

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2012

N° 132

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE
MÉDICALE

(Spécialité Immunologie)

Conformément aux dispositions du décret 2003-76

du 23 Janvier 2003, tient lieu de

THÈSE

POUR LE

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

POLI Caroline

né(e) le 20/11/1984

Présentée et soutenue publiquement le 18 Septembre 2012

Génération de lignées lymphocytaires T CD4⁺ spécifiques de l'antigène tumoral NY-ESO-1 à partir du sang périphérique de donneurs sains par priming *in vitro* et utilisation de tétramères CMHII/peptide

Président : Monsieur le Professeur Régis JOSIEN

Directeur de thèse : Madame le Professeur Danila VALMORI et Madame le Docteur Maha AYYOUB

SOMMAIRE

TABLE DES FIGURES.....	4
LISTE DES ABBREVIATIONS	5
1 INTRODUCTION	8
1.1 LE TRANSFERT ADOPTIF CELLULAIRE : UNE IMMUNOTHERAPIE CIBLEE DEBUTANT IL Y A 30 ANS	9
1.1.1 L'IMMUNITE ANTI-TUMORALE	9
1.1.2. LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL	15
1.1.3. LE DEVELOPPEMENT DU TRANSFERT ADOPTIF CELLULAIRE DANS LE CADRE DU MELANOME ET DES TUMEURS VIRO-INDUITES	18
1.1.4. LES LIMITES DU TRANSFERT ADOPTIF CELLULAIRE DE TIL.....	22
1.2. PLUS RECEMMENT, LE TRANSFERT ADOPTIF CELLULAIRE DE LT CD4 ⁺	23
1.2.1. ROLE DES LT CD4 ⁺ DANS L'IMMUNITE ANTI-TUMORALE.....	23
1.2.2. TETRAMERE CMHII.....	27
2 OBJECTIF	33
3 MATERIEL ET METHODES	34
3.1. ISOLEMENT DES LT CD4 ⁺ DE DONNEURS SAINS	35
3.2. SELECTION DES PATIENTS DR52b+	36
3.3. MARQUAGE TETRAMERE <i>EX VIVO</i>	36
3.4. STIMULATION <i>IN VITRO</i> DES SOUS-POPULATIONS LT CD4 ⁺ TRIEES EN PRESENCE DU PEPTIDE IMMUNODOMINANT ESO119-143	36
3.5. DETECTION DES CELLULES SPECIFIQUES DE NY-ESO-1 DANS LES CULTURES DE LT CD4 ⁺ PAR MARQUAGE AVEC LES TETRAMERES	37
3.6. GENERATION DE LIGNEES LT SPECIFIQUES DU PEPTIDE ESO119-143	37

3.7.	TEST DE RECONNAISSANCE ANTIGENIQUE : TITRATION.....	37
3.8.	PROFIL CYTOKINIQUE DES LIGNEES LT CD4 ⁺ SPECIFIQUES DE DR52b/ESO119-143 .	38
3.9.	ALLOREACTIVITE DES LIGNEES LT CD4 ⁺ SPECIFIQUES DE DR52b/ESO119-143	38
3.10.	ANALYSES STATISTIQUES	38
4	RESULTATS	39
4.1	PRIMING <i>IN VITRO</i> DE LT CD4 ⁺ SPECIFIQUES D'ESO119-143 A PARTIR DE CELLULES NAIVES CONVENTIONNELLES DE DONNEURS SAINS ET DETECTION PAR LES TETRAMERES DR52b/ESO119-143.....	40
4.2	ESTIMATION DE LA FREQUENCE DES PRECURSEURS SPECIFIQUES D'ESO119-143 RESTREINTS PAR DR52b PARMIS LES LT CD4 ⁺ NAIFS DES DONNEURS SAINS DR52b+	41
4.3	GENERATION <i>IN VITRO</i> DE LT CD4 ⁺ ESO/TETRAMERE+ A PARTIR DE LT CD4 ⁺ MEMOIRES CONVENTIONNELS CENTRAUX, MAIS PAS A PARTIR DE LT EFFECTEURS MEMOIRES, NI DE LT CD4 ⁺ REGULATEURS.....	43
4.4	EVALUATION FONCTIONNELLE DES LIGNEES LT CD4 ⁺ ESO/TETRAMERE ⁺ GENEREES PAR PRIMING <i>IN VITRO</i>	45
4.4.1	AVIDITE FONCTIONNELLE : TEST DE TITRATION	45
4.4.2	UTILISATION FREQUENTE DU Vβ2 PAR LES LT CD4 ⁺ ESO/TETRAMERE+ OBTENUS PAR PRIMING <i>IN VITRO</i>	47
4.4.3	SECRETION D'IL-2 ET DE CYTOKINES ASSOCIEES AU PROFIL FONCTIONNEL TH1 ..	48
4.4.4	LES LIGNEES T CD4 ⁺ ESO/TETRAMERE+ NE RECONNAISSENT PAS DE CELLULES DENDRITIQUES ALLOGENIQUES.....	50
5	DISCUSSION.....	51
	CONCLUSION.....	63
	BIBLIOGRAPHIE	64

TABLE DES FIGURES

Figure 1. "L'immunoediting" (ou revision immunologique) tumoral.....	10
Figure 2. Etapes clefs des mécanismes tolérogènes tumoraux lors d'une réaction immunitaire effectrice anti-tumorale.	15
Figure 3. Développement du transfert adoptif cellulaire chez l'animal	18
Figure 4. Développement du transfert adoptif cellulaire chez l'humain.....	19
Figure 5. Méthode des « leucines zipper ».	29
Figure 6. Méthode de sélection des molécules CMHII chargées en peptide grâce à la détection du groupement histidine.	30
Figure 7. Organisation de la région HLA de classe II.	32
Figure 8. Plan de séparation des différentes sous-populations de LT CD4 ⁺ par tri en cytométrie en flux.	35
Figure 9. Détection de LT CD4 ⁺ spécifiques d'ESO119-143 chez les donneurs sains.....	41
Figure 10. Quantification en <i>ex vivo</i> des L T CD4 ⁺ ESO/tétramère ⁺	42
Figure 11. Présence de précurseurs spécifiques de DR52b/ESO119-143, parmi les LT CD4 ⁺ mémoires conventionnels et centraux mémoires, mais absents au sein des populations effectrices conventionnelles et régulatrices (naïves et mémoires).....	44
Figure 12. Obtention de lignées de LT CD4 ⁺ spécifiques de l'épitope DR52b/ESO119-143 et caractérisation de leur avidité fonctionnelle.	46
Figure 13. Analyse de la fréquence des LT CD4 ⁺ Vβ2+ parmi les cellules ESO/tétramère ⁺	47
Figure 14. Profil cytokinique des lignées spécifiques d'ESO générées à partir de LT CD4 ⁺ conventionnels naïfs après priming <i>in vitro</i>	49
Figure 15. Evaluation de l'alloréactivité des lignées spécifiques d'ESO générées à partir de LT CD4 ⁺ conventionnels naïfs après priming <i>in vitro</i>	50

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

Ac : anticorps

AIRE : autoimmune regulator

CD : cellules dendritiques

CDR : Complementarity Determining Region (région déterminant la complémentarité)

CM : centrale mémoire

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CTA : Cancer Testis Antigen (antigène tumoral testiculaire)

CTL : lymphocyte T CD8⁺ cytotoxique

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMNS : Cellules Mononucléées du Sang Périphérique

DR52b/NY-ESO-1119-143 His-tag-PE : DR52b/ESO119-143

DS : Deviation Standard

EBV : Epstein Barr Virus

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (méthode immuno-enzymatique)

EM : effecteur mémoire

ESO : NY-ESO-1

ESO/tétramère⁺ : cellule tétramère DR52b/NY-ESO-1119-143 His-tag-PE⁺

FOXP3 : forkhead box P3

GvH : Greffon contre Hôte

GvL : Greffon versus Leucémie

HD : Healthy Donor (donneur sain)

His : Histidine

HLA : Human Leucocyte Antigen (antigène leucocytaire humain)

IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase

Ig : immunoglobuline

IMDM : Iscove's Modified Dulbecco's Media

LB : lymphocyte B

LDA : limited dilution analysis (culture en dilution limite)

LCR : liquide céphalo-rachidien

LPS : lipopolysaccharide

LT : lymphocyte T

LTreg : lymphocyte T régulateur (CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺)

MC : lymphocyte T conventionnel Mémoire Central

ME : lymphocyte T conventionnel Mémoire Effecteur

MoDC : cellules dendritiques dérivées des monocytes

Ni : Nickel

PAMP : Pathogen-associated molecular patterns (motifs moléculaires associés aux pathogènes)

PCR : Polymerase Chain Reaction

PE : Phycoérythrine

PHA : Phytohémagglutinine

PND : Paraneoplastic degenerative disorders (syndromes dégénératifs neurologiques paranéoplasiques)

PTLD : syndrome lymphoprolifératif post-transplantation

PRR : Pathogen Recognition Receptor (récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes : PAMP)

RAG : Recombination Activation Genes (gènes activant la recombinaison)

rESO : protéine recombinante NY-ESO-1

SEREX : Serological Analysis of Recombinant tumor cDNA Expression libraries (identification d'antigènes tumoraux spécifiques au moyen de la sélection de banques d'ADN avec des sérums)

SH : Sérum Humain

TH : T Helper (lymphocyte T CD4⁺ auxiliaire)

TCR : T-Cell Receptor (récepteur des lymphocytes T)

TIL : tumor-infiltrating lymphocytes (lymphocytes infiltrant la tumeur)

TLR : Toll-Like-Receptor

TRP-1 : tyrosinase related protein 1

TSLP : thymic stromal lymphopoietin

UICC-TNM : classification de l'union international contre le cancer des tumeurs selon trois critères qualifiant l'évolution de la maladie : T = taille de la tumeur primaire N = atteinte éventuelle des ganglions lymphatiques (« Nodes » en anglais) M = présence éventuelle de métastases

INTRODUCTION

1.1 LE TRANSFERT ADOPTIF CELLULAIRE : UNE IMMUNOTHERAPIE CIBLEE DEBUTANT IL Y A 30 ANS

1.1.1 L'IMMUNITE ANTI-TUMORALE

Le cancer constitue un problème de santé publique majeur, particulièrement dans les pays développés. Tandis que la mortalité par maladie infectieuse a diminué dans le monde occidental, permettant une augmentation de l'espérance de vie, le cancer est devenu en France la première cause de mortalité et le premier facteur de risque d'affectation de longue durée. Le cancer est ainsi responsable d'un tiers des décès masculins et d'un quart des décès féminins (données de l'INSEE extraites du rapport Evaluation plan Cancer 2009).

Le terme de cancer désigne spécifiquement une tumeur maligne c'est à dire des cellules ne répondant plus aux mécanismes normaux de contrôle de la croissance (tumeur), et envahissant les tissus sains. Ce caractère invasif ne se limite pas à un niveau local mais se caractérise également par le développement de métastases.

Dès lors, la guérison d'un cancer dépend de l'élimination de toutes les cellules malignes, tout en évitant que les effets du traitement ne soient délétères pour les cellules non tumorales du patient.

Un des champs de recherche à l'heure actuelle pour atteindre cet objectif est d'induire ou d'augmenter une réponse immunitaire antitumorale, qui différencierait les cellules malignes de leurs équivalents cellulaires normaux.

Historiquement, cette réponse immunitaire a d'abord été imaginée, selon différents modèles, dès le début du XXème siècle, bien avant les preuves expérimentales chez la souris puis chez l'homme. Dès 1909, Paul Ehrlich introduit le concept de « surveillance immune » selon lequel le système immunitaire est capable de contrôler le développement des tumeurs. Ce concept fut repris dans les années 1950 par F.M. Burnet et L. Thomas qui désignèrent par « surveillance immune » la capacité du système immunitaire à détecter les cellules tumorales et à les détruire.

Par la suite, ce modèle a été modifié par Schreiber et al. qui a proposé celui de « révision immunologique », également appelé modèles des « 3Es » (pour Elimination, Equilibre et Echappement) qui comprend trois phases (1) :

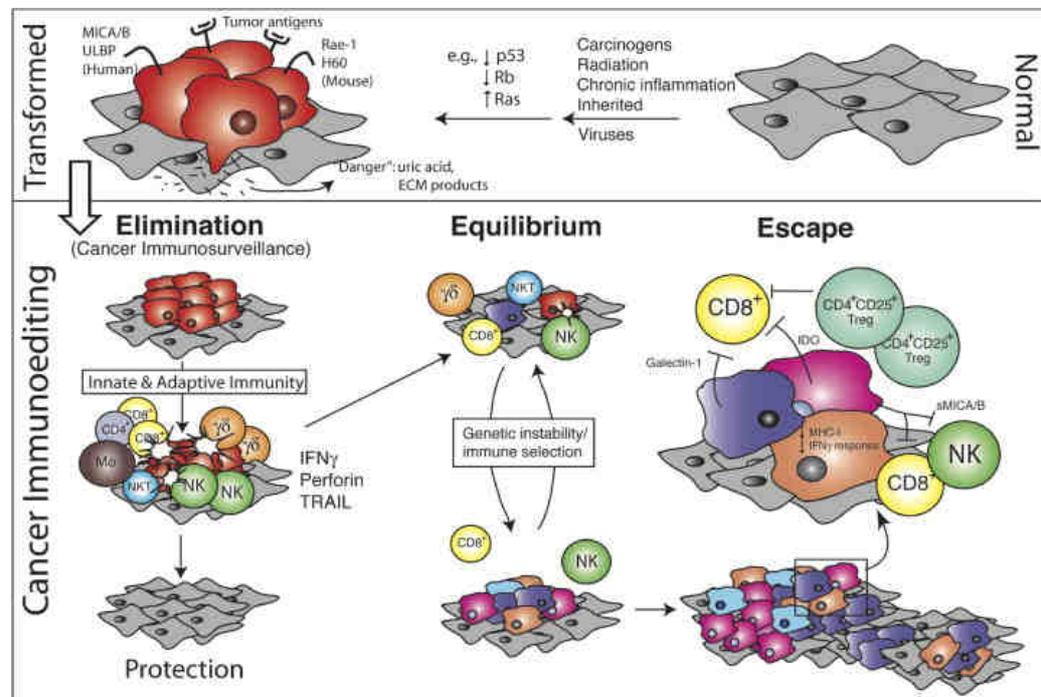


Figure 1. "L'immunoediting" (ou revision immunologique) tumoral

(Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. Immunity. 2004)

La première est la « **phase d'élimination** », correspondant à ce que l'on appelait la surveillance immune, au cours de laquelle le système immunitaire reconnaît et détruit les cellules tumorales. Cette surveillance semble être exercée aussi bien par le système immunitaire inné qu'adaptatif (2).

Vient ensuite une « **phase d'équilibre** », si la réussite de la phase d'élimination est incomplète, au cours de laquelle les cellules tumorales, qui accumulent de nombreuses mutations génétiques, s'adaptent à la pression sélective imposée par le système immunitaire. Ce processus est appelé « révision immunologique » car il détermine les propriétés des cellules tumorales survivantes.

La phase finale est la « **phase d'échappement** », correspondant à une rupture de l'équilibre en faveur du développement tumoral.

En l'absence de preuve expérimentale le concept d'immunité anti-tumorale fut largement débattu. Le développement de modèles animaux, notamment murins a permis d'apporter la preuve de cette réponse immunitaire anti-tumorale et d'identifier les cellules et les cytokines indispensables à cette réponse.

Différents modèles de souris immunodéficientes ont démontré une augmentation du risque de tumeurs spontanées : l'IFN- γ endogène protège l'hôte contre la croissance de tumeurs implantées, et contre la formation de tumeurs spontanées ou induites par un carcinogène chimique (MCA : 3' methylcholanthrène) (3). V. Shankaran et al. démontre que les souris RAG2 déficientes (qui ont une absence totale de cellules LT $\alpha\beta$, LT $\gamma\delta$, LB, NKT) présentent une fréquence accrue de sarcomes induits par l'injection sous cutanée de MCA, ainsi qu'une fréquence accrue de tumeurs épithéliales spontanées (adénocarcinomes digestifs), comparativement à des souris sauvages (4). Ce modèle tumoral de souris non immunodéprimées induit par MCA a également permis de montrer le rôle de l'immunité « en phase d'équilibre »: après administration d'une seule dose faible du carcinogène, la majorité des souris présentent une stabilité clinique. Puis, l'injection d'anticorps anti-lymphocyte B (LB), anti-lymphocyte T (LT), ou anti-IFN- γ permet d'objectiver le passage de la phase d'équilibre à celle d'échappement, lié à la levée du système immunitaire adaptatif dans ce modèle expérimental (60% des souris développent alors un sarcome après suppression de l'immunité adaptative) (5).

