la dégradation du long peptide NY-ESO génère un rendement moindre

de complexes HLA-A2-épitope par présentation croisée que le peptide court par présentation exogène.

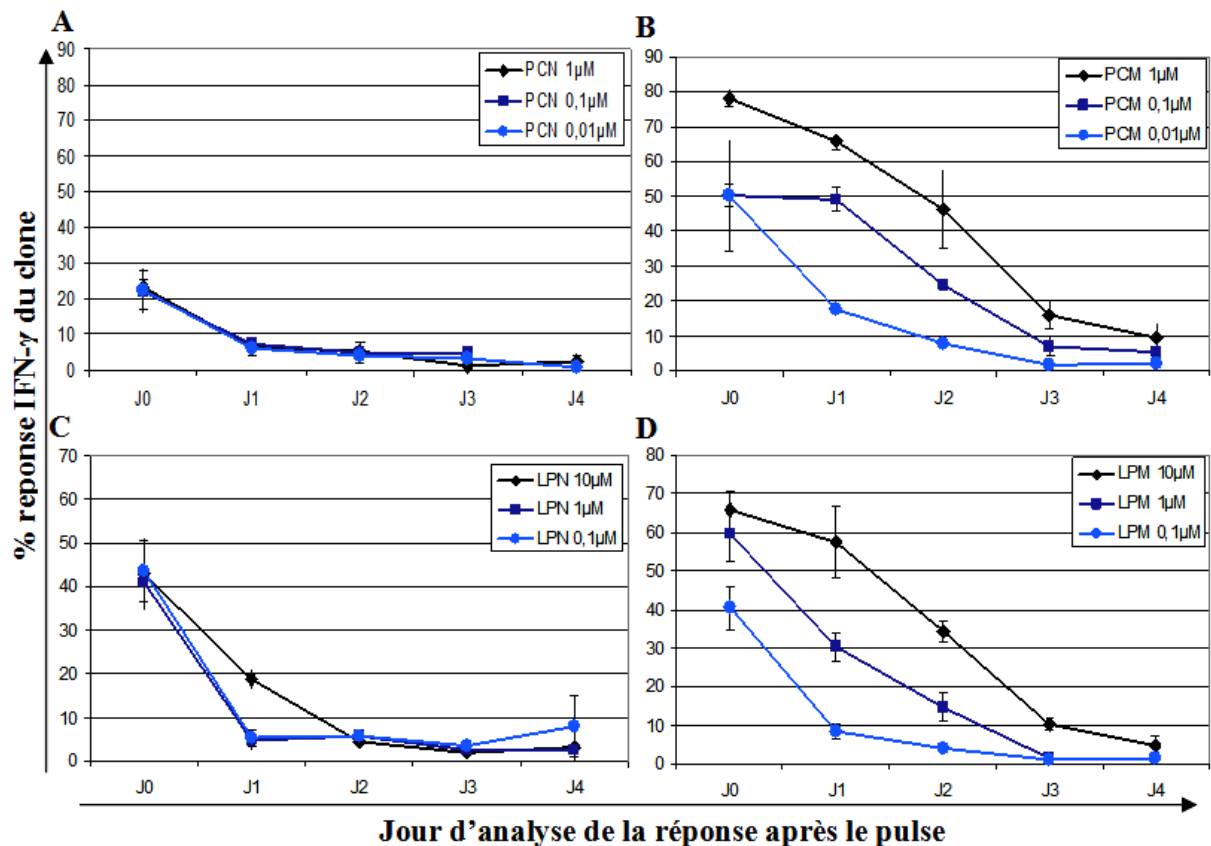


Figure Z7 : L'épitope NY-ESO modifié est présenté de façon durable contrairement au naturel.

Analyse de la réponse IFN- γ d'un clone à la présentation de l'épitope par des DC pulsées 3h en présence ou absence de l'agent réducteur dithiothreitol (DTT) par une gamme de concentration de A : peptide court naturel (PCN), B : peptide court modifié (PCM), C : long peptide naturel (LPN), ou D : long peptide modifié (LPM) NY-ESO.

Nous avons ensuite voulu tester, chez des donneurs sains les capacités de cross-priming du long peptide NY-ESO-1 modifié. De même qu'avec l'antigène NA17A et malgré plusieurs essais de priming, et plusieurs re-stimulations, nous ne sommes parvenu ni à visualiser ni à isoler la présence d'une population spécifique de NY-ESO chez quatre donneurs différents.

Discussion

Les essais cliniques de vaccination utilisant des épitopes CD8 d'antigènes tumoraux, ou des CD chargées par ces peptides, ont montré leur incapacité à induire des réponses T CD8 fortes et durables chez les patients. Comme souligné récemment par Melief et van der Burg (Melief and van der Burg, 2008), les peptides courts peuvent se fixer de manière exogène sur les CMH-I de n'importe quelle cellule, ce qui expose les lymphocytes T CD8 à une stimulation non optimale, en l'absence de molécules de co-stimulation et d'un help des CD4, conduisant à l'induction d'une anergie ou à une prolifération limitée des lymphocytes CD8. Après les études pionnières ayant établi l'immunogénicité des longs peptides contenant des épitopes CD8 et CD4 chez la souris (Fayolle et al., 1991; Kast et al., 1991), le groupe de Melief l'a ensuite directement comparée à celle des peptides courts. Cette étude a montré que les LP induisent une présentation antigénique dans les organes lymphoïdes secondaires, et une réponse T durables contrairement aux peptides courts (Bijker et al., 2007). Les longs peptides contenant des épitopes CD8 et CD4 constituent donc une alternative vaccinale attractive, lié au fait que leur présentation requière une internalisation et un processing intracellulaire à priori restreints à des CPA. Un autre intérêt des LP en tant que préparation vaccinale est le coût relativement modéré de leur production par synthèse peptidique. Lorsque nous avons commencé ce travail, aucune étude n'avait été réalisée pour préciser la capacité des LP d'antigènes de tumeurs humaines à être cross-présentés par les CD, la nature des cellules capables d'une telle présentation et l'efficacité de priming en résultant. Les objectifs de ma thèse ont donc été de répondre à ces questions.

Dans un premier temps, nous avons étudié les capacités de priming du LP Melan-A 16-40 et de son homologue Melan-A-16-40_{A27L}, portant une modification qui optimise la liaison de l'épitope CD8 26-35 au HLA-A2 (Valmori et al., 1998). Le choix de cet antigène a été guidé par l'existence d'un répertoire naïf de taille exceptionnelle vis-à-vis de l'épitope Melan-A 26-35 chez tous les individus HLA-A2 (Alanio et al., 2010; Dreno et al., 2002; Dudley et al., 2002)), et sur des données cliniques suggérant l'intérêt d'immunothérapies adoptives ciblant cet épitope (Dreno et al., 2002 ; Dudley et al., 2002). Juste après le démarrage de cette étude, Faure et al ont démontré qu'une séquence très proche: Melan-A 15-40 induit une présentation croisée durable de l'épitope 26-35 par les CD dérivés de monocytes, par rechargement des CMH-I à partir d'un stock intracellulaire du LP (Faure et al., 2009). Nous avons tout d'abord confirmé que les deux LP Melan-A utilisés induisent également une présentation durable de l'épitope CD8 naturel ou modifié par des CD dérivées de monocytes. Nous avons observé que la réponse du clone induite par le LP modifié est plus forte et plus

durable que celle induite par le LP naturel. Cependant, la réactivité plus forte de ce clone, (et de la majorité des lymphocytes CD8 spécifiques de Melan-A présents chez les patients HLA-A2) étant établie (Valmori et al., 1999) ces résultats ne permettent pas de déterminer si la différence observée résulte de la présentation croisée d'un plus grand nombre de complexes CMH-peptides et/ou simplement de la meilleure affinité du clone pour le complexe CMH-peptide modifié, du fait de la stabilité supérieure de ce complexe, comparé au naturel (Valmori et al., 1998).

Nous avons par ailleurs montré que la présentation croisée du LP modifié semble être une propriété exclusive des APC d'origine myéloïde : monocytes et DC dérivées de monocytes, puisqu'elle n'a pas été observée par des lymphocytes B CD19⁺, par les clones CD8 en auto-présentation, par une lignée tumorale A2 n'exprimant pas Melan-A (résultats non figurés) ni par des cellules dendritiques plasmacytoïdes. La présentation par les monocytes pourrait résulter de leur différenciation rapide en DC. En effet des signaux de stress comme les chocs thermiques par exemple, peuvent induire une différenciation rapide des monocytes en DC capables de stimuler efficacement une réponse T CD8 (Aguilera et al., 2011). Il est probable que les étapes d'élutriation subies par les monocytes utilisés dans nos expériences, ainsi que les protocoles de congélation/décongélation, aient également induit une certaine différenciation de ces cellules en leur procurant la capacité de cross-présentation des LP. La restriction de la présentation croisée des LP aux CD myéloïdes constitue un facteur favorable à l'induction *in vivo* d'une présentation antigénique efficace par ces LP, puisque ces cellules sont actuellement considérées comme les seules efficaces à primer des réponses T optimales. Cependant, bien que nous n'ayons pas posé formellement cette question, l'internalisation des LP et leur présentation croisée n'induit pas une maturation complète des CD, qui dépend dans nos expériences de l'addition d'agents de maturation (résultats non montrés). De tels agents devront donc être utilisés dans le cas de vaccination par des LP. Dans ce contexte, des études ont suggéré la possibilité d'utiliser des longs peptides couplés à des ligands de TLR (Khan et al., 2009). Néanmoins, l'administration de ces formulations pourrait poser des problèmes de toxicité grave caractérisés par un « orage cytokinique » (Kitamura et al., 2010; Ly et al., 2010). A ce jour les LP utilisés en clinique ont été administrés en association avec des préparations d'adjuvant incomplet de Freund, et parfois avec un prétraitement local par imiquimod (Kenter et al., 2009; Rosario et al., 2010; Welters et al., 2010). Récemment deux sous-types de CD myéloïdes circulantes ont été décrits chez l'homme les CD BDCA1⁺ et BDCA3⁺/CD141⁺ (Bachem et al., 2010; Dzionek et al., 2000;

Jongbloed et al., 2010; Poulin et al., 2010). Il serait intéressant d'étudier les capacités relatives de ces deux sous-types de cellules à cross-présenter les LP.

Les études de priming basées sur une incubation des PBMC avec les LP ou de cross-priming basées sur la stimulation des PBL par des CD autologues pulsées avec les LP ont ensuite révélé la capacité unique du LP modifié, par rapport au LP naturel, à induire l'expansion des CD8 dans une forte proportion des puits de culture, et une expansion durable de ces lymphocytes, comparée à l'expansion induite par le peptide court modifié. Nous avons de plus montré que ces expansions résultaient au moins en partie d'un cross-priming car le même effet a été observé avec des lymphocytes T naïfs. L'efficacité quasi nulle de cross-priming observée pour le LP naturel suggère donc que le priming dépend fortement d'une liaison stable au HLA de l'épitope cross-présenté par les CD. L'analyse du potentiel cytotoxique et du phénotype de la population CD8⁺téramer⁺ générés par le priming par le LP modifié, révèle qu'en plus de leur capacité d'amplification prolongée (contrairement à ceux générés par le peptide court), les lymphocytes obtenus sont des CTL de type effecteur mémoire capables de reconnaître efficacement l'antigène naturel et d'être restimulés de manière optimale via leur forte expression de molécules de co-stimulation. Cette population possède donc les critères attendus d'une vaccination thérapeutique.

La stimulation d'une expansion beaucoup plus forte des T CD8 réactifs à l'épitope 26-35 par le LP modifié, comparé au LP naturel, a été retrouvée chez un patient. Des études antérieures ayant montré la présence de lymphocytes CD8 mémoires spécifiques de cet épitope 26-35 chez la majorité des patients HLA-A2 (Speiser et al., 2010). Les lymphocytes stimulés peuvent dans ce cas résulter d'un re-stimulation de ces lymphocytes mémoires. Il est possible cependant, mais nous ne l'avons pas étudié, que la présentation croisée ait induit le cross-priming de lymphocytes naïfs n'ayant pas été préalablement primés à partir de la tumeur. En effet, la présence d'un répertoire spécifique de Melan-A/A2 a été observée pour chaque patient par le marquage tetramer mais n'a été analysée qu'après stimulations par l'un ou l'autre des deux LP. De façon inattendue par rapport à la réponse systématiquement forte des PBL de donneurs sains au LP modifié, nous avons observé l'absence -ou quasi absence- de réponse des PBMC à la lignée tumorale pour l'un des patients contrairement à l'autre, et ce malgré la présence de lymphocytes marqués tetramer⁺. Ce résultat révèle sans doute l'existence parmi les patients cancéreux, de deux statuts immunitaires distincts, comme souligné récemment au ESCII-meeting de Sienne. La différence marquée de capacité d'induction, par le LP modifié, d'une réponse T CD8 parmi les PBMC de différents patients, pourrait donc

représenter un moyen aisé de déterminer le statut immunitaire des patients HLA-A2, qui semble constituer un facteur prédictif voire pronostique de réponse à l'immunothérapie.

Nous avons par ailleurs observé que la stimulation des PBMC de donneurs sains par les peptides long ou court modifiés est qualitativement différentes. Le peptide court induit une expansion rapide des CD8 dans une fraction importante des puits mais la fréquence de ces cellules diminue fortement après deux semaines, suggérant que les lymphocytes générés ont une durée de vie courte et/ou un potentiel prolifératif limité. Au contraire, le LP modifié induit une expansion retardée des CD8 dans un nombre comparable de puits et la fréquence des CD8 induits augmente dans la majorité des puits jusqu'à au moins 21 jours de culture.

Ces résultats peuvent être la manifestation *in vitro* de l'incapacité des peptides courts à induire un priming efficace des CD8 naïfs, lié à leur présentation sur les CMH de cellules non professionnelles de la présentation, comme postulé et en partie démontré par le groupe de Melief (Bijker et al., 2007; Melief and van der Burg, 2008) et par l'utilisation de vaccins peptidiques pour l'induction d'une tolérance (Campbell et al., 2009).

Suite à nos résultats avec le LP Melan-A modifié, et dans la perspective de développer un protocole de vaccination, il nous a semblé important de vérifier *in vivo* le potentiel immunogénique de ce LP modifié par rapport au LP naturel. Les résultats préliminaires obtenus chez un modèle de souris humanisée tendent à confirmer l'immunogénicité supérieure du LP modifié par rapport à son homologue naturel. Cependant les fractions des lymphocytes spécifiques de l'épitope Melan-A 26-35 mesurées par ELISPOT sont faibles dans ces expériences. Ceci pourrait s'expliquer par une présentation croisée moindre de l'épitope humain par les CD de souris, ou par moindre fréquence du répertoire spécifique du complexe Melan-A 26-35 HLA-A2 chez ces souris, comparé à l'homme.

Nous avons également observé chez certains donneurs, que la présence de lymphocytes T CD4 avait une influence positive très nette sur l'amplification des populations CD8 spécifiques et sur leur phénotype, après stimulation par le long peptide modifié. En effet, la forte expression favorisée après 14 jours de culture en présence des CD4, de la molécule de co-stimulation CD28 sur les CD8 spécifiques, va dans le sens de l'établissement d'un phénotype mémoire et d'une capacité prolongée de stimulation de cette population. Le help CD4 spécifique d'antigènes étant un élément important voire essentiel pour la génération d'une réponse T cytotoxique mémoire, nous avons voulu déterminer si le LP modifié est capable de générer des lymphocytes T CD4 spécifiques de Melan-A. Bien que le LP naturel présente des épitopes CD4 recouvrant la séquence 26-35 (Bioley et al., 2006), il n'était pas

certaines que ceux-ci soient conservés dans le LP modifié A27L. Nous avons mis en évidence la présence de lymphocytes CD4 spécifiques de peptides Melan-A naturels parmi les PBMC de la majorité des donneurs, de HLA de classe II indéterminés, après stimulation par le LP modifié. En l'état actuel, ces résultats suggèrent que la réponse des PBL CD8 de donneurs sains, toujours observée après stimulation par le LP modifié, est pour certains d'entre eux, optimisée en terme d'expansion ou de survie in vitro, en présence de T CD4 spécifiques. Cependant, nous n'avons pas établi si l'optimisation de la réponse CD8 par les CD4, observée avec certains patients, corrélait ou non avec le développement de ces CD4 spécifiques.

Pour répondre à cette question il sera important de rechercher si l'optimisation de l'expansion des CD8 par les CD4 dépend de contextes HLA de classe II particuliers, qui pourraient alors correspondre à des HLA restreignant la reconnaissance des épitopes CD4 contenus dans la séquence 16-40 modifiée. Néanmoins les réponses CD4 aux peptides Melan-A ayant été observées chez 5 patients parmi les 6 testés il ne semble pas y avoir une restriction très stricte de ces réponses. Ces résultats suggèrent donc, en l'état actuel, que le long peptide Melan-A modifié pourrait être utilisé chez tous les patients HLA-A2 dont la tumeur exprime l'antigène indépendamment de leur génotype HLA de classe II.

La fréquence des lymphocytes CD4 est toujours restée faible dans ces expériences. Ceci reflète sans doute, au moins en partie, le fait que l'expansion des CD4 dans les réponses immunitaires est généralement dix fois moindre que celle des CD8 (Surh and Sprent, 2010). Les causes de la difficulté que nous avons eue à conserver la réponse CD4 après amplification ou re-stimulation des puits stimulés n'ont pas été explorées. Il est possible que la forte expansion des CD8 ait limité celle des CD4 par un mécanisme de compétition pour l'utilisation de certaines cytokines ou que la présence permanente d'IL-2 dans les cultures ait induit une apoptose des CD4 en l'absence de cytokines de survie ou de différenciation des produites par les CD, (IL-1 IL-12 et IL-21 par exemple). Par ailleurs Melan-A étant un antigène du soi, il est possible que des lymphocytes T régulateurs aient été stimulés dans nos cultures et aient limité l'expansion des populations helper spécifiques. En effet, des Tregs spécifiques de Melan-A ont été décrites (Jandus et al., 2009). Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant de renouveler les expériences de stimulation en déplétant préalablement les PBMC des lymphocytes T régulateurs. Une troisième hypothèse serait que les conditions de re-stimulation par autoprésentation exogènes de peptides en présence d'IL-2, induisent l'apoptose des CD4 spécifiques, soit par cytotoxicité soit en activant une signalisation proapoptotique. Pour y remédier la re-stimulation pourrait se faire par des monocytes ou des CD chargées par long peptide. Malgré nos difficultés à conserver les T CD4 spécifiques de

Melan-A induits par le LP modifié, nous avons pu identifier une séquence naturelle reconnue par une population de ces lymphocytes. Le long peptide modifié est donc capable d'induire une réponse à cette séquence naturelle.

En conclusion de cette étude sur les LP Melan-A 16-40 naturel ou modifié, l'ensemble de nos résultats sont en faveur de l'utilisation du LP Melan-A 16-40_{A27L} comme composant d'un vaccin thérapeutique pour le traitement des patients HLA-A2.

De nombreuses questions restaient à poser sur les LP dérivés d'antigènes tumoraux et dans un second temps nous nous sommes intéressés aux mécanismes impliqués dans leur présentation croisée. D'après S. Burgdorf et C. Kurts (Burgdorf and Kurts, 2008) il semble qu'il y ait au moins trois types de voies de cross-présentation sur le CMH de classe I en plus des voies dépendantes du lysosome pour la classe II. La comparaison des voies de présentation croisée des protéines entières Melan-A et NY-ESO-1 a déjà été réalisée, montrant des voies différentes en fonction des protéines et d'un couplage ou non avec un adjuvant (Robson et al, 2010; Schnurr et al., 2005), laissant ainsi le doute sur les voies empruntées par des LP de ces antigènes. En utilisant des drogues inhibitrices et des longs peptides de Melan-A fluorescents, nous avons pu mettre en évidence que le phénomène actif de présentation croisée de ce LP dépendait effectivement d'une endocytose passant par des endosomes précoces et par les lysosomes. Nous avons observé que l'ajout de certains inhibiteurs des sous-unités chymotrypsines du protéasome augmentait les résultats de présentation croisée suggérant une voie délétaire qui ne serait pas la voie dominante. Il existerait donc plusieurs voies de présentation croisées parallèles au sein des cellules présentatrices d'antigènes spécialisée dans la présentation croisée comme les CD dérivées des monocytes. Les molécules de rétrotranslocation TAP pourraient être impliquées dans la coexistence de ces différentes voies mais nous n'avons pas mené d'expériences permettant de vérifier cette hypothèse. Une ou plusieurs voies permettraient ainsi de générer efficacement l'épitope-A2, mais si nous n'avons pu la déterminer avec précision, nous avons réduit les hypothèses sur les enzymes impliquées. La génération de l'épitope-A2 à partir du long peptide ne semble pas dépendre du protéasome, contrairement à la protéine entière (Rimoldi et al, 2001), ni des protéases acides ou à sérine/cystéine. Les expériences menées avec les LP fluorescents ont mis en évidence une co-localisation dans les lysosomes, un autre lieu possible pour la génération de l'épitope, mais aussi le fait que la partie N-terminale du LP semble importante pour permettre soit la présentation croisée en elle-même soit la génération de l'épitope. L'absence de présentation croisée obtenue avec les peptides couplés sur les

histidines peut s'expliquer également par un encombrement stérique et/ou un changement de conformation du LP généré par les fluorochromes. La suite de cette étude de la présentation croisée menée également avec le LP NY-ESO 151-171K naturel ou modifié C165V fluorescent et des siRNA permettra de comparer les voies de présentation croisées avec le LP Melan-A, de déterminer les enzymes impliquées et d'entrevoir ainsi s'il existe une voie principale de présentation croisée des LP dans ce type de CD, ouvrant ainsi des perspectives pour l'optimisation des protocoles de chargement de CD pour l'immunothérapie.