Chez l'humain, l'existence d'une réaction immunitaire antitumorale repose sur plusieurs observations. Tout d'abord, les tumeurs sont souvent infiltrées par des LT, des LB, des cellules NK et des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). L'infiltrat lymphocytaire intra-tumorale est corrélé à un meilleur pronostic ; cette observation a été vérifiée sur de larges cohortes de patients dans le cadre du mélanome primaire (6), du carcinome ovarien (7), du cancer colorectal (8) et du carcinome œsophagien (9). En analysant par analyse génomique (puce à ADN) et immuno-marquage les tumeurs coliques de patients, Galon et al. ont étudié la corrélation entre le type, la densité et la localisation des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs, et le pronostic des patients (10). Ils ont ainsi mis en évidence une corrélation positive entre la présence de marqueurs d'une polarisation TH1, de LT cytotoxiques (CTL), de LT mémoires et une faible incidence de récurrence tumorale. Le type, la densité et la localisation des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs coliques ont dans cette étude une valeur pronostique supérieure à la

classification UICC-TNM (Union Internationale contre le Cancer-tumor-nodes-metastasis).

Le développement spontané de réponses immunitaires dirigées contre des antigènes partagés par la tumeur et des tissus normaux aboutit à des syndromes paranéoplasiques. Les syndromes dégénératifs neurologiques paranéoplasiques (PND) se développent chez certains patients atteints de cancer du sein, du poumon ou de l'ovaire. Ils sont provoqués par une réponse immunitaire antitumorale, comme en atteste la présence dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de ces patients de forts titres d'anticorps (Ac) spécifiques d'antigènes neuronaux partagés par les cellules tumorales. Cette réaction immunitaire entraîne le développement d'une maladie neuro-dégénérative auto-immune (11).

Un autre argument démontrant la capacité du système immunitaire à reconnaître et rejeter les cellules tumorales est l'observation d'un effet greffe versus leucémie (GvL) lors du traitement d'hémopathies malignes par greffe de moelle osseuse allogénique. Cet effet correspond à l'élimination de cellules leucémiques de l'hôte par les cellules du système immunitaire d'un donneur sain de moelle osseuse allogénique. La première évidence directe d'un effet GVL chez l'homme a été rapportée par l'équipe de Kolb et al. : en 1990, la première rémission génétique de leucémie myéloïde chronique est obtenue par greffe allogénique de moelle osseuse chez 3 patients (12). Par la suite, des études ont montré que le transfert de lymphocytes de donneurs sains permettait une rémission complète de 70 à 80% de patients atteints de LMC en phase chronique, de 20 à 30% des patients à un stade d'acutisation leucémique (13). La déplétion *ex vivo* des lymphocytes des greffons médullaires, dans le but de diminuer l'incidence de la maladie du greffon contre l'hôte (GvH), a été associée à un risque accru de rechute leucémique.

Un autre exemple clinique, illustrant le contrôle tumoral par le système immunitaire chez l'homme, est la survenue d'un cancer chez les receveurs de transplantations d'organes, secondairement à la transmission conjointe des cellules tumorales du donneur. Une étude a signalé le développement d'un mélanome entre 1 et 2 ans après transplantation chez deux patients ayant reçu un rein du même donneur ; ce dernier avait développé un mélanome, traité avec succès 16 ans avant sa mort (14). Nous pouvons supposer que les cellules du mélanome, qui migrent facilement dans d'autres organes, étaient présentes dans les reins de ce patient, mais étaient en phase d'équilibre avec le système immunitaire. Le transfert de ces cellules tumorales chez un hôte immunodéprimé par les traitements antirejet accompagnant la transplantation a conduit à un échappement tumoral.

Ces observations ont été nuancées par la description initiale d'une prépondérance des tumeurs viro-induites chez les souris ainsi que chez les hommes immunodéprimés. L'analyse des registres du centre de transplantation de Cincinnati, sur une période de 29ans (1968-1998) a permis d'étudier sur une large cohorte de patients transplantés l'incidence de cancers, comparativement à la population générale. Cette analyse a conclu à l'augmentation de la fréquence de cancers viro-induits tels que le syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (PTLD), le sarcome de Kaposi, et les carcinomes génito-urinaire et ano-génitaux résultant respectivement des virus oncogènes Epstein-Barr virus (EBV), virus herpès humain 8 (HHV8) et virus papilloma humain (HPV) (15). Ces constatations épidémiologiques expliquent le débat jusqu'à récemment sur la capacité du système immunitaire à éliminer des tumeurs d'origine non virales. L'étude de ce même registre de Cincinnati a cependant également mis en évidence que le risque de développer un mélanome était deux fois important chez les patients transplantés que dans la population générale (16). De même, le risque de développer un sarcome non Kaposi est trois fois plus important chez les patients transplantés (17). En reprenant les cohortes de plusieurs centres de transplantation, il existe également un risque accru de développer d'autres tumeurs non viro-induites : tumeurs coliques, pulmonaires, de la vessie, du pancréas, du rein, mélanome, carcinome squameux et tumeurs endocrines chez les patients transplantés (18).

Une étape majeure dans l'étude de l'immunité anti-tumorale a été la mise en évidence des cibles antigéniques de cette réaction immunitaire antitumorale spontanée. En découvrant le premier antigène tumoral humain reconnu par des LT : MAGE-1, T Boon and al. a ouvert la voie à l'immunothérapie spécifique, ciblant les cellules tumorales (19). Cet antigène fut mis en évidence par technique d'approche génétique. Cette méthode a été introduite dans les années '80 à la suite du développement des techniques de biologie moléculaire. Elle est basée sur le criblage d'une banque d'ADNc (Acide désoxyribonucléique complémentaire) tumoraux (extraite d'une lignée tumorale) par un clone LT autologue capable de reconnaître la tumeur. Le clone peut être obtenu par culture *in vitro* en conditions limitantes, à partir des lymphocytes du site tumoral, ou des lymphocytes circulants de patients ayant développés une réaction immunitaire anti-tumorale spontanée. Cette méthodologie a permis la découverte de divers antigènes tumoraux.

Les antigènes tumoraux sont classiquement subdivisés en différentes catégories. **Les antigènes du groupe Cancer Testis (CTA)** se caractérisent par une expression limitée aux testicules (spermatogonies) et aux cellules tumorales. Ce groupe d'antigènes tumoraux regroupent notamment MAGE et NY-ESO-1 (ESO). **Les antigènes de différenciation** également appelés antigènes mélanocytaires regroupent par exemple melan-1 ou gp-100. **Les protéines du soi surexprimées par la tumeur** correspondent généralement à des protéines ayant une fonction proliférative telle que HER2, surexprimée dans une fraction de cancers du sein et de l'ovaire. **Les protéines mutées** correspondent à des proto-oncogènes ayant subi des mutations, tels que RAS, BRAF ou le gène suppresseur de tumeur p53. Enfin, **Les antigènes viraux** sont issus de virus oncogènes (EBV, les protéines E6 et E7 de HPV).

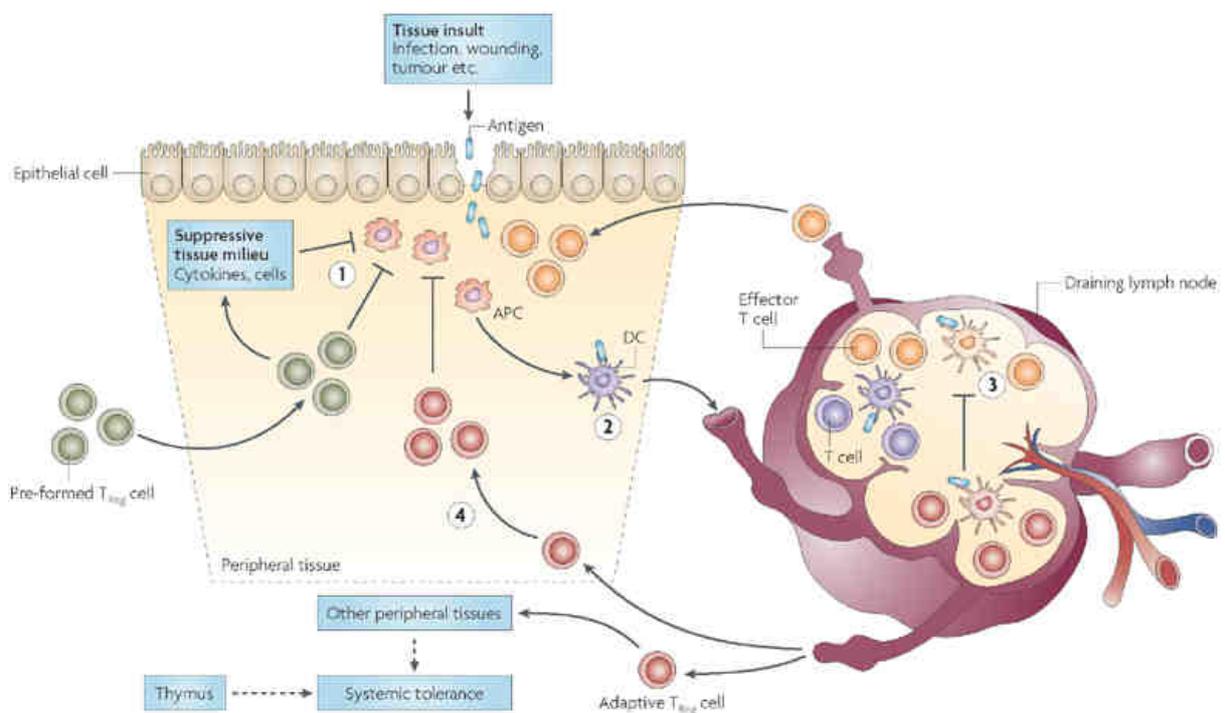
L'utilisation des antigènes tumoraux à des fins d'immunothérapie peut schématiquement se résumer à deux types de stratégies : une approche active représentée principalement par la vaccination et une approche passive basée sur le transfert adoptif de LT spécifiques.

Le plus souvent, le développement de réactions immunitaires spontanées chez les patients développant une tumeur maligne n'aboutit pas à l'élimination ni à la stabilisation du développement tumoral. Les cellules tumorales se développent au sein d'un microenvironnement capable d'exercer une inhibition de la réaction LT effectrice antitumorale via différents mécanismes.

1.1.2. LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL

Le microenvironnement tumoral inhibe la réponse immunitaire antitumorale en détournant les mécanismes régulateurs d'homéostasie. Ces mécanismes permettent physiologiquement d'assurer la contraction de la réponse immunitaire, ou encore la tolérance au soi ainsi qu'aux antigènes exogènes tels que les organismes commensaux et les allergènes.

Les mécanismes régulateurs de la réponse LT effectrice antitumorale peuvent se résumer chronologiquement en 4 étapes comme illustré dans la figure ci-dessous (20):



Nature Reviews | Immunology

Figure 2. Etapes clés des mécanismes tolérogènes tumoraux lors d'une réaction immunitaire effectrice anti-tumorale.

(Mellor AL, Munn DH. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. Nat. Rev. Immunol. 2008)

La première phase correspond à la détection du développement tumoral par les cellules du système immunitaire inné (**étape 1**): les lésions tissulaires induites par le développement tumoral entraînent la libération d'antigènes tumoraux et de signaux de dangers (PAMPs: structures moléculaires moléculaires invariants non exprimés par l'hôte) détectés par les cellules du système immunitaire inné exprimant des récepteurs de signaux de dangers (PRRs: Récepteur de connaissance des pathogènes), dont les récepteurs de type Toll (TLR). Cette destruction tissulaire s'accompagne d'une inflammation capable de stimuler des mécanismes de réparation tissulaire, dépendants notamment des macrophages. Parmi les cellules possédant des PRRs, les cellules dendritiques (CD) se distinguent par leur capacité à initier une réponse LT en permettant la différenciation de LT naïfs. Lorsqu'une tumeur se développe, la CD ingère par endocytose ou phagocytose des débris cellulaires provenant de la tumeur. Les débris cellulaires qu'elle internalise peuvent provenir de corps apoptotiques, de cellules en nécrose et même de cellules tumorales intactes. La CD dégrade ces débris cellulaires pour en faire des peptides antigéniques tumoraux qui vont être présentés à la surface cellulaire couplés aux molécules de CMH de classe I et de classe II. La détection de signaux de dangers assurant l'activation des CD est cependant à nuancer. En effet, un même ligand TLR peut entraîner une réponse effectrice ou au contraire une réponse tolérogène comme ceci a pu être documenté par exemple pour le TLR9 et son ligand, le motif CpG (ADN hypométhylé) (21).

Les cellules tumorales peuvent également être directement détectées et lysées par les cellules NK en l'absence d'expression de molécules de CMH de classe I.

L'activation de la CD entraîne sa migration vers les organes lymphoïdes secondaires ainsi que sa maturation (**étape 2**). Elle augmente la présentation des antigènes tumoraux à sa surface, réduit leur internalisation, et exprime à sa surface des molécules de costimulation. La CD présente alors efficacement les complexes CMH-peptides antigéniques tumoraux aux LT circulants, conjointement aux signaux de costimulation au sein de la synapse immunologique (**étape 3**).

Cependant, les CD immatures migrent également dans les ganglions de drainage où leur interaction avec les LT aboutit à une réponse tolérogène (22). De plus, les CD ont une plasticité fonctionnelle et peuvent également exercer un rôle immunosuppresseur actif (23). Au sein du microenvironnement tumoral, leur différenciation et leur maturation sont altérées via par le manque de molécules favorisant leur maturation (GM-CSF, IL-4, IL-12, IL-18,

IFN- γ), parallèlement à la sécrétion au sein du microenvironnement tumoral de molécules inhibant cette maturation (VEGF, IL-6, IL-10, TFG- β , IDO, PGE-2...), ainsi qu'une absence de signaux de danger. Ceci aboutit à l'émergence de CD pouvant être qualifiées de tolérogènes. Ces CD induisent une réponse tolérogène via l'expression de molécules telles que le PDL1 (programmed cell death 1 ligand, également appelé CD274) le PDL2, ou encore d'enzymes intracellulaires immunorégulatrices telles que l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO). Les molécules ligand du PD1 se lient au PD1 exprimés par les lymphocytes, inhibant ainsi la prolifération et la sécrétion cytokinique des LT. L'IDO consomme le tryptophane nécessaire aux LT et génère des kynurénines létales pour les LT. L'IDO et l'arginase favorisent le développement de LT CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ régulateurs (LTreg) en stimulant d'une part les LTreg préexistants, et en entraînant une anergie, une apoptose voire une différenciation en iTreg (Treg induit) des LT CD4⁺ conventionnels d'autre part (24). Les Treg FOXP3⁺ sont capables d'inhiber la réponse T effectrice en agissant sur les CD et les LT effecteurs par l'intermédiaire de sécrétion de cytokines telles que l'IL-10 et le TFG- β , ou encore par interaction cellulaire via CTLA-4 ou GITR (25).

L'étape 4 correspond à la migration des LT anti-tumoraux activés vers le microenvironnement tumoral, où elles sont inhibées par les cellules du stroma tumoral, exprimant le PDL1, PDL2, l'enzyme IDO. De plus l'expression de FAS-L à la surface des cellules stromales ou des cellules tumorales leur permet de détruire les cellules immunitaires exprimant FAS. Les cellules myéloïdes immunosuppressives, les macrophages associés aux tumeurs CD11b⁺, inhibent cette réponse par la synthèse d'IDO, d'arginase-1 (ARG1), de synthétase d'oxyde nitrique 2 (NOS2) et la sécrétion de glucocorticoïdes et de prostaglandines.