Pour finir, nous avons voulu répondre à plusieurs questions importantes sur le potentiel immunogénique des LP :

- 1) Quelle est l'influence de la taille et de la séquence du LP Melan-A sur sa capacité à générer l'épitope CD8 par présentation croisée ainsi que sur sa capacité de priming ?
- 2) Une séquence de LP capable d'induire la présentation croisée de l'épitope qu'elle contient permet-elle la présentation croisée d'un épitope de substitution ?
- 3) La modification d'un résidu d'ancrage sur l'épitope pour l'optimisation de liaison au HLA permet-elle, pour des antigènes dont la fréquence du répertoire T spécifique est moindre que Melan-A, non seulement une meilleure présentation croisée à partir d'un LP, mais également un priming efficace par rapport à la séquence naturelle ?

Nous avons observé que la taille des LP ne semblait pas avoir d'influence sur leur capacité à induire la présentation croisée de l'épitope CD8. En revanche, nous avons remarqué avec les LP contenant l'épitope NA17A que la séquence la plus longue permettait une présentation croisée plus durable. Avec les LP Melan-A les conclusions sont encore plus frappantes puisque seule la séquence la plus longue (16-40_{A27L}) permet un priming durable. Toutefois, si les résultats ont été reproduits pour chacun des donneurs testés, les expériences n'ont été réalisées que sur un nombre limité de ceux-ci. On peut envisager, pour expliquer les résultats du 21-40_{A27L}, comparables à ceux obtenus jusqu'à présent avec le peptide court modifié, que ce LP soit dépourvu d'épitopes CD4, notamment sur la séquence 25-36 comme observé précédemment, capables d'induire une réponse spécifique et un help CD4.

Nous avons utilisé la séquence du 21-40 Melan-A, qui permettait une présentation croisée très efficace de l'épitope CD8, pour vérifier si le remplacement cet épitope par un autre (NA17A) permettait la présentation croisée de ce dernier. Les résultats obtenus ont confirmé cette hypothèse, suggérant ainsi la possibilité d'utiliser des LP de séquences synthétiques, optimisées pour la présentation croisée et dans lesquels les épitopes d'intérêt

seraient insérés. Ceci est donc intéressant dans le cas où tous les LP dérivés d'antigènes ne permettraient pas une présentation croisée systématique de leurs épitopes.

Les résultats très convaincants obtenus avec les LP Melan-A A27L par rapport à la séquence naturelle, montrent que l'optimisation de l'épitope est essentielle au priming et suggère donc l'importance d'utiliser de telles optimisations lorsqu'elles sont nécessaires et connues. Afin de vérifier la valeur générale de l'impact de la stabilité de l'épitope cross-présenté sur l'immunogénicité des LP, nous avons choisi de poser cette question pour un épitope de l'Ag NY-ESO-1 immunodominant chez les patients vaccinés (Jager et al., 2000). Les expériences menées avec des LP NY-ESO naturels et modifiés confirment l'impact de l'optimisation de l'épitope sur la qualité de la présentation croisée. En revanche, l'échec des expériences de priming montre qu'une présentation croisée durable par des CD ne suffit pas à induire un priming des CD8 détectable dans les conditions expérimentales choisies. De façon similaire la présentation croisée de l'épitope NA17A à partir du peptide Melan-A chimère n'a pas permis de détecter un priming. Ces résultats négatifs suggèrent qu'une trop faible fréquence de précurseurs naïfs spécifiques des épitopes CD8 ne permet pas d'induire dans nos conditions expérimentales et par une seule stimulation par présentation croisée, une amplification détectable de lymphocytes CD8 spécifiques de l'épitope. Il est toutefois envisageable de parvenir à obtenir des résultats concluants par des techniques plus sensibles mais moins spécifiques que la cytométrie comme l'ELISPOT. Pour évaluer concrètement si l'utilisation du LP NY-ESO contenant l'épitope optimisé est plus efficace que la séquence naturelle, et ainsi pouvoir extrapoler aux LP en général, seul le sang de patient qui serait enrichi en lymphocytes spécifiques de cet antigène, semble adéquat. C'est sur la base de ces observations et dans la suite logique de cette étude que devraient se focaliser les expériences futures sur cet antigène pour déterminer l'immunogénicité du LP NY-ESO 151-167 portant l'épitope optimisé C165V et démontrer l'intérêt des LP portant un épitope CD8 optimisé pour l'immunothérapie.

En conclusion, cette étude sur l'immunogénicité des LP dérivés d'antigènes tumoraux suggère l'intérêt d'utiliser des LP contenant des épitopes optimisés pour l'immunothérapie du fait de leur forte capacité de présentation croisée. Ceci est particulièrement vrai pour le LP Melan-A 16-40_{A27L}, pour le quel nous avons démontré sa capacité à induire un priming efficace et durable de CTL réactifs aux cellules de mélanome exprimant l'antigène Melan-A, à la fois chez donneurs sains et chez certains les patients, ainsi que sa capacité à induire des réponses CD4 spécifiques capables de générer un help bénéfique au priming CD8.

Bibliographie

(2006). CpG 7909: PF 3512676, PF-3512676. *Drugs R D* 7, 312-316.

———— A ————

- Abdel-Malek, Z.A., Kadekaro, A.L., and Swope, V.B. (2010). Stepping up melanocytes to the challenge of UV exposure. *Pigment Cell Melanoma Res* 23, 171-186.
- 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.
- Aguilera, R., Saffie, C., Tittarelli, A., Gonzalez, F.E., Ramirez, M., Reyes, D., Pereda, C., Hevia, D., Garcia, T., Salazar, L., *et al.* (2011). Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clin Cancer Res* 17, 2474-2483.
- Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 7, 834-846.
- Alanio, C., Lemaitre, F., Law, H.K., Hasan, M., and Albert, M.L. (2010). Enumeration of human antigen-specific naive CD8⁺ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood* 115, 3718-3725.
- Allavena, P., Chieppa, M., Bianchi, G., Solinas, G., Fabbri, M., Laskarin, G., and Mantovani, A. (2010). Engagement of the mannose receptor by tumoral mucins activates an immune suppressive phenotype in human tumor-associated macrophages. *Clin Dev Immunol* 2010, 547179.
- Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J., and Davis, M.M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-96.
- Arevalo-Herrera, M., Soto, L., Perlaza, B.L., Cespedes, N., Vera, O., Lenis, A.M., Bonelo, A., Corradin, G., and Herrera, S. (2011). Antibody-mediated and cellular immune responses induced in naive volunteers by vaccination with long synthetic peptides derived from the Plasmodium vivax circumsporozoite protein. *Am J Trop Med Hyg* 84, 35-42.
- Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, 669-692.
- Ayyoub, M., Zippelius, A., Pittet, M.J., Rimoldi, D., Valmori, D., Cerottini, J.C., Romero, P., Lejeune, F., Lienard, D., and Speiser, D.E. (2003). Activation of human melanoma reactive CD8⁺ T cells by vaccination with an immunogenic peptide analog derived from Melan-A/melanoma antigen recognized by T cells-1. *Clin Cancer Res* 9, 669-677.

———— B ————

- Bachem, A., Guttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., *et al.* (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *J Exp Med* 207, 1273-1281.
- Banchereau, J., Palucka, A.K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Taquet, N., Rolland, A., Taquet, S., Coquery, S., Wittkowski, K.M., Bhardwaj, N., *et al.* (2001). Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 61, 6451-6458.
- Ben-Sasson, S.Z., Caucheteux, S., Crank, M., Hu-Li, J., and Paul, W.E. (2011). IL-1 acts on T cells to enhance the magnitude of in vivo immune responses. *Cytokine* 56, 122-125.
- Ben-Sasson, S.Z., Hu-Li, J., Quiel, J., Cauchetaux, S., Ratner, M., Shapira, I., Dinarello, C.A., and Paul, W.E. (2009). IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7119-7124.

- 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. *J Exp Med* 186, 65-70.
- Berson, J.F., Harper, D.C., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M.S. (2001). Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Mol Biol Cell* 12, 3451-3464.
- Berson, J.F., Theos, A.C., Harper, D.C., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M.S. (2003). Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J Cell Biol* 161, 521-533.
- Besser, M.J., Shapira-Frommer, R., Treves, A.J., Zippel, D., Itzhaki, O., HersHKovitz, L., Levy, D., Kubi, A., Hovav, E., Chermoshniuk, N., *et al.* (2010). Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res* 16, 2646-2655.
- 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. *J Immunol* 179, 5033-5040.
- Bioley, G., Jandus, C., Tuyaerts, S., Rimoldi, D., Kwok, W.W., Speiser, D.E., Tiercy, J.M., Thielemans, K., Cerottini, J.C., and Romero, P. (2006). Melan-A/MART-1-specific CD4 T cells in melanoma patients: identification of new epitopes and ex vivo visualization of specific T cells by MHC class II tetramers. *J Immunol* 177, 6769-6779.
- Blachere, N.E., Morris, H.K., Braun, D., Saklani, H., Di Santo, J.P., Darnell, R.B., and Albert, M.L. (2006). IL-2 is required for the activation of memory CD8+ T cells via antigen cross-presentation. *J Immunol* 176, 7288-7300.
- Blanchet, J.S., Valmori, D., Dufau, I., Ayyoub, M., Nguyen, C., Guillaume, P., Monsarrat, B., Cerottini, J.C., Romero, P., and Gairin, J.E. (2001). A new generation of Melan-A/MART-1 peptides that fulfill both increased immunogenicity and high resistance to biodegradation: implication for molecular anti-melanoma immunotherapy. *J Immunol* 167, 5852-5861.
- Block, M.S., Suman, V.J., Nevala, W.K., Kottschade, L.A., Creagan, E.T., Kaur, J.S., Quevedo, J.F., McWilliams, R.R., and Markovic, S.N. (2011). Pilot study of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 as immune adjuvants for a melanoma peptide vaccine. *Melanoma Res* 21, 438-445.
- Bodinier, M., Peyrat, M.A., Tournay, C., Davodeau, F., Romagne, F., Bonneville, M., and Lang, F. (2000). Efficient detection and immunomagnetic sorting of specific T cells using multimers of MHC class I and peptide with reduced CD8 binding. *Nat Med* 6, 707-710.
- 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.
- Boon, T., and Van Pel, A. (1978). Teratocarcinoma cell variants rejected by syngeneic mice: protection of mice immunized with these variants against other variants and against the original malignant cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 1519-1523.
- Botton, T., Puissant, A., Cheli, Y., Tomic, T., Giuliano, S., Fajas, L., Deckert, M., Ortonne, J.P., Bertolotto, C., Tartare-Deckert, S., *et al.* (2011). Ciglitazone negatively regulates CXCL1 signaling through MITF to suppress melanoma growth. *Cell Death Differ* 18, 109-121.
- Brinckerhoff, L.H., Kalashnikov, V.V., Thompson, L.W., Yamshchikov, G.V., Pierce, R.A., Galavotti, H.S., Engelhard, V.H., and Slingluff, C.L., Jr. (1999). Terminal

- modifications inhibit proteolytic degradation of an immunogenic MART-1(27-35) peptide: implications for peptide vaccines. *Int J Cancer* 83, 326-334.
- Burgdorf, S., Kautz, A., Bohnert, V., Knolle, P.A., and Kurts, C. (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 316, 612-616.
- Burgdorf, S., and Kurts, C. (2008). Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 20, 89-95.
- Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1-27.
- Burnet, M. (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1, 779-786.

———— C ————

- Callahan, M.K., Wolchok, J.D., and Allison, J.P. (2010). Anti-CTLA-4 antibody therapy: immune monitoring during clinical development of a novel immunotherapy. *Semin Oncol* 37, 473-484.
- Campbell, J.D., Buckland, K.F., McMillan, S.J., Kearley, J., Oldfield, W.L., Stern, L.J., Gronlund, H., van Hage, M., Reynolds, C.J., Boyton, R.J., *et al.* (2009). Peptide immunotherapy in allergic asthma generates IL-10-dependent immunological tolerance associated with linked epitope suppression. *J Exp Med* 206, 1535-1547.
- Cebon, J., Jager, E., Shackleton, M.J., Gibbs, P., Davis, I.D., Hopkins, W., Gibbs, S., Chen, Q., Karbach, J., Jackson, H., *et al.* (2003). Two phase I studies of low dose recombinant human IL-12 with Melan-A and influenza peptides in subjects with advanced malignant melanoma. *Cancer Immun* 3, 7.
- Chen, J.L., Dunbar, P.R., Gileadi, U., Jager, E., Gnjjatic, S., Nagata, Y., Stockert, E., Panicali, D.L., Chen, Y.T., Knuth, A., *et al.* (2000). Identification of NY-ESO-1 peptide analogues capable of improved stimulation of tumor-reactive CTL. *J Immunol* 165, 948-955.
- Chen, J.L., Stewart-Jones, G., Bossi, G., Lissin, N.M., Wooldridge, L., Choi, E.M., Held, G., Dunbar, P.R., Esnouf, R.M., Sami, M., *et al.* (2005). Structural and kinetic basis for heightened immunogenicity of T cell vaccines. *J Exp Med* 201, 1243-1255.
- Chen, Y.T. (2000). Cancer vaccine: identification of human tumor antigens by SEREX. *Cancer J* 6 Suppl 3, S208-217.
- Chen, Y.T., Gure, A.O., Tsang, S., Stockert, E., Jager, E., Knuth, A., and Old, L.J. (1998). Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6919-6923.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1914-1918.
- Clarke, S.R. (2000). The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+ T cell immunity. *J Leukoc Biol* 67, 607-614.
- Contardi, E., Palmisano, G.L., Tazzari, P.L., Martelli, A.M., Fala, F., Fabbi, M., Kato, T., Lucarelli, E., Donati, D., Polito, L., *et al.* (2005). CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. *Int J Cancer* 117, 538-550.
- Cormier, J.N., Salgaller, M.L., Prevette, T., Barracchini, K.C., Rivoltini, L., Restifo, N.P., Rosenberg, S.A., and Marincola, F.M. (1997). Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan A. *Cancer J Sci Am* 3, 37-44.

- 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. *J Exp Med* 180, 35-42.
- Croft, M. (2003). Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 265-273.
- Curtsinger, J.M., and Mescher, M.F. (2010). Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* 22, 333-340.

———— D ————

- Dangoor, A., Lorigan, P., Keilholz, U., Schadendorf, D., Harris, A., Ottensmeier, C., Smyth, J., Hoffmann, K., Anderson, R., Cripps, M., *et al.* (2010). Clinical and immunological responses in metastatic melanoma patients vaccinated with a high-dose poly-epitope vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 59, 863-873.
- Dawicki, W., Bertram, E.M., Sharpe, A.H., and Watts, T.H. (2004). 4-1BB and OX40 act independently to facilitate robust CD8 and CD4 recall responses. *J Immunol* 173, 5944-5951.
- de Gast, G.C., Klumpen, H.J., Vyth-Dreese, F.A., Kersten, M.J., Verra, N.C., Sein, J., Batchelor, D., Nooijen, W.J., and Schornagel, J.H. (2000). Phase I trial of combined immunotherapy with subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor, low-dose interleukin 2, and interferon alpha in progressive metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 6, 1267-1272.
- De Maziere, A.M., Muehlethaler, K., van Donselaar, E., Salvi, S., Davoust, J., Cerottini, J.C., Levy, F., Slot, J.W., and Rimoldi, D. (2002). The melanocytic protein Melan-A/MART-1 has a subcellular localization distinct from typical melanosomal proteins. *Traffic* 3, 678-693.
- De Plaen, E., Lurquin, C., Lethe, B., van der Bruggen, P., Brichard, V., Renauld, J.C., Coulie, P., Van Pel, A., and Boon, T. (1997). Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods* 12, 125-142.
- de Vries, I.J., Castelli, C., Huygens, C., Jacobs, J.F., Stockis, J., Schuler-Thurner, B., Adema, G.J., Punt, C.J., Rivoltini, L., Schuler, G., *et al.* (2011). Frequency of circulating Tregs with demethylated FOXP3 intron 1 in melanoma patients receiving tumor vaccines and potentially Treg-depleting agents. *Clin Cancer Res* 17, 841-848.
- Demydenko, D., and Berest, I. (2009). Expression of galectin-1 in malignant tumors. *Exp Oncol* 31, 74-79.
- Derre, L., Ferber, M., Touvrey, C., Devedre, E., Zoete, V., Leimgruber, A., Romero, P., Michielin, O., Levy, F., and Speiser, D.E. (2007). A novel population of human melanoma-specific CD8 T cells recognizes Melan-AMART-1 immunodominant nonapeptide but not the corresponding decapeptide. *J Immunol* 179, 7635-7645.
- Derre, L., Rivals, J.P., Jandus, C., Pastor, S., Rimoldi, D., Romero, P., Michielin, O., Olive, D., and Speiser, D.E. (2010). BTLA mediates inhibition of human tumor-specific CD8+ T cells that can be partially reversed by vaccination. *J Clin Invest* 120, 157-167.
- Dessars, B., De Raeve, L.E., El Housni, H., Debouck, C.J., Sidon, P.J., Morandini, R., Roseeuw, D., Ghanem, G.E., Vassart, G., and Heimann, P. (2007). Chromosomal translocations as a mechanism of BRAF activation in two cases of large congenital melanocytic nevi. *J Invest Dermatol* 127, 1468-1470.
- Di Pucchio, T., Chatterjee, B., Smed-Sorensen, A., Clayton, S., Palazzo, A., Montes, M., Xue, Y., Mellman, I., Banchereau, J., and Connolly, J.E. (2008). Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat Immunol* 9, 551-557.

- Di Pucchio, T., Pilla, L., Capone, I., Ferrantini, M., Montefiore, E., Urbani, F., Patuzzo, R., Pennacchioli, E., Santinami, M., Cova, A., *et al.* (2006). Immunization of stage IV melanoma patients with Melan-A/MART-1 and gp100 peptides plus IFN- α results in the activation of specific CD8(+) T cells and monocyte/dendritic cell precursors. *Cancer Res* 66, 4943-4951.
- Diamond, M.S., Kinder, M., Matsushita, H., Mashayekhi, M., Dunn, G.P., Archambault, J.M., Lee, H., Arthur, C.D., White, J.M., Kalinke, U., *et al.* (2011). Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med* 208, 1989-2003.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78, 857-902.
- Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., *et al.* (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8, 793-800.
- Draube, A., Klein-Gonzalez, N., Mattheus, S., Brilliant, C., Hellmich, M., Engert, A., and von Bergwelt-Baildon, M. (2011). Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 6, e18801.
- 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 Immunol Immunother* 51, 539-546.
- Dudley, M.E., Gross, C.A., Langan, M.M., Garcia, M.R., Sherry, R.M., Yang, J.C., Phan, G.Q., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Citrin, D.E., *et al.* (2010). CD8+ enriched "young" tumor infiltrating lymphocytes can mediate regression of metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 16, 6122-6131.
- Dudley, M.E., and Rosenberg, S.A. (2003). Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 666-675.
- 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* 298, 850-854.
- Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Shelton, T.E., Even, J., and Rosenberg, S.A. (2003). Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother* 26, 332-342.
- Dudziak, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumpfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.W., Park, C.G., *et al.* (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315, 107-111.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991-998.
- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22, 329-360.
- Dustin, M.L., and Depoil, D. (2011). New insights into the T cell synapse from single molecule techniques. *Nat Rev Immunol* 11, 672-684.
- Dutoit, V., Guillaume, P., Romero, P., Cerottini, J.C., and Valmori, D. (2002). Functional analysis of HLA-A*0201/Melan-A peptide multimer+ CD8+ T cells isolated from an HLA-A*0201- donor: exploring tumor antigen allorestricted recognition. *Cancer Immun* 2, 7.
- Duval, L., Schmidt, H., Kaltoft, K., Fode, K., Jensen, J.J., Sorensen, S.M., Nishimura, M.I., and von der Maase, H. (2006). Adoptive transfer of allogeneic cytotoxic T

- lymphocytes equipped with a HLA-A2 restricted MART-1 T-cell receptor: a phase I trial in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 12, 1229-1236.
- Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165, 6037-6046.