Des études effectuées sur les lymphocytes présents aux contacts des cellules tumorales (TIL : tumor infiltrating lymphocytes) suggèrent leurs défauts fonctionnels (faible prolifération, diminution de la production d'IFN- γ , faible activité lytique, défauts des voies de signalisation activatrices), ainsi que la présence de LTreg. Les LTreg sont caractérisés par l'expression constitutive de CD25, la chaîne α du récepteur à l'IL-2, ainsi qu'une forte expression du facteur de transcription forkhead box P3 (FOXP3). Découverts initialement pour leur rôle clef dans la tolérance périphérique, les LTreg sont entre autres capables d'inhiber l'activation, la différenciation et la prolifération des LT effecteurs, de diminuer leur sécrétion d'IFN- γ et d'IL2 ainsi que leur cytotoxicité. Leur détection au sein du microenvironnement tumoral (26) ainsi

que dans le sang périphérique des patients atteints de cancer (27) a pu être corrélée à un pronostic clinique défavorable (28) (29) (30).

Au cours du développement tumoral, un équilibre se crée entre la réponse effectrice anti-tumorale et les mécanismes de tolérance immunitaire de la tumeur. Le but de l'immunothérapie est de faire pencher cet équilibre en faveur de la réponse effectrice anti-tumorale. Le transfert adoptif cellulaire repose sur le principe d'une multiplication intensive *in vitro* des LT effecteurs reconnaissant la tumeur puis d'une réinjection aux patients. La génération des lignées lymphocytaires spécifiques d'antigènes antitumoraux à partir de lymphocytes extraits de donneurs sains permettrait la sélection de cellules effectrices n'ayant pas été soumises au microenvironnement tumoral tolérogène.

1.1.3. LE DEVELOPPEMENT DU TRANSFERT ADOPTIF CELLULAIRE DANS LE CADRE DU MELANOME ET DES TUMEURS VIRO-INDUITES

L'équipe de Rosenberg SA et al. a développé le transfert adoptif cellulaire chez l'animal puis chez l'homme (13).

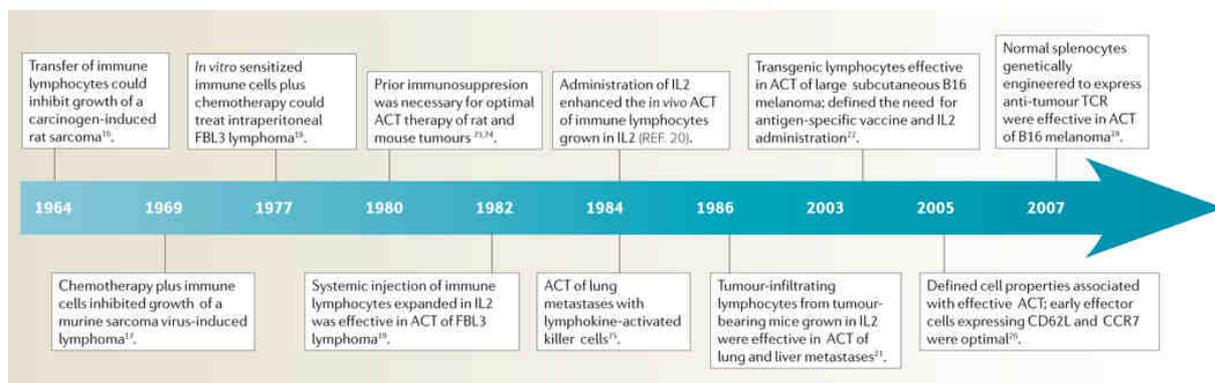


Figure 3. Développement du transfert adoptif cellulaire chez l'animal

(Rosenberg SA, Restifo NP, and al. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2008)

Dès la découverte dans les années '60 de cellules du système immunitaire capables d'entraîner un rejet tissulaire, des expériences de transfert adoptif cellulaire chez l'animal dans des modèles de cancers chimiquement induits ont débuté. A défaut de savoir amplifier des lymphocytes *ex vivo*, ces expériences reposaient alors sur l'immunisation d'un animal syngénique suivi du transfert des lymphocytes de ce dernier à l'hôte de la tumeur.

A partir des années '70, l'utilisation de l'IL2 a permis l'amplification de LT *ex vivo*. En 1986, le groupe de S.A. Rosenberg a été le premier à cultiver *in vitro* des TIL en présence d'IL-2 suivie de leur administration à des souris en complément d'une lymphodéplétion par cyclophosphamide ou par radiothérapie, entraînant la guérison d'adénocarcinomes du colon métastatiques (métastases hépatiques et pulmonaires) (31) : ceci a ouvert la voie à de nouvelles expériences utilisant des TIL au lieu d'immuniser des animaux syngéniques. Les TIL comportent différentes cellules dont les LT CD8⁺, les LT CD4⁺, et les TNK.

Plus récemment, des modèles de souris transgéniques (ex : récepteur de lymphocyte T (TCR) spécifiques de l'antigène tumoral gp100) ont été développés, permettant de tester différents paramètres tel que le conditionnement de l'hôte (lymphodéplétion), le profil de maturation et/ou cytokinique des cellules effectrices à transférer ou en encore l'association à d'autres biothérapies.

Chez l'humain le transfert adoptif cellulaire a débuté plus tardivement, basé principalement sur le modèle du mélanome métastatique.

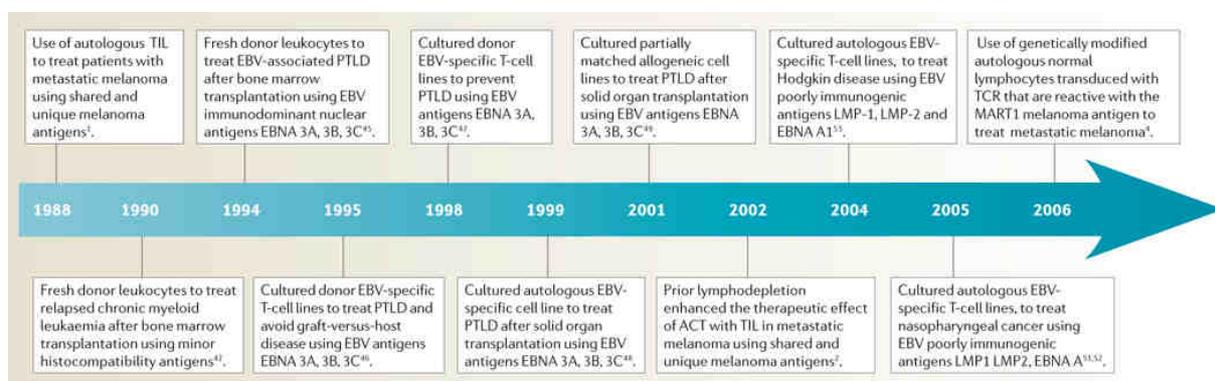


Figure 4. Développement du transfert adoptif cellulaire chez l'humain

(Rosenberg SA, Restifo NP, and al. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2008)

Les premiers essais chez l'humain reposaient sur les TIL extraits de mélanomes réinjectés après expansion *in vitro*, en association avec de fortes doses d'IL-2 (32). Ce n'est qu'à partir de 2002 qu'une régression tumorale chez plus de 50% des patients atteints de mélanomes métastatiques a été obtenue par transfert adoptif cellulaire (33), et ce grâce à un traitement lymphodéplétant permettant une expansion clonale ainsi qu'une persistance *in vivo* des lymphocytes spécifiques antitumoraux transférés. L'efficacité du traitement lymphodéplétant (34) a été attribuée à l'éviction des LTreg (35)

ainsi qu'à un phénomène plus globale de compétition entre les lymphocytes transférées et les autres populations cellulaires présentes avant le transfert envers les cytokines permettant l'expansion et la survie des lymphocytes (IL-7, IL-15) (36).

Parmi les cellules immunitaires composant les TIL, les LT CD8⁺ constituent le bras effecteur de la réponse adaptative antitumorale. En effet, le LT CD8⁺ possède, une fois activé, une activité cytotoxique et a pour fonction d'éliminer toutes les cellules exprimant le complexe CMHI-peptide dont il est spécifique. Les essais de transfert adoptif cellulaire se sont ainsi concentrés sur la génération de clones T CD8⁺ isolés à partir de TIL de patients atteints de mélanomes, sélectionnés sur leur reconnaissance antigénique (37). Ce type de stratégie est cependant limité par la nécessité d'une réaction immunitaire spontanée des patients, et l'exérèse de la tumeur.

Plus récemment les techniques de transfert génétique se sont développées, permettant ainsi de générer, à partir des LT CD8⁺ circulants des LT cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux (38). Les TCR de hautes affinités pour un antigène tumoral donné sont identifiés à partir des LT CD8⁺ extraits de patients ayant développés une réponse immunitaire spontanée ou de souris transgéniques immunisées contre l'antigène tumoral humain. Les gènes codant ce TCR sont insérés par l'intermédiaire de rétrovirus, dans le génome de n'importe quel LT CD8⁺ extrait du sang périphérique d'un patient. Morgan et al. ont ainsi traité 15 patients atteints de mélanome métastatique par des LT dont le TCR transgénique était spécifique de l'antigène tumoral Melan-A/MART-1. La régression des lésions métastatiques ganglionnaire axillaire, hépatique et du hile pulmonaire de deux patients, ainsi que la persistance des LT *in vivo* étaient encourageantes (39). Ce type de technique permet de choisir quelle cellule transférer, selon par exemple son stade de différenciation ou encore son profil fonctionnel. L'activité anti-tumorale de ces lymphocytes transgéniques ainsi générés est cependant restreinte à l'expression de l'antigène tumoral présenté par un allèle HLA donné à la surface des cellules cancéreuses.

La technique des CARs (Récepteur antigénique lymphocytaire chimérique) permet de générer des lymphocytes non restreints par l'expression d'un allèle HLA. Cette technique consiste à fusionner des chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines (partie externe du récepteur) aux domaines de signalisation de la chaîne CD3ζ du TCR ou à d'autres molécules de stimulation (partie intracellulaire du récepteur). Ces derniers restent limités par l'expression de l'antigène tumoral cible en surface.

Le transfert adoptif cellulaire est également utilisé chez l'homme, en pratique clinique, dans le cadre des cancers viro-induits. Les cellules transférées sont des LT allogéniques isolés à partir du sang périphérique de donneurs sains. La principale application concerne le syndrome lymphoprolifératif post transplantation (PTLD) secondaire à la réactivation d'EBV chez des patients traités par immunosuppresseurs. Environ 1% des patients bénéficiant d'un traitement par greffe de moelle osseuse allogénique et 20% des patients bénéficiant d'une transplantation d'organe solide développent ce syndrome. Les cellules transférées sont des lignées LT polyclonales (T CD4⁺ et T CD8⁺) générées à partir du sang périphérique du donneur de moelle osseuse allogénique (40). D'autres équipes ont opté pour la constitution de banques de lignées lymphocytaires T spécifiques d'EBV afin de pouvoir proposer ce traitement plus rapidement, et ce même en l'absence d'accès au donneur, comme dans le cas par exemple des donneurs cadavériques d'organes (41). La majorité de la population générale est immunisée vis-à-vis d'EBV. La génération de ces lignées lymphocytaires spécifiques d'EBV repose sur une stimulation antigénique des LT spécifiques assurant physiologiquement le contrôle de cette infection latente.

Historiquement, le transfert adoptif cellulaire repose sur l'amplification d'une réponse immunitaire anti-tumorale spontanée, à travers l'utilisation des TIL. L'isolement d'un faible nombre de cellules anti-tumorales avec les propriétés appropriées suffit ainsi à générer une large population de cellules effectrices, prête à induire un rejet tumoral. Enfin, il est possible de manipuler l'hôte en parallèle avant le transfert cellulaire afin d'optimiser l'environnement des cellules transférées pour une meilleure efficacité. Cependant, la génération d'un grand nombre de lymphocytes effecteurs ne suffit pas nécessairement à induire un rejet tumoral, d'où le développement ces dernières années de nouvelles stratégies d'ingénierie génétique afin d'optimiser l'efficacité des cellules effectrices transférées.

1.1.4. LES LIMITES DU TRANSFERT ADOPTIF CELLULAIRE DE TIL

Le transfert adoptif cellulaire reposant sur l'utilisation de TIL est limité par l'exérèse de la tumeur, la lourdeur technique et le coût par patient. De plus, les LT anti-tumoraux présentent des anomalies fonctionnelles résultant de leur interaction avec le microenvironnement tumoral. Enfin, les essais reposant exclusivement sur la sélection de LT CD8⁺ de haute affinité se sont révélés décevants en raison notamment d'une survie *in vivo* limitée des clones injectés (37).

Cette notion de survie a pu être approfondie grâce à la comparaison de la longueur des télomères des lymphocytes transférés en fonction de leur survie, ainsi que de leur efficacité *in vivo* (42). Des études basées sur des modèles animaux de transfert de lymphocytes, selon leur stade de maturation, ont permis d'approfondir la question. Dans un modèle de primate infecté à CMV, Berger et al. ont observé que seuls les LT CD8⁺ issus des populations cellulaires mémoires centrales persistent à long terme *in vivo* (43). Dans un modèle murin utilisant un TCR transgénique (pmel-1) spécifique d'un antigène tumoral (gp100) les cellules effectrices dérivées de cellules naïves ont une efficacité anti-tumorale *in vivo* supérieure (44). D'autres études ont montré que l'induction de la voie de signalisation Wnt- β caténine améliore les capacités proliférative et effectrice des cellules antitumorales (45) (46). Cette voie de signalisation est impliquée dans les propriétés d'auto-renouvellement et de multipotence des cellules souches, en régulant leur prolifération et leur différenciation.

L'ensemble de ces expériences mettent ainsi en évidence une meilleure survie des clones lymphocytaires n'ayant pas atteint un stade de différenciation terminale.

Chez l'humain, les études de transfert cellulaire de LT ont conclu à la supériorité des cellules dérivées de populations naïves, en corrélant cette efficacité clinique à une longueur de télomères supérieure, ainsi qu'à la conservation de l'expression de molécules costimulatrices tel que le CD27 (47).

Les propriétés de survie des lymphocytes transférés sont un élément clef dans le succès d'une immunothérapie par transfert adoptif cellulaire. Notre travail s'est donc concentré sur la génération de lignées lymphocytaires à partir de cellules naïves.

1.2. PLUS RECEMMENT, LE TRANSFERT ADOPTIF CELLULAIRE DE LT CD4⁺

1.2.1. ROLE DES LT CD4⁺ DANS L'IMMUNITE ANTI-TUMORALE

Les LT CD4⁺ reconnaissent des peptides exogènes présentés sur les molécules de CMHII des cellules présentatrices d'antigènes. Les LT CD4⁺, également appelés auxiliaires ou THelper (TH) ont un rôle primordial dans l'initiation et l'orchestration d'une réponse effectrice cytotoxique LT CD8⁺ ainsi que dans la génération d'anticorps de haute affinité (48). Les LT CD4⁺ stimulent le recrutement des LT CD8⁺ dans les organes lymphoïdes secondaires. Ils échangent des signaux d'activation et de costimulation avec les cellules dendritiques leur présentant des complexes CMHII/peptide, et permettent à ces dernières de stimuler efficacement les LT CD8⁺ (49). Les LT CD4⁺ coordonnent également le recrutement des cellules du système immunitaire inné et des cellules effectrices vers la cible antigénique. Les LT CD4⁺ sécrètent ainsi les cytokines et fournissent les signaux de costimulation nécessaires à la génération de LT CD8⁺ effecteurs cytotoxiques puis à leur migration (50).

L'étude des réactions immunitaires antivirales a mis en évidence, chez l'homme, le rôle clef des LT CD4⁺ dans la survie des LT CD8⁺, en particulier en cas d'infection virale chronique (51) (52). Les LT CD4⁺ sont capables, dans ce contexte, de restaurer la capacité de prolifération et les fonctions effectrices de LT CD8⁺ épuisés par de multiples stimulations (53). Les LT CD4⁺ sont également nécessaires au maintien de la mémoire immunitaire (54) (55), rôle central face au risque inhérent de rechute en pathologie tumorale. Les LT CD4⁺ assurent également la réactivation de LT CD8⁺ mémoires en effecteur cytotoxiques anti-tumoraux (56). Dans un modèle murin de LT CD8⁺ exprimant un TCR transgénique spécifique de l'antigène tumoral gp100, l'addition de LT CD4⁺ CD25^{low} (donc dépourvus en Treg) permet d'augmenter le rejet tumoral grâce, notamment, à la sécrétion d'IL-2 par les LT CD4⁺ (35).

Au-delà de ce rôle auxiliaire, les LT CD4⁺ ont un rôle effecteur dans la réaction immunitaire anti-tumorale (57).

Dès les premières études sur les LT CD4⁺ dans l'immunité anti-tumorale, les travaux de Fujiwara et al. et de Greenberg et al. démontrent, dans des modèles expérimentaux animaux, la capacité des LT CD4⁺ à protéger l'animal d'un développement tumoral après inoculation de cellules de tumeurs

hématopoïétiques ou de tumeur solide, et ce sans la participation des LT CD8⁺ (58) (59).

Dans un modèle tumoral murin bénéficiant d'un transfert adoptif de lignées lymphocytaire transgéniques soit LT CD4⁺ soit LT CD8⁺, les LT CD4⁺ ont montré une supériorité à rejeter la tumeur (60). D'autres études réalisées sur modèles murins ont démontré le pouvoir cytotoxique direct des LT CD4⁺ spécifique d'un antigène tumoral. Dans un modèle de mélanome murin, Quezada et al. ont ainsi mis en évidence que le transfert adoptif de LT CD4⁺ naïfs spécifiques de la tumeur chez une souris receveuse lymphodéplétée par irradiation prolifèrent, se différencient, infiltrent la tumeur et entraînent une régression des tumeurs déjà établies chez l'hôte (61). L'analyse du profil fonctionnel de ces populations T CD4⁺ après expansion *in vivo* chez l'hôte montre un profil cytokinique polyfonctionnel de type TH1, co-sécrétant de l'IL-2, du TNF- α et de l'IFN- γ . L'analyse génétique montre une synthèse accrue des protéines de lyse, suggérant ainsi un rôle cytotoxique direct des LT CD4⁺ spécifiques transférés dans le rejet tumoral (62).

Les études décrites ci-dessus reposent sur des modèles de mélanome, qui se distingue des autres tumeurs par une expression de molécules de CMHII. Le rôle effecteur des LT CD4⁺ serait possible même en l'absence d'expression de molécules de CMHII par les cellules tumorales. L'apprêtement des antigènes tumoraux sur les molécules de CMHII par les CPA permet de contourner l'absence d'expression de CMHII par les cellules tumorales : les LT CD4⁺ sont capables d'activer efficacement les cellules NK (60), d'induire et de maintenir une réponse effectrice T CD8⁺ (63). Les LT CD4⁺ assurent également une réponse effectrice directe via la sécrétion de cytokines effectrices telles que l'IFN- γ (64) (65).

Récemment, une étude réalisée par Hunder et al. a affirmé le potentiel thérapeutique des cellules T CD4⁺ chez l'humain (66). Un patient atteint de mélanome métastatique a bénéficié d'un transfert adoptif de LT CD4⁺ spécifiques d'ESO provenant du sang périphérique après leur expansion *in vitro*. Ce rapport démontre une persistance des cellules transférées en corrélation avec la durabilité de la réponse clinique. En outre, ce travail suggère que les cellules T CD4⁺, qui ciblent un antigène particulier, pourraient augmenter les réponses de cellules T spécifiques d'autres cibles associées aux tumeurs. Deux principales hypothèses peuvent être soulevées pour expliquer cette immunité croisée : un phénomène de dissémination de l'immunisation antigénique, déjà décrit en auto-immunité, ou une levée de l'immunosuppression du microenvironnement tumoral.

Comparativement aux LT CD8⁺, l'utilisation des LT CD4⁺ s'est heurtée à plusieurs difficultés. Le répertoire antigénique des LT CD4⁺ présente une grande diversité, de plus les molécules HLA classe II ont un polymorphisme élevé au sein de la population (67). Le nombre de modèles murins disponibles basés sur les LT CD4⁺ est moindre. De plus, l'absence d'outils permettant d'isoler avec précision les LT CD4⁺ en fonction de leur spécificité antigénique freine le développement d'immunothérapies basées sur les LT CD4⁺. Enfin, leurs conditions de culture est complexe du fait d'une grande plasticité fonctionnelle (68).

Différents sous types fonctionnels LT CD4⁺ ont été décrits (69). Les LT CD4⁺ ont initialement été divisés en TH1 et TH2.

La réaction immunitaire permettant l'élimination des pathogènes intracellulaires tels que les mycobactéries, les virus ou les cellules tumorales est classiquement décrite comme la réponse TH1. Les LT CD4⁺ TH1 sont également impliqués dans le développement de maladies auto-immunes. Ils sont induits par la sécrétion d'IL-12 et d'IFN- γ . Ils se caractérisent par l'expression du facteur transcriptionnel t-bet et sécrètent de l'IFN- γ , de l'IL-2, et du TNF- α permettant d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse à médiation cellulaire en favorisant l'activation des cellules NK, l'amplification des fonctions des macrophages et la différenciation de LT CD8⁺ en CTL.

Les LT CD4⁺ TH2 sont induits par l'IL-4 et caractérisés par l'expression du facteur transcriptionnel GATA-3. Ils produisent de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-25, IL-33. Leur rôle physiologique est d'assurer la défense contre les parasites. Les TH2 sont impliqués dans les pathologies allergiques et l'asthme. Leur sécrétion d'IL-4 inhibe le développement d'une différenciation TH1.

Les LT CD4⁺ TH17, décrits plus récemment sont caractérisés par l'expression du facteur transcriptionnel ROR γ t. Les TH17 sécrètent de l'IL-17A, de l'IL-17F et de l'IL-22. Ils ont un rôle pro-inflammatoire en assurant le recrutement et l'activation des neutrophiles et en conduisant à la production d'autres chémokines et cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, IL1 β et TNF α) par les monocytes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales. Les LT CD4⁺ TH17 sont impliqués physiologiquement dans la défense vis-à-vis de pathogènes extracellulaires tels que des bactéries extra-cellulaires ou encore les infections fongiques. Des taux élevés d'IL17 ont été retrouvés dans plusieurs pathologies chroniques inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis et la sclérose en plaque. Les LT CD4⁺ TH17 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, or l'inflammation a été décrite comme facteur favorisant le processus tumoral, à travers la prolifération, la migration

et la survie des cellules tumorales (71), d'où la supposition d'un rôle délétère des LT CD4⁺ TH17. Selon les modèles tumoraux murins utilisés les données expérimentales ont conclu alternativement à un rôle délétère (72) ou au contraire bénéfique des TH17(73). Récemment, dans un modèle murin de mélanome (B16), le transfert de lignées TH17 sécrétrices d'IFN- γ entraîne un meilleur rejet tumoral que des lignées TH0 ou TH1 (74).

Chez l'homme, Le rôle des LT CD4⁺ TH17 au cours du développement tumoral reste débattu, en partie en raison de la plasticité inhérente de ces cellules.

Les LTreg CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺, assurent physiologiquement la tolérance périphérique (75) et le contrôle de la réaction immunitaire effectrice. Les LTreg sont divisés en LTreg naturels (nTreg) provenant du thymus et en LTreg induits en périphérie (iTreg), parmi lesquels les Tr1 qui sécrètent de l'IL-10 et les TH3 qui sécrètent du TGF- β (76). En pathologie tumorale les LTreg constituent un des mécanismes majeurs d'inhibition de la réponse lymphocytaire effectrice T antitumorale (35).

Les protocoles de thérapies de transferts de LT CD4⁺ ont donc pour objectif l'obtention de lignées TH1, dépourvues en LTreg. Pour cela, en analogie au traitement des cancers viro-induits (41), une stratégie envisageable serait la génération d'une banque de lignées LT CD4⁺ TH1 spécifiques d'un antigène tumoral à partir de lymphocytes périphériques de donneurs que l'on puisse ensuite transférer à des patients histocompatibles. Ces LT CD4⁺ seraient générés à partir de précurseurs naïfs, afin d'optimiser leur capacité de survie après transfert *in vivo*. Ce type d'approche a été jusqu'à présent limité par l'absence d'outils spécifiques permettant d'identifier et d'isoler de faibles fréquences de LT CD4⁺, en particulier à partir du répertoire périphérique de donneur sain non immunisés. Notre travail s'est concentré sur le développement d'une approche permettant de mobiliser, détecter, séparer puis de multiplier *in vitro* des LT CD4⁺ spécifiques de l'antigène tumoral humain ESO.

1.2.2. TETRAMERE CMHII

Les tétramères de complexe CMH/peptide correspondent à l'assemblage de plusieurs complexes CMH/peptide qui sont les ligands de TCR. Ces tétramères sont couplés à un fluorochrome permettant leur détection par cytométrie en flux. Ce sont les premiers outils permettant d'identifier les LT sur la spécificité de leur récepteur. Ils permettent la détection de faibles fréquences de LT.

Avant le développement des tétramères, la détermination de la spécificité d'une population LT au cours d'une réaction immunitaire reposait sur l'analyse par biologie moléculaire du répertoire des TCR, ou sur l'activité fonctionnelle des lymphocytes à travers la sécrétion de cytokines pour les LT CD4⁺ et LT CD8⁺, ou encore la cytotoxicité des LT CD8⁺. La fréquence des LT spécifiques d'un antigène était également estimée par LDA (LDA : limited dilution analysis) qui sous-estime la fréquence des cellules spécifiques, en raison de la mortalité des LT activés (77). L'étude phénotypique des LT nécessitait au préalable une activation. De plus l'isolement des LT spécifiques d'un antigène reposait sur des techniques délicates telles que le tri immunomagnétiques sélectionnant les cellules sécrétant de l'IFN- γ (78), et le clonage.

L'affinité de l'interaction entre le TCR et complexe CMH/peptide est faible avec une vitesse d'interaction rapide. En pratique les tentatives de marquer les cellules T spécifiques par leur complexe CMH/peptide se sont révélées décevantes. Le succès du marquage des cellules T spécifiques d'un l'antigène résulte de l'idée d'augmenter l'avidité de l'interaction en recourant à des multimères du complexe CMH/peptide.

Cette oligomérisation repose généralement sur l'ajout de biotine au niveau de la partie proche de la membrane de la molécule de CMH. Ceci est permis par la modification d'une lysine en lysine-biotine au niveau d'un peptide cible inséré à l'extrémité C terminale de la chaîne lourde. Cette réaction est catalysée par une enzyme bactérienne : la ligase BirA. La streptavidine permet ensuite, en se liant à la biotine, la tétramérisation. Les tétramères de CMH de classe I ont ainsi été initialement développés par JD Altman and al. (79). La méthode d'Altman se distingue des méthodes précédentes par la synthèse en *Escherichia coli* des chaînes α et β de façon indépendante. Leur liaison (ou réassemblage) est ensuite assurée spontanément grâce au chargement du peptide exogène présent en excès dans la solution, suivi de l'étape de tétramérisation. La méthode de Altman est la méthode de référence pour les tétramères de classe I car elle permet d'obtenir des tétramères sensibles et

spécifiques, pouvant être adaptés à de nombreux peptides. Les tétramères ainsi développés permettent l'analyse par cytométrie en flux des LT CD8⁺ selon leur spécificité antigénique. Ces outils offrent la possibilité de détecter une fréquence basse de LT spécifiques, de les énumérer et de les étudier phénotypiquement par l'association d'autres Ac couplés à des fluorochromes. Ils permettent également de trier les LT CD8⁺ selon leur spécificité antigénique afin de pouvoir les caractériser.

Le développement de tétramère CMH II est plus récent, en raison notamment du polymorphisme élevé des molécules CMH II, et de leur faible capacité de liaison aux peptides, notamment ceux dérivant d'auto-antigènes ou d'antigènes tumoraux (80). De plus, contrairement au CMH I, les molécules CMH II sont des dimères de chaînes α et β liées de façon non covalente qui présentent une stabilité variable en solution. Ainsi, les chaînes produites sous forme soluble ne s'associent spontanément que très rarement, même en présence du peptide.

Afin de répondre à la difficulté de lier de façon stable les chaînes α et β des molécules de CMHII, Novak et al a développé une méthode dite du « leucine zipper », pouvant être traduit littéralement par « fermeture éclair à leucine ». Un motif « leucine zipper » acide et basique est incorporé aux extrémités C-terminale (parties transmembranaires et cytoplasmiques) des chaînes HLA-DR α et β respectivement, par l'intermédiaire d'un peptide flexible. Une séquence substrat de biotinylation est ensuite attachée à l'extrémité C-terminale du motif « leucine zipper » acide (81). La figure ci-dessous reprend les étapes de cette méthode.

L'incorporation des motifs « leucine zipper » via un peptide flexible présente l'avantage de former des tétramères tout en conservant une bonne flexibilité, nécessaire aux liaisons multivalentes entre les tétramères et les TCR.

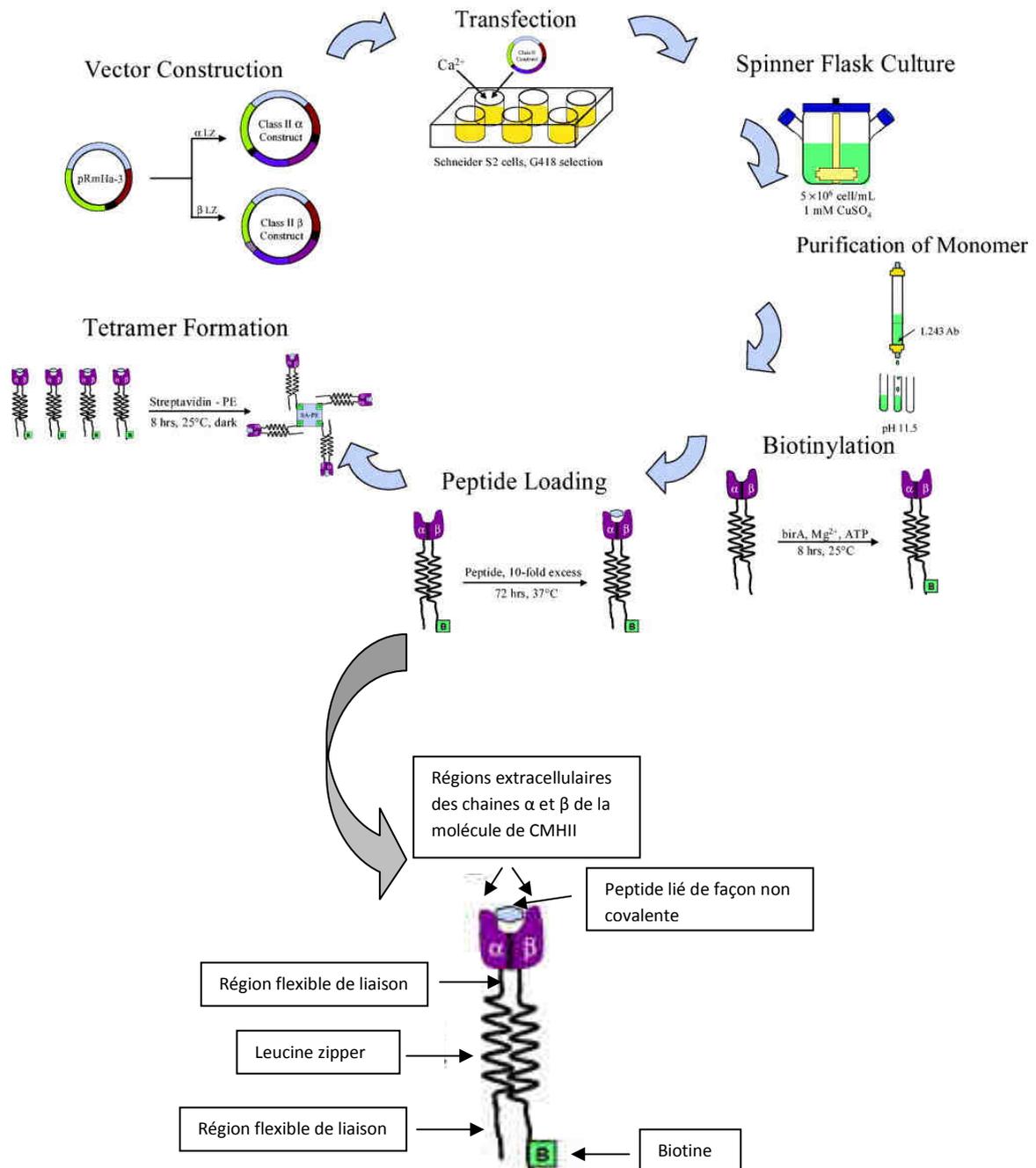


Figure 5. Méthode des « leucines zipper ».