———— E-F ————

- Elkord, E., Alcantar-Orozco, E.M., Dovedi, S.J., Tran, D.Q., Hawkins, R.E., and Gilham, D.E. (2010). T regulatory cells in cancer: recent advances and therapeutic potential. *Expert Opin Biol Ther* 10, 1573-1586.
- Faure, F., Mantegazza, A., Sadaka, C., Sedlik, C., Jotereau, F., and Amigorena, S. (2009). Long-lasting cross-presentation of tumor antigen in human DC. *Eur J Immunol* 39, 380-390.
- Fay, J.W., Palucka, A.K., Paczesny, S., Dhodapkar, M., Johnston, D.A., Burkeholder, S., Ueno, H., and Banchereau, J. (2006). Long-term outcomes in patients with metastatic melanoma vaccinated with melanoma peptide-pulsed CD34(+) progenitor-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 55, 1209-1218.
- 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. *J Immunol* 147, 4069-4073.
- Feau, S., Arens, R., Togher, S., and Schoenberger, S.P. (2011). Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8(+) memory T cells. *Nat Immunol* 12, 908-913.
- Fenouille, N., Puissant, A., Tichet, M., Zimniak, G., Abbe, P., Mallavialle, A., Rocchi, S., Ortonne, J.P., Deckert, M., Ballotti, R., *et al.* (2011). SPARC functions as an anti-stress factor by inactivating p53 through Akt-mediated MDM2 phosphorylation to promote melanoma cell survival. *Oncogene*.
- Fish-Stegall, A., Searcy, P., and Sipples, R. (2006). Clinical experience with anti-EGFR therapy. *Semin Oncol Nurs* 22, 10-19.
- Flies, D.B., and Chen, L. (2006). Modulation of immune response by B7 family molecules in tumor microenvironments. *Immunol Invest* 35, 395-418.
- Fourcade, J., Sun, Z., Benallaoua, M., Guillaume, P., Luescher, I.F., Sander, C., Kirkwood, J.M., Kuchroo, V., and Zarour, H.M. (2010). Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med* 207, 2175-2186.
- Fournier, P., Aigner, M., and Schirmacher, V. (2011). Targeting of IL-2 and GM-CSF immunocytokines to a tumor vaccine leads to increased anti-tumor activity. *Int J Oncol* 38, 1719-1729.
- Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and Gonzalez-Baron, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 30, 193-204.

———— G ————

- Gaffen, S.L., and Liu, K.D. (2004). Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* 28, 109-123.
- Gajewski, T.F., Fallarino, F., Ashikari, A., and Sherman, M. (2001). Immunization of HLA-A2+ melanoma patients with MAGE-3 or MelanA peptide-pulsed autologous peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin 12. *Clin Cancer Res* 7, 895s-901s.

- Gajewski, T.F., Fuertes, M., Spaapen, R., Zheng, Y., and Kline, J. (2011). Molecular profiling to identify relevant immune resistance mechanisms in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* 23, 286-292.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., *et al.* (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-1964.
- Garbe, C., Eigentler, T.K., Keilholz, U., Hauschild, A., and Kirkwood, J.M. (2011). Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist* 16, 5-24.
- Garbe, C., and Leiter, U. (2009). Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* 27, 3-9.
- Gatti, R.A., and Good, R.A. (1971). Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* 28, 89-98.
- Gattinoni, L., Powell, D.J., Jr., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol* 6, 383-393.
- Gervois, N., Guilloux, Y., Diez, E., and Jotereau, F. (1996). Suboptimal activation of melanoma infiltrating lymphocytes (TIL) due to low avidity of TCR/MHC-tumor peptide interactions. *J Exp Med* 183, 2403-2407.
- Gnjatic, S., Nishikawa, H., Jungbluth, A.A., Gure, A.O., Ritter, G., Jager, E., Knuth, A., Chen, Y.T., and Old, L.J. (2006). NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Adv Cancer Res* 95, 1-30.
- Godefroy, E., Manches, O., Dreno, B., Hochman, T., Rolnitzky, L., Labarriere, N., Guilloux, Y., Goldberg, J., Jotereau, F., and Bhardwaj, N. (2011). Matrix metalloproteinase-2 conditions human dendritic cells to prime inflammatory T(H)2 cells via an IL-12- and OX40L-dependent pathway. *Cancer Cell* 19, 333-346.
- Godet, Y., Desfrancois, J., Vignard, V., Schadendorf, D., Khammari, A., Dreno, B., Jotereau, F., and Labarriere, N. (2010). Frequent occurrence of high affinity T cells against MELOE-1 makes this antigen an attractive target for melanoma immunotherapy. *Eur J Immunol* 40, 1786-1794.
- 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. *J Exp Med* 205, 2673-2682.
- Goldenberg, D.M., and Sharkey, R.M. (2007). Novel radiolabeled antibody conjugates. *Oncogene* 26, 3734-3744.
- Graham, D.B., Stephenson, L.M., Lam, S.K., Brim, K., Lee, H.M., Bautista, J., Gilfillan, S., Akilesh, S., Fujikawa, K., and Swat, W. (2007). An ITAM-signaling pathway controls cross-presentation of particulate but not soluble antigens in dendritic cells. *J Exp Med* 204, 2889-2897.
- Granucci, F., Foti, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2005). Dendritic cell biology. *Adv Immunol* 88, 193-233.
- Greenberg, S., and Grinstein, S. (2002). Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14, 136-145.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23, 515-548.
- 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. *J Exp Med* 183, 1173-1183.

- Hamid, O., Solomon, J.C., Scotland, R., Garcia, M., Sian, S., Ye, W., Groshen, S.L., and Weber, J.S. (2007). Alum with interleukin-12 augments immunity to a melanoma peptide vaccine: correlation with time to relapse in patients with resected high-risk disease. *Clin Cancer Res* 13, 215-222.
- Hannani, D., Sistigu, A., Kepp, O., Galluzzi, L., Kroemer, G., and Zitvogel, L. (2011). Prerequisites for the antitumor vaccine-like effect of chemotherapy and radiotherapy. *Cancer J* 17, 351-358.
- Haynes, N.M., van der Most, R.G., Lake, R.A., and Smyth, M.J. (2008). Immunogenic anti-cancer chemotherapy as an emerging concept. *Curr Opin Immunol* 20, 545-557.
- Herrera, S., Fernandez, O.L., Vera, O., Cardenas, W., Ramirez, O., Palacios, R., Chen-Mok, M., Corradin, G., and Arevalo-Herrera, M. (2011). Phase I safety and immunogenicity trial of Plasmodium vivax CS derived long synthetic peptides adjuvanted with montanide ISA 720 or montanide ISA 51. *Am J Trop Med Hyg* 84, 12-20.
- Hersey, P., Menzies, S.W., Halliday, G.M., Nguyen, T., Farrelly, M.L., DeSilva, C., and Lett, M. (2004). Phase I/II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients with disseminated melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 53, 125-134.
- Hershkovitz, L., Schachter, J., Treves, A.J., and Besser, M.J. (2010). Focus on adoptive T cell transfer trials in melanoma. *Clin Dev Immunol* 2010, 260267.
- Hintzen, R.Q., Lens, S.M., Lammers, K., Kuiper, H., Beckmann, M.P., and van Lier, R.A. (1995). Engagement of CD27 with its ligand CD70 provides a second signal for T cell activation. *J Immunol* 154, 2612-2623.
- Hoashi, T., Watabe, H., Muller, J., Yamaguchi, Y., Vieira, W.D., and Hearing, V.J. (2005). MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *J Biol Chem* 280, 14006-14016.
- Hoeffel, G., Ripoche, A.C., Matheoud, D., Nascimbeni, M., Escriou, N., Lebon, P., Heshmati, F., Guillet, J.G., Gannage, M., Caillat-Zucman, S., *et al.* (2007). Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 27, 481-492.
- Horne, P.H., Koester, M.A., Jayashankar, K., Lunsford, K.E., Dziema, H.L., and Bumgardner, G.L. (2007). Disparate primary and secondary allospecific CD8+ T cell cytolytic effector function in the presence or absence of host CD4+ T cells. *J Immunol* 179, 80-88.
- Hugues, S., Boissonnas, A., Amigorena, S., and Fetler, L. (2006). The dynamics of dendritic cell-T cell interactions in priming and tolerance. *Curr Opin Immunol* 18, 491-495.
- Husby, G., Hoagland, P.M., Strickland, R.G., and Williams, R.C., Jr. (1976). Tissue T and B cell infiltration of primary and metastatic cancer. *J Clin Invest* 57, 1471-1482.

- Iero, M., Filipazzi, P., Castelli, C., Belli, F., Valdagni, R., Parmiani, G., Patuzzo, R., Santinami, M., and Rivoltini, L. (2009). Modified peptides in anti-cancer vaccines: are we eventually improving anti-tumour immunity? *Cancer Immunol Immunother* 58, 1159-1167.
- Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., and Nakachi, K. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356, 1795-1799.
- Ishii, N., Takahashi, T., Soroosh, P., and Sugamura, K. (2010). OX40-OX40 ligand interaction in T-cell-mediated immunity and immunopathology. *Adv Immunol* 105, 63-98.

Izaguirre, A., Barnes, B.J., Amrute, S., Yeow, W.S., Megjugorac, N., Dai, J., Feng, D., Chung, E., Pitha, P.M., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (2003). Comparative analysis of IRF and IFN- α expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 74, 1125-1138.

———— J ————

- Jager, E., Hohn, H., Necker, A., Forster, R., Karbach, J., Freitag, K., Neukirch, C., Castelli, C., Salter, R.D., Knuth, A., *et al.* (2002). Peptide-specific CD8⁺ T-cell evolution in vivo: response to peptide vaccination with Melan-A/MART-1. *Int J Cancer* 98, 376-388.
- Jager, E., Jager, D., and Knuth, A. (2000). Peptide Vaccination in Clinical Oncology. *Onkologie* 23, 410-415.
- 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 Res* 69, 8085-8093.
- Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., *et al.* (2010). Human CD141⁺ (BDCA-3)⁺ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med* 207, 1247-1260.
- Jusforgues-Saklani, H., Uhl, M., Blachere, N., Lemaitre, F., Lantz, O., Bousso, P., Braun, D., Moon, J.J., and Albert, M.L. (2008). Antigen persistence is required for dendritic cell licensing and CD8⁺ T cell cross-priming. *J Immunol* 181, 3067-3076.