La partie transmembranaire et extracellulaire de la chaîne α et β de la molécule CMHII est remplacée par un motif zipper leucine acide et basique respectivement. La séquence LNDIFEAQKIEWH, qui permet la biotinylation par l'enzyme BirA d'E coli est reliée au motif leucine zipper basique. L'ADnc résultant est cloné dans le vecteur d'expression pRmHa-3, dans lequel l'expression est sous le contrôle du promoteur de la metallothionine, et donc inducible par l'adjonction CuSO₄. Les molécules de CMHII solubles sont ensuite purifiées par chromatographie d'affinité puis biotinylées sous l'action de l'enzyme BirA. Les molécules sont ensuite chargées avec le peptide d'intérêt présent en excès (facteur de 10 mol) dans la solution, à pH 5,5, en présence de 0.2% octyl b-D-glucopyranoside pendant 72 h. à 37°C. Les complexes CMHII-peptides sont ensuite conjugués entre eux grâce à la liaison straptavidine-biotine. (Kwok WW, and al. Challenges in staining T cells using HLA class II tetramers. Clin Immunol. 2003)

En effet, la principale limite de cette méthode est le faible rendement de chargement peptidique qui résulte en des monomères composés des chaînes α et β du MHC, liés grâce au motif leucine zipper. La chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), utilisée pour purifier les monomères avant tétramérisation, ne permet pas de distinguer les monomères contenant ou non le peptide antigénique. Les tétramères ainsi obtenus sont souvent peu efficaces. Cette limite se vérifie tout particulièrement dans le cas d'antigènes du soi ou d'antigènes tumoraux.

Pour remédier à cela, une procédure de production de tétramères de CMHII se base sur l'ajout d'un groupement histidine (His-tag) en région N-terminal du peptide antigénique. Ce groupement permet ensuite la séparation et l'utilisation sélective des complexes chargés en peptide par purification par chromatographie d'affinité sur des colonnes de Nickel (Ni), avant tétramérisation sur streptavidine marquée à la phycoérythrine (PE) (82).

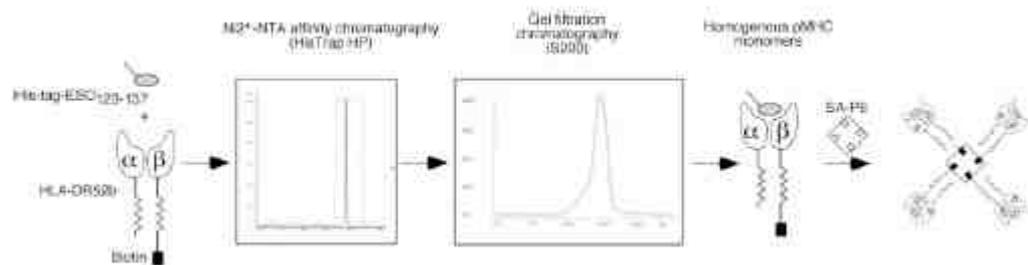


Figure 6. Méthode de sélection des molécules CMHII chargées en peptide grâce à la détection du groupement histidine.

(Ayyoub M, and al. Monitoring of NY-ESO-1 specific $CD4^+$ T cells using molecularly defined MHC class II/His-tag-peptide tetramers. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010)

En utilisant cette méthode « His-tag » mon laboratoire d'accueil, en collaboration avec le groupe du Dr. I. Luescher de l'Institut Ludwig de Recherche sur le Cancer à Lausanne, a développé un tétramère spécifique de l'antigène tumoral NY-ESO-1 : HLADR52b/ESO119-143, marqué à la PE (appelés DR52b/ESO119-143), permettant de visualiser aisément et de quantifier les cellules T $CD4^+$ spécifiques d'ESO au sein des lymphocytes circulants des patients vaccinés avec une protéine recombinante ESO (rESO) (82).

1.2.3. ANTIGENE TUMORAL NY-ESO-1

L'équipe de recherche dans laquelle j'ai réalisé ma thèse d'exercice se concentre depuis plusieurs années sur les CTA et en particulier sur l'antigène ESO. Cet antigène, codé par le gène *CTAG1*, situé sur le chromosome X, a été isolé d'un patient atteint d'un cancer de l'œsophage par la méthode SEREX (17). Certains patients atteints de cancer développent des réponses sérologiques spécifiques des antigènes exprimés par leur tumeur. La méthode SEREX utilise le sérum du patient pour cribler une banque d'ADNc tumoraux afin d'identifier les gènes codant pour les antigènes reconnus par les anticorps. ESO se caractérise, comme les autres antigènes du groupe CTA, par une expression limitée aux testicules chez l'adulte sain et, est également exprimé par des cellules tumorales de cancers solides tels que le mélanome, le cancer de l'ovaire, le sarcome, le cancer du poumon, du foie ainsi que le cancer du sein (83). Il est également exprimé par des cellules tumorales hématopoïétiques, dans le cadre notamment du myélome (84). Cette expression résulte d'une déméthylation des régions promotrices des gènes *CT* dans les cellules tumorales.

De plus, ESO est spontanément immunogénique comme en atteste la présence d'anticorps anti-ESO ainsi que des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques fréquemment retrouvés chez les patients dont les tumeurs expriment l'antigène, telles que le mélanome et le cancer de l'ovaire (18). La fréquence et la spécificité d'expression d'ESO dans les cancers font de cet antigène un candidat prometteur en immunothérapie anti-tumorale, ce qui a débouché sur des essais cliniques académiques de vaccination (85), dont certains en cours, sous le parrainage du programme Cancer Vaccine Collaborative (CVC) (<http://www.cancerresearch.org>). ESO a été récemment sélectionné par le National Cancer Institute parmi les 10 antigènes les plus prometteurs pour le développement des vaccins anti-tumoraux (86). Des essais cliniques de transfert adoptif cellulaire récents ont affirmé l'intérêt de générer des LT CD8⁺ ainsi que des LT CD4⁺ spécifiques d'ESO (87) (66).

L'étude des épitopes d'ESO reconnus par les LT CD4⁺ chez les patients cancéreux ainsi que les chez les sujets sains a permis d'identifier deux régions d'intérêt : ESO81-100 et ESO119-143 qui peuvent être présentés par plusieurs allèles HLAII fréquemment exprimés (88) (89) (90). L'étude des réponses immunitaires LT CD4⁺ induites par vaccination avec rESO chez des patients cancéreux a permis d'identifier l'épitope ESO119-143 présenté par les molécules DR52b comme immunodominant (91). En effet tous les patients

DR52b⁺ vaccinés ont développé une réponse LT CD4⁺ spécifiques de DR52b/ESO119-143.

Le HLA-DR52b correspond à la nomenclature sérologique du HLA-DRB3*0202.

La région de classe II contient 23 à 25 gènes et pseudogènes.

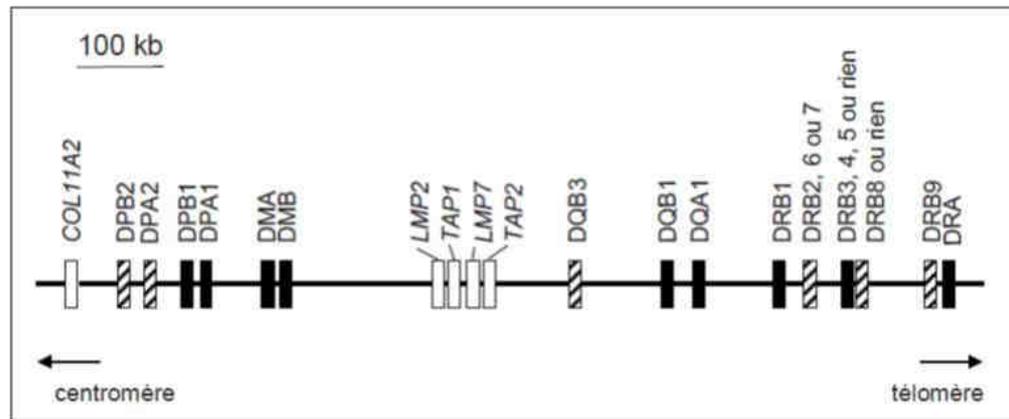


Figure 7. Organisation de la région HLA de classe II.

Les gènes ne sont pas représentés à l'échelle, seules les distances les séparant le sont. En noir, sont représentés les gènes HLA II exprimés, en hachuré les pseudogènes HLA II et en blanc les gènes associés à la région HLA II effectivement exprimés (COL11A2 : collagène, LMP : protéasome).

Elle comprend 6 à 7 locus fonctionnels : deux ou trois codant les molécules HLA-DR (DRA et un ou deux DRB), deux codant les molécules HLA-DQ (DQA et DQB) et deux codant les molécules HLA-DP (DPA et DPB). Les gènes A et B correspondent respectivement à chacune des deux chaînes α et β des molécules HLA II.

Il existe plusieurs gènes DRB : DRB1 code une chaîne β , très polymorphe, qui est toujours exprimée, et les gènes DRB3, DRB4 et DRB5 (mutuellement exclusifs) codent pour une deuxième molécule qui n'est pas nécessairement présente et peu polymorphe. Tous les individus expriment donc deux allèles HLADRB1* parmi lesquels certains sont associés à l'expression d'un HLADRB3*. Seuls les allèles B3*0101 et B3*0202(=DR52b) sont fréquemment retrouvés (92) (93) (94). Cette prépondérance de seulement quelques allèles DRB3 s'explique par l'association de plusieurs allèles DRB1, dont certains sont fortement représentés dans plusieurs groupes ethniques, tel que le DR11 (DRB*11) avec un nombre restreint d'allèles DRB3. Plusieurs études, principalement menées au sein de la population américaine, ont permis d'établir la distribution des allèles DRB3 ainsi que leur association avec les allèles DRB1(92) (94).

Au total, on estime qu'environ la moitié des caucasiens expriment DR52b.

OBJECTIF

Le but de notre travail a été le développement d'une plate-forme de priming (ou stimulation antigénique initiale de cellules précurseurs) *in vitro* permettant la génération de lignées LT CD4⁺ spécifiques d'ESO à partir des lymphocytes circulants de donneurs sains.

Nous avons ainsi dans un premier temps stimulé avec le peptide immunodominant ESO119-143 les LT CD4⁺ de donneurs pré-sélectionnés selon l'expression du HLA de classe II DR52b. Nous avons adressé la présence et la fréquence des LT CD4⁺ spécifiques d'ESO dans les cultures en utilisant les tétramères DR52b/ESO119-143. Puis, après tri cellulaire par cytométrie en flux des cellules tétramère⁺, et leur expansion *in vitro*, nous avons étudié l'avidité fonctionnelle des populations lymphocytaires ainsi obtenues.

MATERIEL ET METHODES

3.1. ISOLEMENT DES LT CD4⁺ DE DONNEURS SAINS

Des anneaux de kit (résidu de couche leucoplaquettaire) de sang périphérique ont été fournis par l'Établissement Français du Sang Pays de Loire, à partir du sang périphérique collecté chez des donneurs sains, après information et consentement écrit. Les cellules mononuclées du sang périphérique (CMNS) ont été isolées par gradient de densité en utilisant le milieu de séparation lymphocytaire LSM 1077 (PAA laboratories GmbH). Les LT CD4⁺ ont ensuite été séparés à l'aide de billes magnétiques sur colonnes de sélection aimantées (Miltenyi Biotec) et mis en culture dans de l'IMDM (GIBCO), 10% sérum de veau fœtal (SVF) pendant la nuit. La fraction lymphocytaire CD4⁻ a été conservée puis irradiée pour servir de cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Le lendemain, les LT CD4⁺ ont été marqués par des anticorps spécifiques de molécules de surface couplés à des fluorochromes : Ac anti-CD8, -CD45RA (BD Biosciences), -CCR7 (BD Biosciences), -CD25 (Beckman Coulter), -CD127 (eBiosciences), afin de trier par cytométrie en flux (FACS Aria II, BD Biosciences) les cellules T CD4⁺ conventionnelles naïves (N ; CD45RA⁺CCR7⁻CD25⁻), mémoires conventionnelles totales (M ; CD45RA⁻CCR7^{+/-}CD25⁻), centrales (MC ; CD45RA⁻CCR7⁺CD25⁻) et effectrices (ME ; CD45RA⁻CCR7⁻CD25⁻), ainsi que les cellules T régulatrices naïves (NnTreg ; CD45RA⁺CCR7⁺CD25⁺CD127^{low}) et mémoires (MTreg ; CD45RA⁻CCR7^{+/-}CD25⁺CD127^{low}) (Fig.8). La pureté des populations triées citées étaient supérieures à 97%.

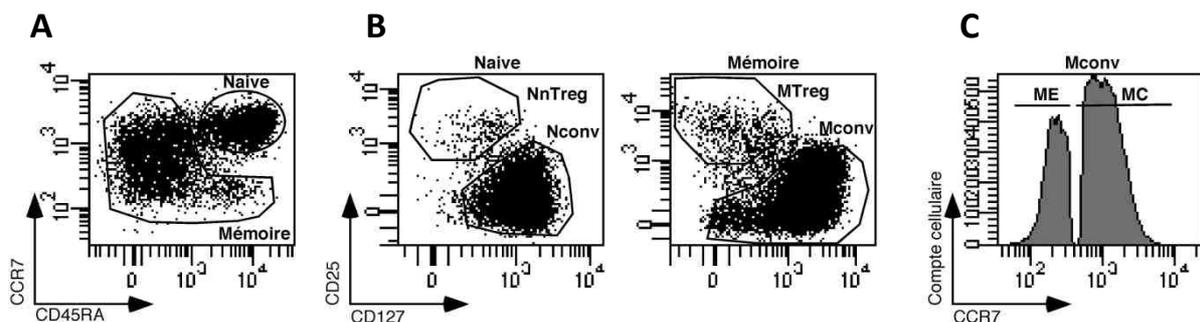


Figure 8. Plan de séparation des différentes sous-populations de LT CD4⁺ par tri en cytométrie en flux. (A) Dans un premier temps, les LT CD4⁺ ont été subdivisés en population mémoire totale (CD45RA⁻) et naïve totale (CD45RA⁺CCR7⁺). (B) Puis les LT CD4⁺ conventionnels ont été séparés des cellules régulatrices dans les compartiments naïf (cytogramme de gauche) et mémoire (cytogramme de droite). (C) Les LT CD4⁺ mémoires conventionnelles ont été divisés en deux sous-populations, en fonction ou non de l'expression de CCR7 : les mémoires centrales (MC), CCR7⁺, et les mémoires effectrices (ME), CCR7⁻.

3.2. SELECTION DES PATIENTS DR52b+

Une partie des CMNS du donneur sain (2×10^5) ont servi de CPA dans un test de sélection des donneurs HLADRB3*0202+ (DR52b+). Une fraction des CMNS (1×10^5) a été incubée pendant 1 heure à 37°C en présence du peptide ESO119-143 ou du milieu seul (IMDM.10%SVF) et lavée 3 fois. En parallèle, les cellules de la lignée immortalisée B-EBV DR52b+, (JBUSH : 9035, National Marrow Donor Program /American Society for Histocompatibility and Immunogenetics : NMDP/ASHI), exprimant DR52b, ont été chargées en peptide ESO119-143 et lavées selon les mêmes conditions. Puis, les cellules présentatrices d'antigène chargées ou non en peptide ont été incubées en présence de $2 \cdot 10^4$ cellules d'un clone T CD4⁺ spécifiques du complexe DR52b/ESO119-143 (C1E4) pendant 4 heures à 37°C, avec ajout de bréfeldine A au bout d'1 heure d'incubation. La reconnaissance antigénique du clone T CD4⁺ spécifique a été évaluée par un marquage intracellulaire avec un anticorps anti-IFN- γ couplé à du FITC (BD Pharmingen). Les cellules JBUSH DR52b+ chargées avec le peptide ont constitué le contrôle positif ; les cellules présentatrices d'antigène, non chargées en peptides, en présence du clone spécifique T CD4⁺ C1E4 ont servi de témoins négatifs.