———— K ————

- Kahler, K.C., and Hauschild, A. (2011). Treatment and side effect management of CTLA-4 antibody therapy in metastatic melanoma. *J Dtsch Dermatol Ges* 9, 277-286.
- Kaiko, G.E., Horvat, J.C., Beagley, K.W., and Hansbro, P.M. (2008). Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123, 326-338.
- Kaizuka, Y., Douglass, A.D., Vardhana, S., Dustin, M.L., and Vale, R.D. (2009). The coreceptor CD2 uses plasma membrane microdomains to transduce signals in T cells. *J Cell Biol* 185, 521-534.
- Kast, W.M., Roux, L., Curren, J., Blom, H.J., Voordouw, A.C., Melen, R.H., Kolakofsky, D., and Melief, C.J. (1991). Protection against lethal Sendai virus infection by in vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2283-2287.
- Katz, J.B., Muller, A.J., and Prendergast, G.C. (2008). Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol Rev* 222, 206-221.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C.H., Robbins, P.F., Rivoltini, L., Topalian, S.L., Miki, T., and Rosenberg, S.A. (1994a). Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3515-3519.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Sakaguchi, K., Robbins, P.F., Rivoltini, L., Yannelli, J.R., Appella, E., and Rosenberg, S.A. (1994b). Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 180, 347-352.
- Kennedy, R., and Celis, E. (2008). Multiple roles for CD4⁺ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev* 222, 129-144.
- Kenter, G.G., Welters, M.J., Valentijn, A.R., Lowik, M.J., Berends-van der Meer, D.M., Vloon, A.P., Essahsah, F., Fathors, L.M., Offringa, R., Drijfhout, J.W., *et al.* (2009).

- Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 361, 1838-1847.
- Kepp, O., Galluzzi, L., Martins, I., Schlemmer, F., Adjemian, S., Michaud, M., Sukkurwala, A.Q., Menger, L., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2011). Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 30, 61-69.
- Kerr, M.C., and Teasdale, R.D. (2009). Defining macropinocytosis. *Traffic* 10, 364-371.
- 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. *J Invest Dermatol* 129, 2835-2842.
- Khan, S., Weterings, J.J., Britten, C.M., de Jong, A.R., Graafland, D., Melief, C.J., van der Burg, S.H., van der Marel, G., Overkleef, H.S., Filippov, D.V., *et al.* (2009). Chirality of TLR-2 ligand Pam3CysSK4 in fully synthetic peptide conjugates critically influences the induction of specific CD8+ T-cells. *Mol Immunol* 46, 1084-1091.
- Kim, C., and Williams, M.A. (2010). Nature and nurture: T-cell receptor-dependent and T-cell receptor-independent differentiation cues in the selection of the memory T-cell pool. *Immunology* 131, 310-317.
- Kitamura, H., Sedlik, C., Jacquet, A., Zaragoza, B., Dusseaux, M., Premel, V., Sastre-Garau, X., and Lantz, O. (2010). Long peptide vaccination can lead to lethality through CD4+ T cell-mediated cytokine storm. *J Immunol* 185, 892-901.
- Ko, J.M., Velez, N.F., and Tsao, H. (2010). Pathways to melanoma. *Semin Cutan Med Surg* 29, 210-217.
- Koch, U., and Radtke, F. (2011). Mechanisms of T cell development and transformation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 539-562.
- Koo, G.C., Hasan, A., and O'Reilly, R.J. (2009). Use of humanized severe combined immunodeficient mice for human vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 8, 113-120.
- Kotturi, M.F., Scott, I., Wolfe, T., Peters, B., Sidney, J., Cheroutre, H., von Herrath, M.G., Buchmeier, M.J., Grey, H., and Sette, A. (2008). Naive precursor frequencies and MHC binding rather than the degree of epitope diversity shape CD8+ T cell immunodominance. *J Immunol* 181, 2124-2133.
- Kreiter, S., Diken, M., Selmi, A., Diekmann, J., Attig, S., Husemann, Y., Koslowski, M., Huber, C., Tureci, O., and Sahin, U. (2011). FLT3 Ligand Enhances the Cancer Therapeutic Potency of Naked RNA Vaccines. *Cancer Res* 71, 6132-6142.
- Kumagai, K., Takeda, K., Hashimoto, W., Seki, S., Ogasawara, K., Anzai, R., Takahashi, M., Sato, M., and Rikiishi, H. (1997). Interleukin-12 as an inducer of cytotoxic effectors in anti-tumor immunity. *Int Rev Immunol* 14, 229-256.
- Kumamoto, Y., Mattei, L.M., Sellers, S., Payne, G.W., and Iwasaki, A. (2011). CD4+ T cells support cytotoxic T lymphocyte priming by controlling lymph node input. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 8749-8754.
- Kurts, C., Robinson, B.W., and Knolle, P.A. (2010). Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol* 10, 403-414.
- Kushimoto, T., Basrur, V., Valencia, J., Matsunaga, J., Vieira, W.D., Ferrans, V.J., Muller, J., Appella, E., and Hearing, V.J. (2001). A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10698-10703.
- Kushwah, R., and Hu, J. (2011). Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology* 133, 409-419.

- Labarriere, N., Bretaudeau, L., Gervois, N., Bodinier, M., Bougras, G., Diez, E., Lang, F., Gregoire, M., and Jotereau, F. (2002a). Apoptotic body-loaded dendritic cells efficiently cross-prime cytotoxic T lymphocytes specific for NA17-A antigen but not for Melan-A/MART-1 antigen. *Int J Cancer* 101, 280-286.
- Labarriere, N., Pandolfino, M.C., Gervois, N., Khammari, A., Tessier, M.H., Dreno, B., and Jotereau, F. (2002b). Therapeutic efficacy of melanoma-reactive TIL injected in stage III melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 51, 532-538.
- Labarriere, N., Pandolfino, M.C., Raingeard, D., Le Guiner, S., Diez, E., Le Drean, E., Dreno, B., and Jotereau, F. (1998). Frequency and relative fraction of tumor antigen-specific T cells among lymphocytes from melanoma-invaded lymph nodes. *Int J Cancer* 78, 209-215.
- Larribere, L., Khaled, M., Tartare-Deckert, S., Busca, R., Luciano, F., Bille, K., Valony, G., Eychene, A., Auburger, P., Ortonne, J.P., *et al.* (2004). PI3K mediates protection against TRAIL-induced apoptosis in primary human melanocytes. *Cell Death Differ* 11, 1084-1091.
- Le Guiner, S., Le Drean, E., Labarriere, N., Fonteneau, J.F., Viret, C., Diez, E., and Jotereau, F. (1998). LFA-3 co-stimulates cytokine secretion by cytotoxic T lymphocytes by providing a TCR-independent activation signal. *Eur J Immunol* 28, 1322-1331.
- Leon, B., Lopez-Bravo, M., and Ardavin, C. (2007). Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity* 26, 519-531.
- Levy, F., Muehlethaler, K., Salvi, S., Peitrequin, A.L., Lindholm, C.K., Cerottini, J.C., and Rimoldi, D. (2005). Ubiquitylation of a melanosomal protein by HECT-E3 ligases serves as sorting signal for lysosomal degradation. *Mol Biol Cell* 16, 1777-1787.
- Lienard, D., Rimoldi, D., Marchand, M., Dietrich, P.Y., van Baren, N., Geldhof, C., Batard, P., Guillaume, P., Ayyoub, M., Pittet, M.J., *et al.* (2004). Ex vivo detectable activation of Melan-A-specific T cells correlating with inflammatory skin reactions in melanoma patients vaccinated with peptides in IFA. *Cancer Immun* 4, 4.
- Liu, F.T., and Rabinovich, G.A. (2005). Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5, 29-41.
- Lode, H.N., Xiang, R., Becker, J.C., Gillies, S.D., and Reisfeld, R.A. (1998). Immunocytokines: a promising approach to cancer immunotherapy. *Pharmacol Ther* 80, 277-292.
- Loftus, D.J., Castelli, C., Clay, T.M., Squarcina, P., Marincola, F.M., Nishimura, M.I., Parmiani, G., Appella, E., and Rivoltini, L. (1996). Identification of epitope mimics recognized by CTL reactive to the melanoma/melanocyte-derived peptide MART-1(27-35). *J Exp Med* 184, 647-657.
- Loftus, D.J., Squarcina, P., Nielsen, M.B., Geisler, C., Castelli, C., Odum, N., Appella, E., Parmiani, G., and Rivoltini, L. (1998). Peptides derived from self-proteins as partial agonists and antagonists of human CD8+ T-cell clones reactive to melanoma/melanocyte epitope MART1(27-35). *Cancer Res* 58, 2433-2439.
- Ly, L.V., Sluijter, M., Versluis, M., Luyten, G.P., van Stipdonk, M.J., van der Burg, S.H., Melief, C.J., Jager, M.J., and van Hall, T. (2010). Peptide vaccination after T-cell transfer causes massive clonal expansion, tumor eradication, and manageable cytokine storm. *Cancer Res* 70, 8339-8346.

- Massague, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* 134, 215-230.
- Meidenbauer, N., Marienhagen, J., Laumer, M., Vogl, S., Heymann, J., Andreesen, R., and Mackensen, A. (2003). Survival and tumor localization of adoptively transferred Melan-A-specific T cells in melanoma patients. *J Immunol* 170, 2161-2169.
- Melief, C.J. (2008). Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity* 29, 372-383.
- Melief, C.J., and Finn, O.J. (2011). Cancer immunology. *Curr Opin Immunol* 23, 234-236.
- Melief, C.J., and van der Burg, S.H. (2008). Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat Rev Cancer* 8, 351-360.
- Merzougui, N., Kratzer, R., Saveanu, L., and van Endert, P. (2011). A proteasome-dependent, TAP-independent pathway for cross-presentation of phagocytosed antigen. *EMBO Rep*.
- Miconnet, I., Koenig, S., Speiser, D., Krieg, A., Guillaume, P., Cerottini, J.C., and Romero, P. (2002). CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide. *J Immunol* 168, 1212-1218.
- Milenic, D.E., Wong, K.J., Baidoo, K.E., Nayak, T.K., Regino, C.A., Garmestani, K., and Brechbiel, M.W. (2010). Targeting HER2: a report on the in vitro and in vivo pre-clinical data supporting trastuzumab as a radioimmunoconjugate for clinical trials. *MAbs* 2, 550-564.
- Mitsui, J., Nishikawa, H., Muraoka, D., Wang, L., Noguchi, T., Sato, E., Kondo, S., Allison, J.P., Sakaguchi, S., Old, L.J., *et al.* (2010). Two distinct mechanisms of augmented antitumor activity by modulation of immunostimulatory/inhibitory signals. *Clin Cancer Res* 16, 2781-2791.
- Monu, N., and Trombetta, E.S. (2007). Cross-talk between the endocytic pathway and the endoplasmic reticulum in cross-presentation by MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 19, 66-72.
- Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Hughes, M.S., Yang, J.C., Sherry, R.M., Royal, R.E., Topalian, S.L., Kammula, U.S., Restifo, N.P., *et al.* (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314, 126-129.
- Mouries, J., Moron, G., Schlecht, G., Escriou, N., Dadaglio, G., and Leclerc, C. (2008). Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* 112, 3713-3722.