3.3. MARQUAGE TETRAMERE *EX VIVO*

$1,5 \times 10^6$ LT CD4⁺ isolés par un anticorps anti-CD4 couplés à des billes magnétiques ont été incubés avec le tétramère DR52b/ESO119-143 (3 μ g/mL) pendant 2h à 37 °C et lavées. Les lymphocytes ont ensuite été marqués avec des anticorps spécifiques d'antigènes de surfaces permettant de déterminer leur phénotype : Ac anti-CD45RA, -CCR7, -CD25, -CD27, -CD8, -CD127, et analysés par cytométrie en flux (FACS Aria II, BD Biosciences) (82).

3.4. STIMULATION *IN VITRO* DES SOUS-POPULATIONS LT CD4⁺ TRIÉES EN PRESENCE DU PEPTIDE IMMUNODOMINANT ESO119-143

Les populations triées ont été stimulées avec le peptide ESO119-143 (2 μ M) en présence des cellules CD4⁻ irradiées servant de CPA selon un ratio de 1:1 (500000 LT CD4⁺:500000 CPA par puit d'une plaque de culture de 96 puits à fond rond) et ont été maintenues en culture pendant 12 jours dans du milieu IMDM, 10% sérum humain (SH) en présence d'IL-2 (Chiron ; 100UI/mL).

3.5. DETECTION DES CELLULES SPECIFIQUES DE NY-ESO-1 DANS LES CULTURES DE LT CD4⁺ PAR MARQUAGE AVEC LES TETRAMERES

Après stimulation *in vitro*, la présence et la fréquence des cellules T CD4⁺ spécifiques d'ESO119-143 ont été évaluées par marquage de surface avec le tétramère DR52b/ESO119-143 (3µg/mL, incubation 1 heure, 37°C) suivi d'un marquage de surface avec un anticorps anti-CD4. Dans certaines expériences, les cellules ont en plus été marquées avec un anticorps anti-Vβ2 (Immunotech). Le tétramère DR52b/MP73-92 His-tag-PE (antigène peptidique issu de la protéine de matrice du virus de la grippe) a été utilisé comme témoin négatif.

3.6. GENERATION DE LIGNEES LT SPECIFIQUES DU PEPTIDE ESO119-143

Les LT CD4⁺ spécifiques d'ESO dans les cultures de LT CD4⁺ stimulés *in vitro* avec le peptide, détectés par le marquage tétramère (ESO/tétramère⁺), ont ensuite été triés par cytométrie en flux. Puis, ces cellules ont été stimulées en présence du mitogène phytohémaglutinine (PHA) (0,2µg/mL) et de CMNS allogéniques irradiées dans du milieu IMDM 10% SVF en présence d'IL-2 (100U/mL).

3.7. TEST DE RECONNAISSANCE ANTIGENIQUE : TITRATION

Les monocytes (CD14⁺) ont été triés par billes magnétiques (Miltenyi Biotec) à partir des CMNS de donneurs DR52b⁺ et cultivées en IMDM 10% SH, 1000U/mL de rhGM-CSF (Immunex) et 1000U/mL de rhIL-4 (R&D Systems) durant 5 jours afin de les différencier en cellules dendritiques dérivées des monocytes (MoCD). Les MoCD obtenues ont ensuite été incubées pendant 16 heures en présence de dilutions en série de la protéine recombinante humaine ESO ou de la protéine Melan-A (contrôle négatif). Les cellules de la lignée B-EBV DR52b⁺ ont été incubées en présence de dilutions en série du peptide ESO119-143 ou du peptide ESO1-20 (contrôle négatif). Les cellules dendritiques et les cellules JBUSH ont ensuite été incubées en présence des lignées lymphocytaires polyclonales spécifiques d'ESO119-143. Après 24h, la sécrétion d'IFN-γ a été mesurée par ELISA (Invitrogen) dans le surnageant cellulaire. La reconnaissance antigénique a ainsi été évaluée sur 8 dilutions décroissantes de protéines et peptides, de 556 à 0,22 nmol/mL et 10000 à 0,13 nmol/mL respectivement. C1E4, un clone LT CD4⁺ spécifique d'ESO119-143 dérivé d'un patient vacciné, a servi de témoin positif.

3.8. PROFIL CYTOKINIQUE DES LIGNEES LT CD4⁺ SPECIFIQUES DE DR52b/ESO119-143

Après 4h de stimulation *in vitro*, en présence de PMA et de ionomycine, un marquage intracellulaire a permis d'évaluer la production d'IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 (BD Biosciences) et d'IL-17 (eBiosciences) par cytométrie en flux.

3.9. ALLOREACTIVITE DES LIGNEES LT CD4⁺ SPECIFIQUES DE DR52b/ESO119-143

10⁴ LT CD4⁺ spécifiques d'ESO ont été incubées en présence de MoCD (5x10⁴) dérivées des cellules CD14⁺ présentes dans le sang périphérique de 8 donateurs sains DR52b+, en présence ou non du peptide ESO 119-143. La sécrétion d'IFN- γ a été mesurée par technique ELISA dans le surnageant de culture à 24h.

3.10. ANALYSES STATISTIQUES

Les tests statistiques ont été réalisés à partir du logiciel Prism (Graph-Pad Software, Inc.). Les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives.

RESULTATS

4.1 PRIMING *IN VITRO* DE LT CD4⁺ SPECIFIQUES D'ESO119-143 A PARTIR DE CELLULES NAIVES CONVENTIONNELLES DE DONNEURS SAINS ET DETECTION PAR LES TETRAMERES DR52b/ESO119-143

Le tétramère DR52b/ESO119-143 permet d'analyser les réponses spécifiques d'ESO restreinte par l'HLA-DR52b, nous avons donc dû dans un premier temps sélectionner les patients DR52b⁺. La sélection des donneurs sains a été réalisée par la mise en présence des CMNS de chacun des donneurs avec ou sans le peptide ESO119-143 et d'un clone T CD4⁺ (C1E4) ayant une spécificité antigénique restreinte au complexe HLA-DR52b/ESO119-143. Ainsi, seuls les donneurs DR52b⁺ présentent le peptide à ce clone T CD4⁺, induisant la sécrétion d'IFN- γ par ce dernier. Un marquage intracellulaire à l'aide d'un anticorps anti-IFN- γ après 4 heures d'incubation a permis de détecter les patients DR52b⁺. Au final, nous avons testé 26 donneurs sains parmi lesquels 11, soit 42%, étaient DR52b⁺.

Nous avons ensuite enrichi les LT CD4⁺ à partir des CMNS des donneurs DR52b⁺ par tri magnétique et isolé les LT CD4⁺ naïfs conventionnels (CD25⁻CD45RA⁺CCR7⁺) par tri en cytométrie en flux (Fig.8, section Matériels et Méthodes). Nous avons stimulé les populations isolées ($\geq 3,5 \times 10^6$ /stimulation) avec le peptide ESO119-143 en présence des cellules autologues de la fraction CD4⁻ irradiées (utilisées comme CPA) et de l'IL-2 (100U/mL), et les avons cultivées dans du milieu de culture IMDM supplémenté avec 10% de sérum humain. Après douze jours de stimulation, nous avons testé la présence de cellules T CD4⁺ spécifiques d'ESO dans les cultures par co-marquage avec le tétramère DR52b/ESO119-143 et d'un anticorps anti-CD4. Comme illustré dans la Figure 9.A. et résumé dans la Figure 9.B. les cellules CD4⁺ ESO/tétramère⁺ sont détectables dans les cultures de tous les donneurs DR52b⁺, à des fréquences allant de 0,4% à 3,5% des cellules T CD4⁺ (moyenne : $1,8 \pm 1,1$). Nous n'avons pas observé de marquage significatif en utilisant un tétramère contrôle DR52b incorporant un peptide de la protéine de la matrice du virus de la grippe (MP73-92) qui avait été validé au préalable sur des cultures spécifiques de cet épitope (données non montrées). De plus, nous n'avons pas observé de marquage significatif avec les tétramères DR52b/ESO119-143 en testant de façon similaire les cellules T CD4⁺ de donneurs DR52b⁻ (3 donneurs testés).

Dans l'ensemble, ces données montrent qu'il est possible d'obtenir un priming *in vitro* efficace des cellules CD4⁺ spécifiques d'ESO et restreintes par

DR52b à partir de cellules T CD4⁺ naïves conventionnelles de donneurs sains non immunisés DR52b⁺.

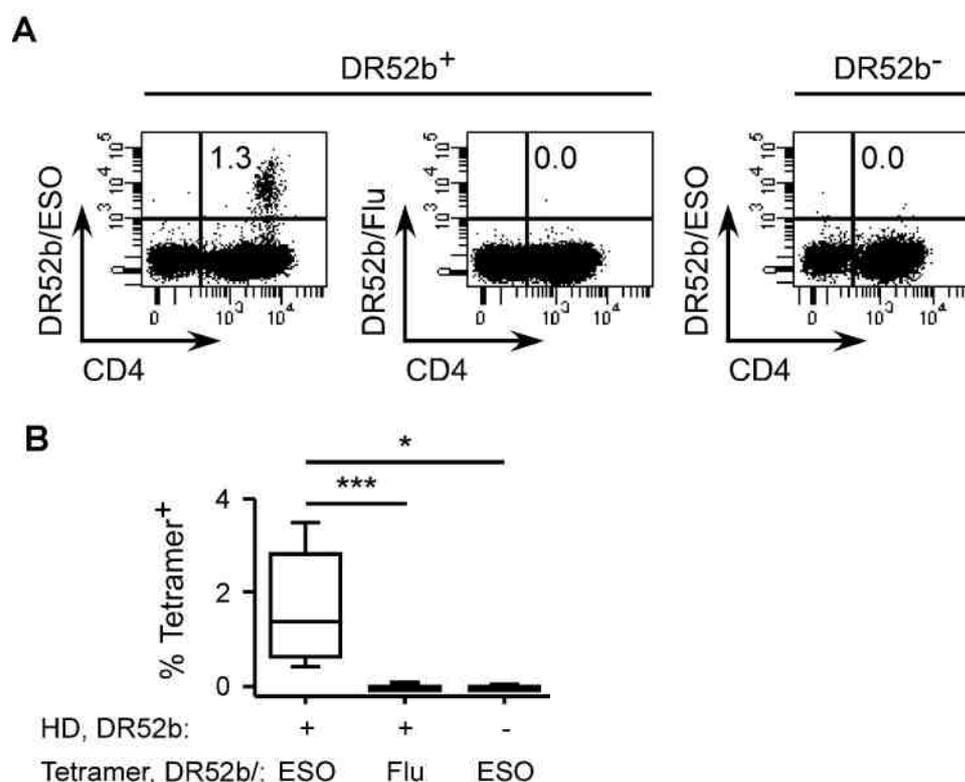


Figure 9. Détection de LT CD4⁺ spécifiques d'ESO119-143 chez les donneurs sains.

(A) Après 12 jours de culture *in vitro* en présence du peptide ESO119-143 et d'IL-2 (100U/mL), les LT CD4⁺ naïfs conventionnels (N, CD45RA⁺CCR7⁺CD25⁻) de donneurs sains ont été marqués avec le tétramère DR52b/ESO119-143 (3µg/mL, pendant 1h à 37°C) ou le tétramère DR52b/MP73-92 (témoin négatif) et un anticorps anti-CD4. A gauche un donneur DR52b⁺. A titre comparatif, à droite un donneur DR52b⁻. (B) Figure récapitulative : fréquence des LT CD4⁺ ESO/tétramère⁺ chez les donneurs DR52b⁺ ; en comparaison, fréquence des LT CD4⁺ DR52b /MP 73-92⁺ chez les donneurs DR52b⁺ ainsi que la fréquence des LT CD4⁺ ESO/tétramère⁺ chez 3 donneurs DR52b⁻ (moyenne ±DS). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Mann-Whitney. *, p<0,05 ;***, p<0,001.

4.2 ESTIMATION DE LA FREQUENCE DES PRECURSEURS SPECIFIQUES D'ESO119-143 RESTREINTS PAR DR52b PARMIS LES LT CD4⁺ NAIFS DES DONNEURS SAINS DR52b⁺

A partir des pourcentages de cellules ESO/tétramère⁺ détectés après priming *in vitro* des LT CD4⁺ naïfs des donneurs sains DR52b⁺, nous avons calculé la fréquence des précurseurs spécifiques d'ESO en utilisant la formule mathématique : $F = X/2n$ (avec F : nombre de précurseurs spécifiques d'ESO; X : pourcentage de cellules T CD4⁺ ESO/tétramère⁺ et n : nombre de jours de culture avant le marquage), en estimant que les lymphocytes se divisent une

fois par jour après stimulation. Nous avons obtenu une fréquence présumée de précurseurs comprise entre $1/10^5$ et $1/10^6$ LT CD4⁺ naïfs présents dans le sang périphérique de donneurs sains. Cette basse fréquence est en accord avec notre incapacité à détecter *ex vivo* les précurseurs CD4⁺ naïfs spécifiques d'ESO chez les donneurs sains DR52b⁺.

A titre comparatif, les patients ayant développés un cancer et bénéficiant du vaccin recombinant ESO représente une situation d'immunisation. Chez ses derniers, la fréquence *ex vivo* des cellules ESO/tétramère⁺ parmi les populations CD4⁺ mémoires est en moyenne de 0,024% (82) (figure 10).

La faible fréquence des précurseurs spécifiques implique de stimuler un nombre de LT CD4⁺ naïfs suffisant (au moins 5×10^6) pour obtenir un priming *in vitro* efficace et reproductible ; la stimulation d'un plus petit nombre de cellules T CD4⁺ pouvant donner une plus grande variabilité de résultats (données non montrées).

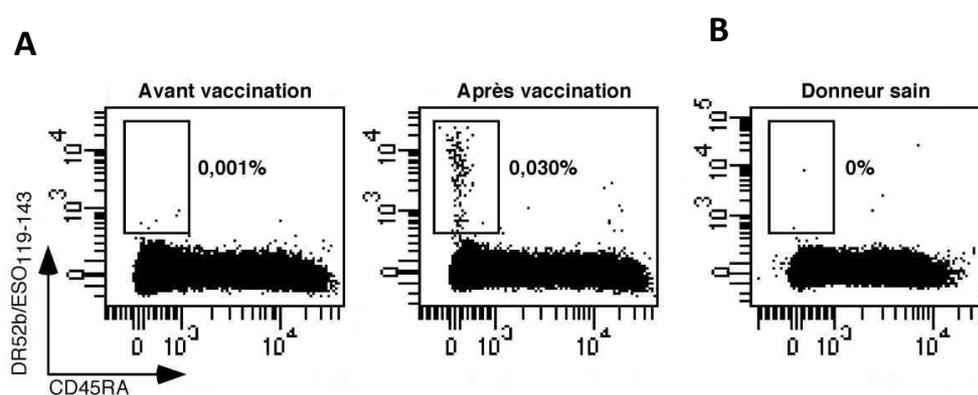


Figure 10. Quantification en *ex vivo* des LT CD4⁺ ESO/tétramère⁺.

(A) Les LT CD4⁺ d'un patient DR52b⁺ ont été marqués, avant puis après vaccination avec la protéine recombinante humaine ESO, en *ex vivo*, avec le tétramère DR52b/ESO119-143 (3µg/mL, incubation 2 heures à 37°C) puis avec un anticorps spécifique dirigé contre le CD45RA et analysés par cytométrie. (B) Les LT CD4⁺ d'un donneur sain ont été marqués dans les mêmes conditions.