- Narbutt, J., Lesiak, A., Zak-Prelich, M., Wozniacka, A., Sysa-Jedrzejowska, A., Tybura, M., Robak, T., and Smolewski, P. (2004). The distribution of peripheral blood dendritic cells assayed by a new panel of anti-BDCA monoclonal antibodies in healthy representatives of the polish population. *Cell Mol Biol Lett* 9, 497-509.
- Nestle, F.O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., and Schadendorf, D. (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4, 328-332.
- Newberg, M.H., Smith, D.H., Haertel, S.B., Vining, D.R., Lacy, E., and Engelhard, V.H. (1996). Importance of MHC class I alpha2 and alpha3 domains in the recognition of self and non-self MHC molecules. *J Immunol* 156, 2473-2480.

———— O ————

- Ochi, T., Fujiwara, H., Okamoto, S., An, J., Nagai, K., Shirakata, T., Mineno, J., Kuzushima, K., Shiku, H., and Yasukawa, M. (2011). Novel adoptive T-cell immunotherapy using a WT1-specific TCR vector encoding silencers for endogenous TCRs shows marked antileukemia reactivity and safety. *Blood* 118, 1495-1503.
- Ohman Forslund, K., and Nordqvist, K. (2001). The melanoma antigen genes--any clues to their functions in normal tissues? *Exp Cell Res* 265, 185-194.
- Ostrand-Rosenberg, S. (2010). Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 59, 1593-1600.

———— P ————

- Padua, D., and Massague, J. (2009). Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res* 19, 89-102.
- Pak, B.J., Lee, J., Thai, B.L., Fuchs, S.Y., Shaked, Y., Ronai, Z., Kerbel, R.S., and Ben-David, Y. (2004). Radiation resistance of human melanoma analysed by retroviral insertional mutagenesis reveals a possible role for dopachrome tautomerase. *Oncogene* 23, 30-38.
- Palucka, A.K., Ueno, H., Connolly, J., Kerneis-Norvell, F., Blanck, J.P., Johnston, D.A., Fay, J., and Banchereau, J. (2006). Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity. *J Immunother* 29, 545-557.
- Palucka, K., and Banchereau, J. (1999). Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol* 19, 12-25.
- Park, T.S., Rosenberg, S.A., and Morgan, R.A. (2011). Treating cancer with genetically engineered T cells. *Trends Biotechnol* 29, 550-557.
- Peterson, A.C., Harlin, H., and Gajewski, T.F. (2003). Immunization with Melan-A peptide-pulsed peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin-12 induces clinical activity and T-cell responses in advanced melanoma. *J Clin Oncol* 21, 2342-2348.
- Poschke, I., Mougiakakos, D., and Kiessling, R. (2011). Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system. *Cancer Immunol Immunother* 60, 1161-1171.
- Poulin, L.F., Salio, M., Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Craciun, L., Chen, J.L., Keller, A.M., Joffre, O., Zelenay, S., Nye, E., *et al.* (2010). Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med* 207, 1261-1271.
- Powell, D.J., Jr., Dudley, M.E., Hogan, K.A., Wunderlich, J.R., and Rosenberg, S.A. (2006). Adoptive transfer of vaccine-induced peripheral blood mononuclear cells to patients with metastatic melanoma following lymphodepletion. *J Immunol* 177, 6527-6539.
- Prehn, R.T., and Main, J.M. (1957). Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 18, 769-778.

———— R ————

- Rabinovich, G.A., Gabrilovich, D., and Sotomayor, E.M. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 25, 267-296.
- Randolph, G.J., Jakubzick, C., and Qu, C. (2008). Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol* 20, 52-60.
- Raulet, D.H., and Guerra, N. (2009). Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nat Rev Immunol* 9, 568-580.
- Rech, A.J., and Vonderheide, R.H. (2009). Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci* 1174, 99-106.

- Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., van Veelen, P., Janssen, H., Calafat, J., Drijfhout, J.W., and Neefjes, J. (2003). Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* 18, 97-108.
- Renkvist, N., Castelli, C., Robbins, P.F., and Parmiani, G. (2001). A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* 50, 3-15.
- Rimoldi, D., Muehlethaler, K., Salvi, S., Valmori, D., Romero, P., Cerottini, J.C., and Levy, F. (2001). Subcellular localization of the melanoma-associated protein Melan-AMART-1 influences the processing of its HLA-A2-restricted epitope. *J Biol Chem* 276, 43189-43196.
- Robson, N.C., McAlpine, T., Knights, A.J., Schnurr, M., Shin, A., Chen, W., Maraskovsky, E., and Cebon, J. (2010). Processing and cross-presentation of individual HLA-A, -B, or -C epitopes from NY-ESO-1 or an HLA-A epitope for Melan-A differ according to the mode of antigen delivery. *Blood* 116, 218-225.
- Rocha, B., and Tanchot, C. (2004). Towards a cellular definition of CD8+ T-cell memory: the role of CD4+ T-cell help in CD8+ T-cell responses. *Curr Opin Immunol* 16, 259-263.
- Romani, N., Thurnher, M., Idoyaga, J., Steinman, R.M., and Flacher, V. (2010). Targeting of antigens to skin dendritic cells: possibilities to enhance vaccine efficacy. *Immunol Cell Biol* 88, 424-430.
- Romero, P., Cerottini, J.C., and Waanders, G.A. (1998a). Novel methods to monitor antigen-specific cytotoxic T-cell responses in cancer immunotherapy. *Mol Med Today* 4, 305-312.
- Romero, P., Dunbar, P.R., Valmori, D., Pittet, M., Ogg, G.S., Rimoldi, D., Chen, J.L., Lienard, D., Cerottini, J.C., and Cerundolo, V. (1998b). Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 188, 1641-1650.
- Romero, P., Dutoit, V., Rubio-Godoy, V., Lienard, D., Speiser, D., Guillaume, P., Servis, K., Rimoldi, D., Cerottini, J.C., and Valmori, D. (2001). CD8+ T-cell response to NY-ESO-1: relative antigenicity and in vitro immunogenicity of natural and analogue sequences. *Clin Cancer Res* 7, 766s-772s.
- Romero, P., Gervois, N., Schneider, J., Escobar, P., Valmori, D., Pannetier, C., Steinle, A., Wolfel, T., Lienard, D., Brichard, V., *et al.* (1997). Cytolytic T lymphocyte recognition of the immunodominant HLA-A*0201-restricted Melan-A/MART-1 antigenic peptide in melanoma. *J Immunol* 159, 2366-2374.
- 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. *Eur J Immunol* 40, 1973-1984.
- Rosenberg, S.A., and Dudley, M.E. (2004). Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2, 14639-14645.
- Rosenberg, S.A., and Dudley, M.E. (2009). Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol* 21, 233-240.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Schwartzentruber, D.J., Hwu, P., Marincola, F.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Dudley, M.E., Schwarz, S.L., Spiess, P.J., *et al.* (1998). Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4, 321-327.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Phan, G.Q., Citrin, D.E., Restifo, N.P., Robbins, P.F., Wunderlich, J.R., *et al.* (2011a). Durable complete

- responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 17, 4550-4557.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Phan, G.Q., Citrin, D.E., Restifo, N.P., Robbins, P.F., Wunderlich, J.R., *et al.* (2011b). Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T Cell Transfer Immunotherapy. *Clin Cancer Res*.
- Rudd, C.E., Taylor, A., and Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev* 229, 12-26.

———— S ————

- Sabatino, M., Stroncek, D.F., Klein, H., Marincola, F.M., and Wang, E. (2009). Stem cells in melanoma development. *Cancer Lett* 279, 119-125.
- Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., and Pfreundschuh, M. (1995). Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11810-11813.
- Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J.M., Blazar, B.R., Kuchroo, V.K., and Anderson, A.C. (2010). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* 207, 2187-2194.
- Sang, M., Wang, L., Ding, C., Zhou, X., Wang, B., Lian, Y., and Shan, B. (2011). Melanoma-associated antigen genes - an update. *Cancer Lett* 302, 85-90.
- Schadendorf, D., Ugurel, S., Schuler-Thurner, B., Nestle, F.O., Enk, A., Brocker, E.B., Grabbe, S., Rittgen, W., Edler, L., Sucker, A., *et al.* (2006). Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol* 17, 563-570.
- Schnurr, M., Chen, Q., Shin, A., Chen, W., Toy, T., Jenderek, C., Green, S., Miloradovic, L., Drane, D., Davis, I.D., *et al.* (2005). Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* 105, 2465-2472.
- 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.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565-1570.
- Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.
- Seiter, S., Monsurro, V., Nielsen, M.B., Wang, E., Provenzano, M., Wunderlich, J.R., Rosenberg, S.A., and Marincola, F.M. (2002). Frequency of MART-1/MelanA and gp100/PMel17-specific T cells in tumor metastases and cultured tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunother* 25, 252-263.
- 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.
- Sharpe, A.H., and Freeman, G.J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2, 116-126.
- Shen, L., and Rock, K.L. (2006). Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 18, 85-91.

- Sikora, A.G., Jaffarzad, N., Hailemichael, Y., Gelbard, A., Stonier, S.W., Schluns, K.S., Frasca, L., Lou, Y., Liu, C., Andersson, H.A., *et al.* (2009). IFN- α enhances peptide vaccine-induced CD8⁺ T cell numbers, effector function, and antitumor activity. *J Immunol* 182, 7398-7407.
- Smith, D.E. (2011). The biological paths of IL-1 family members IL-18 and IL-33. *J Leukoc Biol* 89, 383-392.
- Smith, I.J., Kurt, R.A., Baher, A.G., Denman, S., Justice, L., Doran, T., Gilbert, M., Alvord, W.G., and Urba, W.J. (2003). Immune effects of escalating doses of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor added to a fixed, low-dose, inpatient interleukin-2 regimen: a randomized phase I trial in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *J Immunother* 26, 130-138.
- Speiser, D.E., Baumgaertner, P., Voelter, V., Devere, E., Barbey, C., Rufer, N., and Romero, P. (2008). Unmodified self antigen triggers human CD8 T cells with stronger tumor reactivity than altered antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3849-3854.
- Speiser, D.E., Lienard, D., Rufer, N., Rubio-Godoy, V., Rimoldi, D., Lejeune, F., Krieg, A.M., Cerottini, J.C., and Romero, P. (2005). Rapid and strong human CD8⁺ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest* 115, 739-746.
- Speiser, D.E., Schwarz, K., Baumgaertner, P., Manolova, V., Devere, E., Sterry, W., Walden, P., Zippelius, A., Conzett, K.B., Senti, G., *et al.* (2010). Memory and effector CD8 T-cell responses after nanoparticle vaccination of melanoma patients. *J Immunother* 33, 848-858.
- Sprent, J., and Surh, C.D. (2011). Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat Immunol* 12, 478-484.
- Starck, L., Scholz, C., Dorken, B., and Daniel, P.T. (2005). Costimulation by CD137/4-1BB inhibits T cell apoptosis and induces Bcl-xL and c-FLIP(short) via phosphatidylinositol 3-kinase and AKT/protein kinase B. *Eur J Immunol* 35, 1257-1266.
- Surh, C.D., and Sprent, J. (2010). Glimpsing the real CD4⁺ T cell response. *Nat Immunol* 11, 47-49.