4.3 GENERATION *IN VITRO* DE LT CD4⁺ ESO/TETRAMERE+ A PARTIR DE LT CD4⁺ MEMOIRES CONVENTIONNELS CENTRAUX, MAIS PAS A PARTIR DE LT EFFECTEURS MEMOIRES, NI DE LT CD4⁺ REGULATEURS

Parallèlement aux LT CD4⁺CD25⁻ conventionnelles naïfs, nous avons trié comme détaillé en Matériel et Méthodes (figure 8) puis stimulé des LT CD4⁺ conventionnelles mémoires (CD45RA⁻ CCR7^{+/-} CD25⁻), dans les mêmes conditions que les LT CD4⁺ naïfs conventionnelles, c'est-à-dire en présence du peptide ESO 119-143 et d'IL2.

De façon inattendue, une proportion significative de cellules ESO/tétramère⁺ a été détectée dans les cultures issues des LT conventionnelles mémoires à des fréquences allant de 0,1 à 1,1% (0,4 ± 0,4%). Ces fréquences sont en moyenne trois fois moindres que celles détectées dans les cultures issues des cellules naïves (Figure 11A).

Pour définir plus précisément la population de cellules mémoires contenant les précurseurs spécifiques d'ESO, nous avons par la suite séparé les cellules T CD4⁺ mémoires en cellules CCR7⁺ mémoires centrales (MC) et CCR7⁻ mémoires effectrices (ME) et les avons stimulées *in vitro* comme précédemment. Nous avons détecté des fréquences de cellules ESO/tétramère⁺ dans les cultures issues de cellules MC allant de 0,2 à 1,5%, moyenne 0,7 ± 0,6%. Au contraire, nous n'avons pas détecté de cellules ESO/tétramère⁺ dans les cultures issues des cellules ME (Figure 11B).

En parallèle, ces expériences ont également été réalisées à partir de populations LT CD4⁺ régulatrices : CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} Treg naïves (NTreg) et mémoires (MTreg). Aucune fréquence significative de cellules ESO/tétramère⁺ n'a été détectée dans ces populations après stimulation avec le peptide ESO119-143 (Figure 11C).

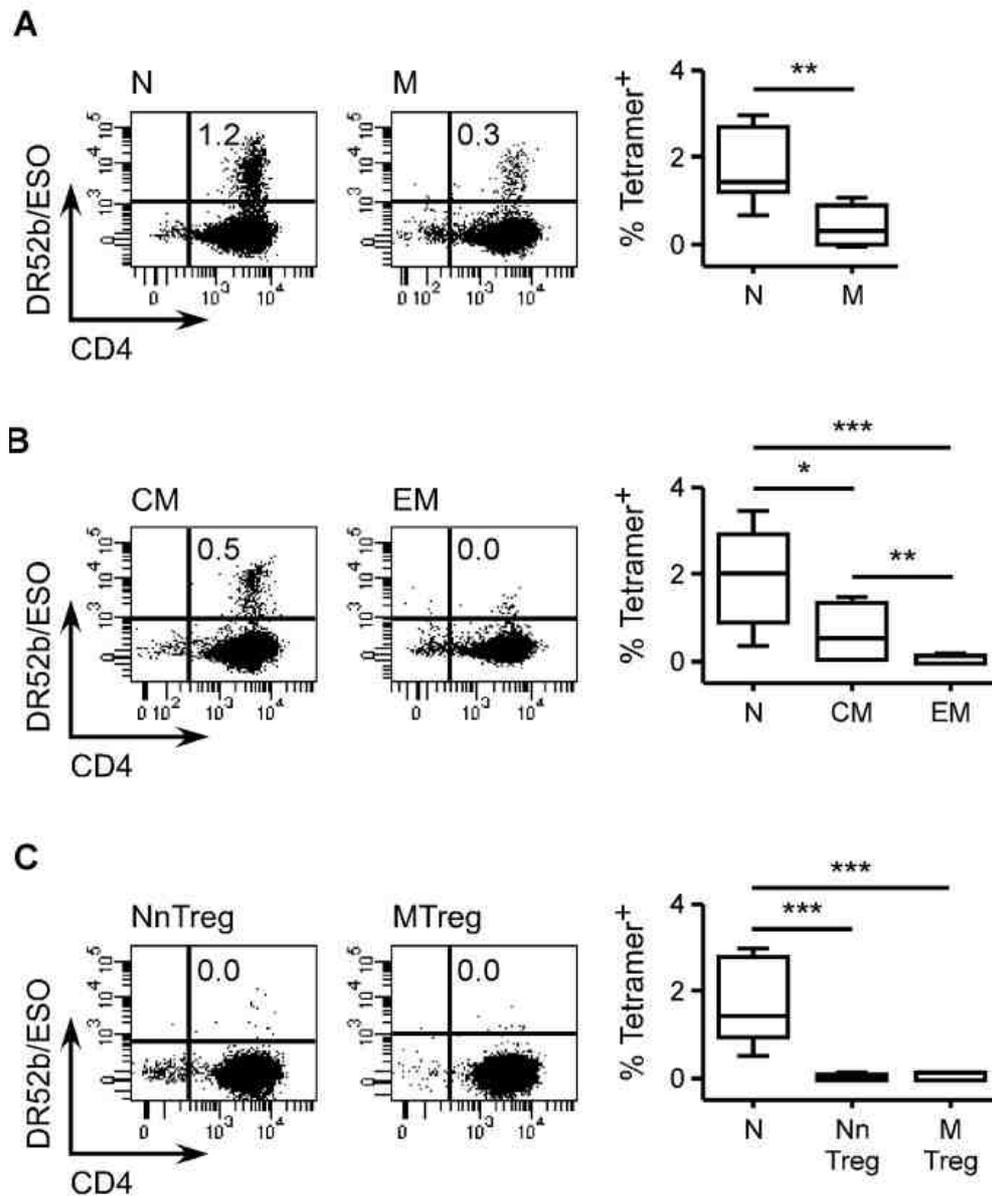


Figure 11. Présence de précurseurs spécifiques de DR52b/ESO119-143, parmi les LT CD4⁺ mémoires conventionnelles et centraux mémoires, mais absents au sein des populations effectrices conventionnelles et régulatrices (naïves et mémoires)

Les populations conventionnelles naïves (N, CD45RA⁺CCR7⁺CD25⁻) et mémoires totales (M, CD45RA⁻CCR7^{+/+}CD25⁺) (n=7), MC (CCR7⁺) et ME (CCR7⁻) (n=9) ainsi que les cellules Treg naïves (NTreg) et mémoires (MTreg) (n=9) de donneurs sains DR52b⁺ ont été triées *ex vivo* comme détaillé dans la Figure 8, stimulées *in vitro* avec le peptide ESO119-143 puis la fréquence des cellules spécifiques de l'épitope DR52b/ESO119-143 a été déterminée par marquage des cultures à J12 avec les tétramères. Les exemples de marquage pour un donneur et le récapitulatif des pourcentages de cellules ESO/tétramère⁺ pour tous les donneurs testés sont montrés en (A) pour les mémoires conventionnelles, en (B) pour les populations centrales et effectrices mémoires conventionnelles et en (C) pour les populations Treg (moyenne ±DS). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test appariés de Wilcoxon, *, p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001.

4.4 EVALUATION FONCTIONNELLE DES LIGNÉES LT CD4⁺ ESO/TETRAMÈRE⁺ GÉNÉRÉES PAR PRIMING *IN VITRO*

4.4.1 AVIDITÉ FONCTIONNELLE : TEST DE TITRATION

Nous avons ensuite caractérisé fonctionnellement les LT CD4⁺ ESO/tétramère⁺ obtenus par priming *in vitro* en présence d'ESO 119-143 et d'IL2.

Nous avons dans un premier temps évalué si les LT CD4⁺ obtenues par priming *in vitro* à partir du sang périphérique de donneurs sains étaient de bonne avidité fonctionnelle et capables de reconnaître l'antigène ESO natif. Pour cela, nous avons isolé les cellules ESO/tétramère⁺, à partir des cultures des donneurs sains décrites ci-dessus, par tri en cytométrie en flux. Nous les avons ensuite amplifiées *in vitro* par stimulation avec le mitogène PHA (0,2µg/mL) en présence de CMNS irradiées et d'IL2, et mises en culture pendant 10 jours. Nous avons obtenu des lignées T CD4⁺ contenant plus de 90% de cellules tétramère⁺. Un exemple de marquage des lignées spécifiques ESO/tétramère⁺ obtenues en suivant cette stratégie est représenté en Figure 12A.

Nous avons ensuite évalué l'avidité de reconnaissance du peptide ESO119-143 par ces populations dans un test fonctionnel de titration en utilisant comme référence interne le clone C1E4 dérivé d'un patient vacciné avec la protéine recombinante ESO, qui avait été généré et caractérisé auparavant (91). Nous avons incubé les lymphocytes avec une lignée B-EBV DR52⁺ en présence de dilutions en série du peptide ESO119-143 ainsi que d'un peptide contrôle, puis, la sécrétion d'IFN-γ dans le surnageant des cultures de 24 h a été dosée par test ELISA. En parallèle, nous avons testé la capacité des lignées ESO/tétramère⁺ à reconnaître l'antigène ESO complet sous la forme de protéine recombinante apprêtée par des cellules dendritiques. Une protéine recombinante correspondant à un autre antigène tumoral (Melan-A) a été utilisée comme contrôle négatif. Les résultats de ces expériences sont illustrés dans la Figure 12B.

Dans l'ensemble, ces données montrent que les lignées issues du priming *in vitro* reconnaissent le peptide ESO119-143 avec une avidité fonctionnelle similaire à celle du clone contrôle et sont capables de reconnaître de façon efficace la protéine recombinante ESO après apprêtement et présentation par moDC. Au contraire, aucune sécrétion d'IFN-γ n'était détectée après

incubation des moCD avec la protéine contrôle Melan-A, assurant la spécificité de la sécrétion d'IFN- γ observée.

La reconnaissance de la protéine recombinante ESO apprêtée par les cellules dendritiques conforte l'idée que ces lignées T CD4⁺ générées *in vitro* à partir de lymphocytes conventionnels naïfs puissent avoir une relevance physiologique en terme d'activité anti-tumorale *in vivo*.

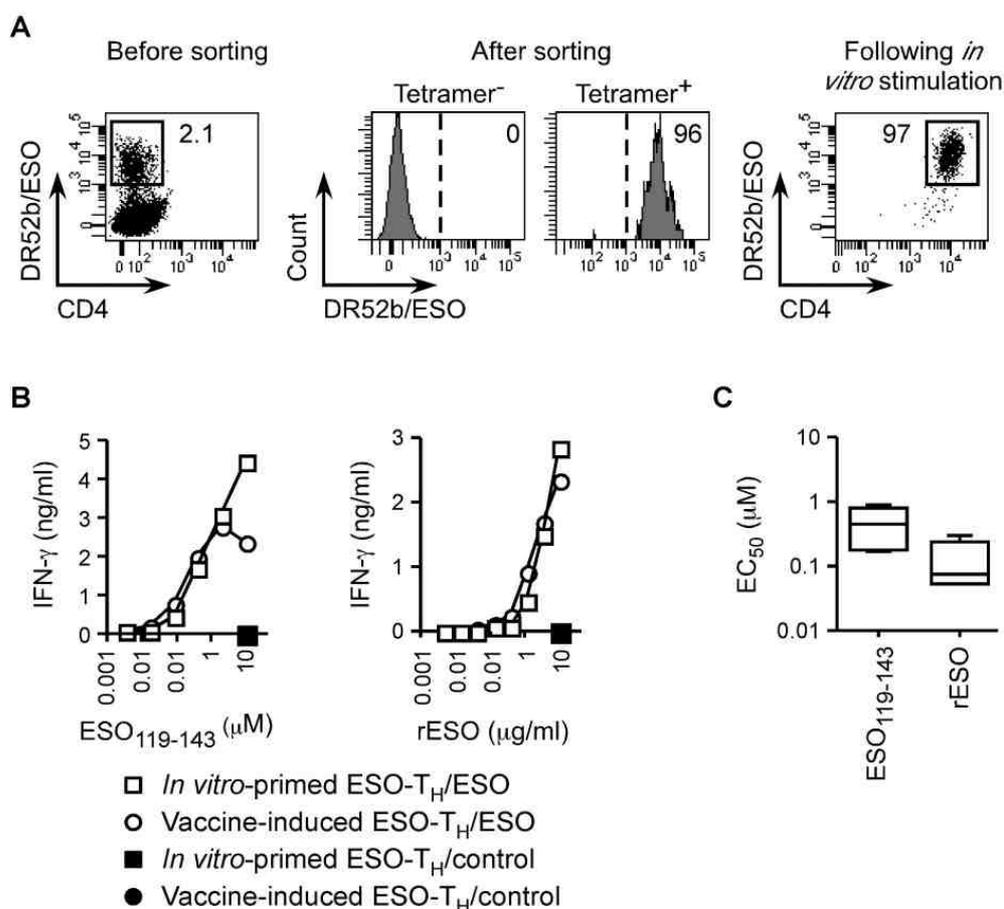


Figure 12. Obtention de lignées de LT CD4⁺ spécifiques de l'épitope DR52b/ESO119-143 et caractérisation de leur avidité fonctionnelle.

(A) Après stimulation *in vitro* les lignées T CD4⁺ spécifiques d'ESO obtenues (marquage par le tétramère DR52b/ESO119-143 cytogramme de gauche) ont été triées par cytométrie en flux et multipliées *in vitro* en présence de PHA (mitogène). La pureté du tri a été vérifiée avant la phase de multiplication (histogramme du milieu), puis après (cytogramme de droite). (B, C) L'avidité fonctionnelle des lignées obtenues envers l'antigène tumoral NY-ESO-1 a été évaluée par dosage ELISA d'IFN- γ dans le surnageant de culture à 24h après incubation en présence d'une part de B-EBV DR52b+ et de dilutions en série du peptide NY-ESO-1 119-143 (graphique de gauche), et d'autre part en présence de la protéine recombinante ESO après apprêtement par des cellules dendritiques (graphe de droite). Le peptide ESO1-20 (graphe de gauche) et la protéine Melan-A (graphe de droite) ont servi comme contrôles négatifs. Un exemple des résultats obtenus pour une lignée issue d'un donneur sain (symbole carré) comparativement à la lignée T CD4⁺ C1E4 obtenue par vaccination d'un patient (symbole rond). Les résultats des lignées issues de l'ensemble des donneurs testés (n=6) sont représentés en C sous forme de EC₅₀, c'est-à-dire la concentration de peptide ou de protéine correspondant à la moitié de la sécrétion maximale d'IFN- γ .

4.4.2 UTILISATION FREQUENTE DU V β 2 PAR LES LT CD4⁺ ESO/TETRAMERE+ OBTENUS PAR PRIMING *IN VITRO*

Mon équipe d'accueil a précédemment montré que chez les patients vaccinés avec la protéine recombinante ESO, les populations de cellules T CD4⁺ spécifiques de l'épitope DR52b/ESO119-143 utilisent fréquemment le segment variable de la chaîne β du TCR V β 2 (91). Afin de comparer le répertoire TCR des LT CD4⁺ ESO/tétramère⁺ obtenus par priming *in vitro* à celui élicité *in vivo* par vaccination, nous avons associé le marquage tétramère des cultures, obtenues par priming *in vitro* à J12, à un marquage par un anticorps anti-V β 2 (Figure 13).

Tandis que le pourcentage de LT CD4⁺ V β 2⁺ observé parmi les LT CD4⁺ totaux dans les cultures allait de 6 à 11,8% avec une moyenne de 9,2% \pm 2, le pourcentage de T CD4⁺ V β 2⁺ dans la population ESO/tétramère⁺ allait de 10,9 à 82% avec une moyenne de 45,7% \pm 25,6. A titre comparatif, la fréquence des LT CD4⁺ V β 2⁺ parmi les LT CD4⁺ ESO/tétramère⁺ dans les cultures des patients vaccinés allait de 25 à 65% avec une moyenne de 40,6% (82).

En conclusion, ces expériences montrent que les lignées ESO/tétramère⁺ obtenues par priming *in vitro* utilisent fréquemment V β 2, à une fréquence comparable aux lymphocytes spécifiques d'ESO induits par vaccination.