———— T ————

- Tacken, P.J., Zeelenberg, I.S., Cruz, L.J., van Hout-Kuijer, M.A., van de Glind, G., Fokkink, R.G., Lambeck, A.J., and Figdor, C.G. (2011). Targeted delivery of Toll-like receptor ligands to human and mouse dendritic cells strongly enhances adjuvanticity. *Blood*.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-820.
- Thomas, L. (1959). Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States. 529–532.
- Thurber, A.E., Douglas, G., Sturm, E.C., Zabierowski, S.E., Smit, D.J., Ramakrishnan, S.N., Hacker, E., Leonard, J.H., Herlyn, M., and Sturm, R.A. (2011). Inverse expression states of the BRN2 and MITF transcription factors in melanoma spheres and tumour xenografts regulate the NOTCH pathway. *Oncogene* 30, 3036-3048.
- 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 Res* 56, 4766-4772.
- Turtle, C.J., and Riddell, S.R. (2011). Genetically retargeting CD8⁺ lymphocyte subsets for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 23, 299-305.

- Underwood, J.C. (1974). Lymphoreticular infiltration in human tumours: prognostic and biological implications: a review. *Br J Cancer* 30, 538-548.
- Valmori, D., Dutoit, V., Ayyoub, M., Rimoldi, D., Guillaume, P., Lienard, D., Lejeune, F., Cerottini, J.C., Romero, P., and Speiser, D.E. (2003). Simultaneous CD8+ T cell responses to multiple tumor antigen epitopes in a multi-peptide melanoma vaccine. *Cancer Immun* 3, 15.
- Valmori, D., Dutoit, V., Lienard, D., Rimoldi, D., Pittet, M.J., Champagne, P., Ellefsen, K., Sahin, U., Speiser, D., Lejeune, F., *et al.* (2000). Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8+ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients. *Cancer Res* 60, 4499-4506.
- Valmori, D., Fonteneau, J.F., Lizana, C.M., Gervois, N., Lienard, D., Rimoldi, D., Jongeneel, V., Jotereau, F., Cerottini, J.C., and Romero, P. (1998). Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol* 160, 1750-1758.
- Valmori, D., Fonteneau, J.F., Valitutti, S., Gervois, N., Dunbar, R., Lienard, D., Rimoldi, D., Cerundolo, V., Jotereau, F., Cerottini, J.C., *et al.* (1999). Optimal activation of tumor-reactive T cells by selected antigenic peptide analogues. *Int Immunol* 11, 1971-1980.
- 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. *J Exp Med* 182, 689-698.
- 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* 254, 1643-1647.
- van der Burg, S.H., and Melief, C.J. (2011). Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies. *Curr Opin Immunol* 23, 252-257.
- Vasievich, E.A., and Huang, L. (2011). The suppressive tumor microenvironment: a challenge in cancer immunotherapy. *Mol Pharm* 8, 635-641.
- 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 Immunol Immunother* 60, 953-963.
- Verra, N., Jansen, R., Groenewegen, G., Mallo, H., Kersten, M.J., Bex, A., Vyth-Dreese, F.A., Sein, J., van de Kastele, W., Nooijen, W.J., *et al.* (2003). Immunotherapy with concurrent subcutaneous GM-CSF, low-dose IL-2 and IFN-alpha in patients with progressive metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 88, 1346-1351.
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 29, 235-271.
- Vignard, V., Lemerrier, 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. *J Immunol* 175, 4797-4805.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.
- Vousden, K.H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2, 594-604.
- Vultur, A., Villanueva, J., and Herlyn, M. (2011). Targeting BRAF in advanced melanoma: a first step toward manageable disease. *Clin Cancer Res* 17, 1658-1663.

Vyas, J.M., Van der Veen, A.G., and Ploegh, H.L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 8, 607-618.

———— W ————

Wang, Q.J., Hanada, K., Feldman, S.A., Zhao, Y., Inozume, T., and Yang, J.C. (2011). Development of a genetically-modified novel T-cell receptor for adoptive cell transfer against renal cell carcinoma. *J Immunol Methods* 366, 43-51.

Ward, R.L., Hawkins, N.J., and Smith, G.M. (1997). Unconjugated antibodies for cancer therapy: lessons from the clinic. *Cancer Treat Rev* 23, 305-319.

Weber, A., Wasiliew, P., and Kracht, M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal* 3, cml.

Welters, M.J., Kenter, G.G., de Vos van Steenwijk, P.J., Lowik, M.J., Berends-van der Meer, D.M., Essahsah, F., Stynenbosch, L.F., Vloon, A.P., Ramwadhoebe, T.H., Piersma, S.J., *et al.* (2010). Success or failure of vaccination for HPV16-positive vulvar lesions correlates with kinetics and phenotype of induced T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11895-11899.

Wen, T., Bukeczynski, J., and Watts, T.H. (2002). 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. *J Immunol* 168, 4897-4906.

Williams, A., Peh, C.A., and Elliott, T. (2002). The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens* 59, 3-17.

———— Y-Z ————

Yasumoto, K., Watabe, H., Valencia, J.C., Kushimoto, T., Kobayashi, T., Appella, E., and Hearing, V.J. (2004). Epitope mapping of the melanosomal matrix protein gp100 (PMEL17): rapid processing in the endoplasmic reticulum and glycosylation in the early Golgi compartment. *J Biol Chem* 279, 28330-28338.

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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16168-16173.

Yee, C., Thompson, J.A., Roche, P., Byrd, D.R., Lee, P.P., Piepkorn, M., Kenyon, K., Davis, M.M., Riddell, S.R., and Greenberg, P.D. (2000). Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J Exp Med* 192, 1637-1644.

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.

Yona, S., and Jung, S. (2010). Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol* 17, 53-59.

Zanoni, I., and Granucci, F. (2011). The regulatory role of dendritic cells in the induction and maintenance of T-cell tolerance. *Autoimmunity* 44, 23-32.

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. *J Immunol* 169, 350-358.

Zwirner, N.W., Fuertes, M.B., Girart, M.V., Domaica, C.I., and Rossi, L.E. (2007). Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine Growth Factor Rev* 18, 159-170.

RESUMÉ et MOTS CLÉS

Etude de l'immunogénicité de longs peptides d'antigènes de mélanomes humains *in vitro*, et *in vivo* chez des souris HLA-A2 transgéniques : implication en vaccinothérapie.

Résumé : Les échecs des vaccinations du mélanome utilisant des peptides épitopiques peuvent s'expliquer par leur incapacité à générer des réponses CD8 durables et CD4 efficaces, ou par la faible liaison au HLA de certains épitopes CD8, tels que les épitopes immunodominants des antigènes Melan-A et NY-ESO-1. Deux solutions, ont été proposées: 1/ l'utilisation de longs peptides (LP) incluant des épitopes CD4 et CD8, afin de restreindre la présentation des antigènes aux cellules présentatrices et permettre la coopération CD4/CD8, 2/ l'utilisation d'épitopes optimisés pour l'ancrage au HLA. Le potentiel immunogénique de LP d'antigènes de tumeurs humaines, n'ayant pas été étudié, nous avons choisi de poser cette question pour des LP Melan-A et NY-ESO-1 contenant l'épitope immunodominant, optimisé ou non pour la liaison au HLA-A2, et pour deux LP contenant l'épitope NA17A₁₋₁₀. Les résultats majeurs montrent que ces LP induisent tous une présentation croisée durable, restreinte aux cellules dendritiques myéloïdes ou à leurs précurseurs. Cependant, pour Melan-A, une telle présentation de l'épitope naturel est inefficace à induire une réponse CD8 alors que, de façon majeure, la présentation croisée de l'épitope optimisé à partir du LP modifié induit des réponses CD8 anti-tumorales fortes et durables parmi les PBL de donneurs sains et de patients. De plus, chez certains donneurs, cette réponse est amplifiée par les lymphocytes CD4 et le LP modifié induit une réponse CD4 spécifique du Melan-A naturel. Cette étude établit l'intérêt vaccinal unique du LP Melan-A modifié pour le traitement des mélanomes HLA-A2 et l'impact de l'affinité de liaison d'un épitope au HLA sur l'immunogénicité des LP.

Mots clés : Homme, lymphocytes T, cytotoxicité, longs peptides, présentation croisée, vaccination, immunité anti-tumorale, mélanome.

Study of the immunogenicity of human melanoma antigens derived long peptides, *in vitro* and *in vivo* in HLA-A2 transgenic mice: involvement in vaccinothérapie.

Abstract: The failure of melanoma vaccines consisting of epitopic peptides can be explained by their inability to generate long-term CD8- and effective CD4- responses, or by the low HLA binding affinity of some CD8 epitopes, such as the immunodominant epitopes of Melan-A and NY-ESO-1 antigens. Two solutions have been proposed: 1/ the use of long peptides (LP) encompassing CD8 and CD4 epitopes, to restrict antigen presentation to antigen presenting cells and allow CD4/CD8 cooperation, 2/ the use of tumor epitopes optimized for HLA binding. Since the immunogenic potential of human tumor antigen LP had not been studied, we choose to address this question, with regard to Melan-A and NY-ESO-1 LP containing an immunodominant epitope, optimized or not for HLA-binding, and two LP containing the NA 17A₁₋₁₀ epitope. The major results show that all these LP induced a long-term cross-presentation, restricted to myeloid dendritic cells and their precursors. Nonetheless, such a cross-presentation of the natural Melan-A epitope was ineffective to induce a CD8 response, whereas, importantly, the cross-presentation of the optimized epitope from the modified LP induced strong and long lasting expansions of anti-tumor C8 T cells, among the PBL from healthy donors and melanoma patients. In addition, for some donors, the response of CD8 T cells to the modified LP was increased by CD4 T cells, and CD4 T cells, specific for natural Melan-A peptides, were induced by the modified LP. This study establishes the strong vaccine potential of the modified Melan-A LP for the treatment of HLA-A2 melanoma patients and underscores the impact of the HLA binding affinity of CD8 epitopes on LP immunogenicity.

Key words: Human, cytotoxicity, T lymphocytes, long peptides, cross-presentation, vaccination, anti-tumor immunity, melanoma.