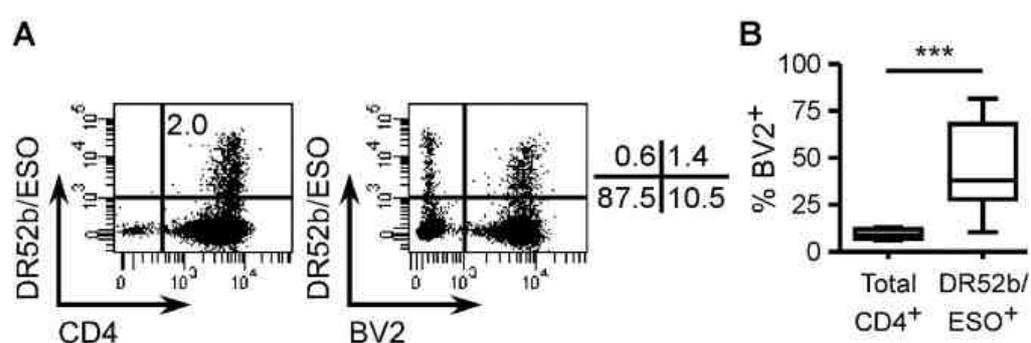


Figure 13. Analyse de la fréquence des LT CD4⁺ V β 2⁺ parmi les cellules ESO/tétramère⁺.

Les cultures de LT CD4⁺ naïfs de donneurs sains stimulés *in vitro* avec le peptide ESO119-143 ont été marquées avec le tétramère DR52b/ESO119-143 et avec les anticorps anti-CD4 et anti-V β 2. **(A)** Exemple de cytogrammes montrant le marquage pour un donneur. **(B)** Graphique récapitulatif montrant le pourcentage de cellules V β 2⁺, au sein des LT CD4⁺ totaux dans la culture puis dans le compartiment des cellules ESO/tétramère⁺, n=11. L'analyse statistique a utilisé le test apparié de Wilcoxon (moyenne \pm DS) (***, p<0,001).

4.4.3 SECRETION D'IL-2 ET DE CYTOKINES ASSOCIEES AU PROFIL FONCTIONNEL TH1

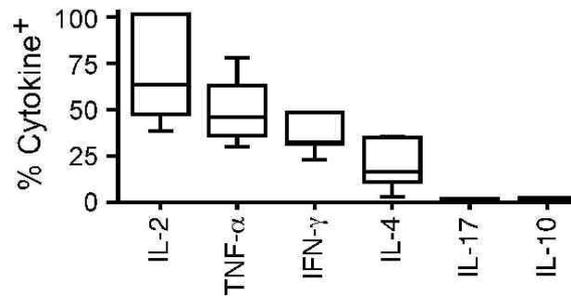
Afin de compléter l'évaluation fonctionnelle des lignées T CD4⁺ spécifiques d'ESO, nous avons réalisé un marquage cytokinique intracellulaire après une restimulation *in vitro*. Nous avons montré que les lignées obtenues dans notre système de priming sécrètent de l'IL-2. Cette production autocrine d'IL2 leur permettrait d'assurer leur prolifération et leur survie (Figure 14A).

Les cytokines associées à un profil TH1 IFN- γ et TNF- α sont également secrétées, dans une proportion moindre mais qui reste plus importante que la sécrétion de cytokines associées à un profil TH2 tel que l'IL-4. Au contraire nous n'avons pas retrouvé de sécrétion ni d'IL10 (associé à un profil Tr1), ni d'IL-17 (associé à un profil TH17) (Figure 14A).

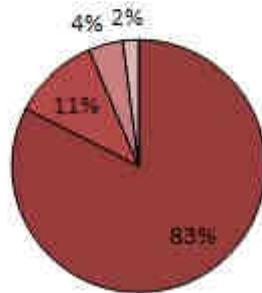
Les LT CD4⁺ spécifiques sécrétant de l'IFN- γ sont majoritairement polyfonctionnels (moyenne : 83%, SD : 7) sécrétant simultanément de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'IL-2 (figure 14B et C). Les pourcentages de chaque sous-population fonctionnelle correspondent à la moyenne effectuée à partir des lignées T CD4⁺ ESO/tétramère⁺ issues de 7 donneurs sains. Ce profil polyfonctionnel a été associé à une meilleure efficacité de la réponse TH1 dans des modèles d'infections intracellulaires (95)(96)(97).

Les lignées T CD4⁺ spécifiques d'ESO issues du priming *in vitro* de LT CD4⁺ conventionnelles naïves isolées du sang périphérique de donneurs sains en présence d'IL-2 présentent donc un profil cytokinique compatible avec une activité fonctionnelle de type TH1.

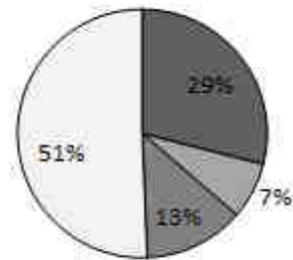
A



B



C



■ % IFN-γ+ TNF-α+ IL-2+
 ■ % IFN-γ+ TNF-α+ IL2-
 ■ %IFN-γ- TNF-α+ IL-2+
 ■ %IFN-γ- TNF-α+ IL-2-
■ % IFN-γ+ TNF-α- IL-2+
 ■ %IFN-γ+ TNF-α- IL-2-
 ■ %IFN-γ- TNF-α- IL-2+
 ■ %IFN-γ- TNF-α- IL-2-

Figure 14. Profil cytokinique des lignées spécifiques d'ESO générées à partir de LT CD4⁺ conventionnels naïfs après priming *in vitro*.

(A) Les lignées LT CD4⁺ ESO spécifiques isolées après tri cellulaire (figure 12A) (n=7) ont été restimulées *in vitro* pendant 4 h en présence du peptide immuno-dominant ESO119-143 afin d'évaluer par marquage intra-cellulaire leur sécrétion cytokinique. (B, C) les cellules T CD4⁺ ESO/tétramères⁺ peuvent être subdivisées en LT IFN-γ⁺ (B) et IFN-γ⁻ (C). La majorité des LT IFN-γ⁺ sécrète conjointement du TNF-α (B). La moitié des LT CD4⁺ IFN-γ⁻ ne sécrète aucune de ces cytokines.

4.4.4 LES LIGNÉES T CD4⁺ ESO/TETRAMERE+ NE RECONNAISSENT PAS DE CELLULES DENDRITIQUES ALLOGENIQUES

Etant donné le tri sélectif des lignées obtenues après priming *in vitro* par cytométrie en flux grâce au marquage par tétramère DR52b/119-143, le potentiel alloréactif des lignées est supposé être négligeable. En effet, le tétramère lie spécifiquement les cellules reconnaissant l'allèle HLA-DR52b exclusivement en présence du peptide ESO119-143.

Afin de vérifier cette supposition nous avons donc stimulé les lignées spécifiques d'ESO en présence des moCD obtenues à partir des monocytes de 8 donneurs sains DR52b⁺, incubées ou non en présence du peptide ESO119-143. Le dosage de la sécrétion d'IFN- γ dans le surnageant de culture à 24h par ELISA met en évidence la reconnaissance exclusive du complexe DR52b/ESO119-143.

Aucune alloréactivité n'a été mise en évidence lors de ce test (Figure 15).

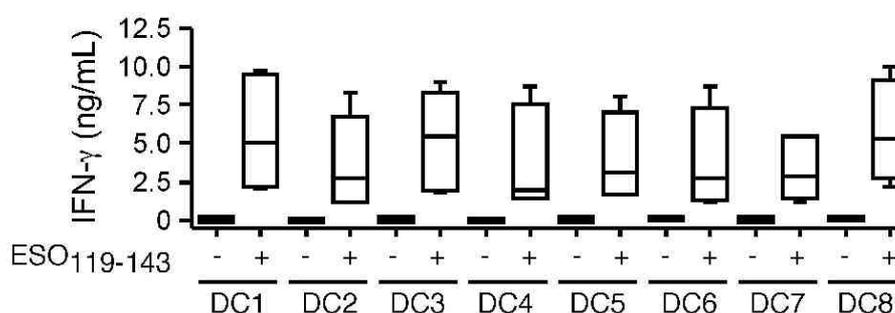


Figure 15. Evaluation de l'alloréactivité des lignées spécifiques d'ESO générées à partir de LT CD4⁺ conventionnels naïfs après priming *in vitro*.

Les lignées T CD4⁺ ESO spécifiques (n=6) ont été incubées en présence de CD issues de 8 donneurs sains DR52b⁺, en absence ou au contraire en présence du peptide ESO119-143, afin d'évaluer la reconnaissance antigénique à travers la sécrétion d'IFN- γ dans le surnageant de 24h par ELISA.

DISCUSSION

Les LT CD4⁺ conventionnels ont un rôle clef dans l'induction d'une réponse immunitaire LT CD8⁺ cytotoxique antitumorale (35), ainsi que dans le maintien de cette réponse. De plus les LT CD4⁺ sont capables, via notamment l'interaction CD40-CD40L de permettre aux CD de stimuler les LT CD8⁺ (98).

Au-delà de ce rôle auxiliaire, de récentes études ont réaffirmé le potentiel thérapeutique des LT CD4⁺ (66), à travers notamment leur capacité à induire directement le rejet tumoral (61).

Cependant, les essais d'immunothérapie antitumorale, notamment le transfert adoptif lymphocytaire s'est initialement limité à la manipulation des LT CD8⁺ en raison de multiples difficultés évoquées en introduction dont l'absence d'outils assez sensibles et spécifiques pour isoler les LT CD4⁺ spécifiques d'un antigène tumoral. Le développement de nouveaux procédés de production des tétramères de classe II, et tout particulièrement l'ajout d'un groupement histidine permettant de sélectionner uniquement les molécules de CMHII chargées avec le peptide d'intérêt, a rendu possible cette étude (82).

Nous nous sommes intéressés aux LT CD4⁺ conventionnels naïfs présents dans le sang périphérique de donneurs sains pour plusieurs raisons. Le microenvironnement tumoral développe de nombreuses stratégies d'immuno-évasion voir d'immuno-subversion difficilement contrôlables qui prennent le dessus sur l'induction d'une réponse immunitaire efficace. Le transfert de cellules immunitaires issues d'un donneur sain se base sur le concept que les cellules injectées n'ont pas été altérées par le microenvironnement tumoral au préalable. Une des principales limites des biothérapies par transfert adoptif cellulaire est la persistance des clones après transfert, qui semble être corrélée au stade de différenciation des cellules injectées (42) (43) (44). L'utilisation de cellules obtenues par la stimulation de précurseurs naïfs et non de cellules mémoires extraites chez de patients cancéreux s'inscrit dans cette démarche. Enfin, le développement d'une banque de lignées lymphocytaires permettrait de proposer un traitement ne nécessitant pas une réponse immunitaire spontanée préalable des patients, d'où l'inclusion d'un plus grand nombre de patients, ainsi qu'un gain de temps. ESO est spécifiquement et fréquemment exprimé dans de nombreux cancers, aussi bien solides qu'hématopoïétiques. La génération de lignées T CD4⁺ spécifiques d'ESO pourrait être utilisée dans ces différents contextes tumoraux. A titre d'exemple, en dehors du mélanome et du cancer de l'ovaire, ESO est également exprimé dans le myélome, tout particulièrement dans les formes avec des anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic (99). De plus, dans une étude s'intéressant aux patients atteints de myélome et

bénéficiant d'une allogreffe de cellules hématopoïétiques, ces derniers développaient une expression médullaire d'ESO (contrairement aux sujets sains) ainsi que des Ac anti-CTA et notamment anti-ESO, suggérant ainsi qu'ESO pourrait constituer une cible de la réponse GvL (100).

Nous avons ainsi dans un premier temps stimulé avec le peptide immunodominant ESO119-143 les LT CD4⁺ naïfs de donneurs sélectionnés sur l'expression du HLA de classe II DR52b. A 12 jours de priming *in vitro*, nous avons évalué la présence et la fréquence des LT CD4⁺ spécifiques d'ESO dans les cultures en utilisant les tétramères DR52b/ESO119-143. Puis, après un tri cellulaire par cytométrie en flux, et une étape de multiplication *in vitro*, nous avons étudié l'avidité fonctionnelle des populations lymphocytaires ainsi obtenues.

Nous obtenons de façon reproductible, à partir de 12 jours de priming *in vitro*, plus de 1% de LT CD4⁺ ESO/tétramère⁺ d'où une estimation de fréquence de précurseur spécifique entre $1/10^5$ et $1/10^6$. On se trouve à la limite de détection de notre tétramère, d'où l'absence de détection des précurseurs lors du marquage *ex vivo*. A l'inverse, aucune réponse spécifique d'ESO119-143 n'a été détectée, à l'issue de 12 jours de priming dans les mêmes conditions de donneurs DR52b⁻. De même, aucune réponse n'était détectée avec le tétramère contrôle DR52b/MP73-92.

En estimant qu'un donneur sain a environ 1×10^{11} LT CD4⁺ naïfs totaux (101), et que le nombre de réarrangements possibles des gènes du TCR pour un individu est d'environ 10^8 (102), nous pouvons donc calculer que chaque population clonale lymphocytaire T (un TCR donné) est constituée d'environ 1000 cellules. La fréquence moyenne d'un précurseur LT CD4⁺ spécifique résultant de ce calcul est d'environ $2/10^6$ pour un épitope pris au hasard et peut aller jusqu'à $1/10^5$ pour certains épitopes.

Si l'on se réfère aux données expérimentales présentes dans la littérature, la fréquence estimée dans notre étude est cohérente avec celles retrouvées pour d'autres spécificités :

Ainsi Novak et al ont estimé la fréquence de précurseurs LT CD4⁺ spécifiques pour divers épitopes, en couplant le marquage par tétramère à celui par CFSE (81). Ils ont retrouvé une fréquence de précurseurs LT CD4⁺ conventionnels (après exclusion des LTreg CD4⁺ CD25^{high}), présents dans le sang périphérique de donneurs sains, spécifiques d'antigènes du soi tel que GAD65 (glutamic acid decarboxylase 65), associé au diabète type 1, de l'ordre de $1/500,000$. La fréquence des précurseurs spécifiques de l'antigène de différenciation mélanocytaire tyrosinase TYR450-462 est estimée entre

1/55,000 et 1/240,000. Celle des précurseurs spécifiques de d'ESO 120-131 est de l'ordre de $1/10^5$ (103).

La fréquence de précurseurs T CD4⁺ spécifiques d'antigènes exogènes tels que les pathogènes viraux est comparable. Ainsi, une autre étude s'intéressant à la fréquence des LT CD4⁺ naïfs (CD45RA^{high}) spécifiques de DRB1*04-(HA)306–319 (peptide issu de la protéine hémagglutinine du virus de la grippe) a retrouvé une fréquence moyenne des précurseurs LT CD4⁺ de $6/10^6$ LT CD4⁺ (104).

Dans une étude récente, la fréquence estimée des précurseurs LT CD4⁺ naïfs spécifiques de l'anthrax (*Bacillus anthracis*) est de $20/10^6$, environ $10/10^6$ en s'intéressant exclusivement à l'épitope immunodominant. Cette étude a été réalisée à partir de donneurs sains, donc n'ayant jamais été exposés à cette infection létale. Cette fréquence a été comparée à celle retrouvée chez des militaires vaccinés chez lesquels la fréquence des LT CD4⁺ spécifiques était deux fois plus importante, respectant les mêmes épitopes immunodominants (105).

L'antigène tumoral ESO se distingue des antigènes du soi, des antigènes tumoraux mélanocytaires et des antigènes viraux par sa restriction d'expression aux cellules testiculaires de l'adulte sain (spermatogonie) et aux cellules tumorales. La fréquence que l'on observe semble donc être la fréquence moyenne vis-à-vis de nombreux antigènes, potentiellement liée au hasard des réarrangements de TCR. Nous ne pouvons cependant pas totalement exclure que le peptide ESO119-143 active une immunité croisée vis-vis d'un autre antigène, bien que cela n'ait pour le moment pas été mis en évidence.

A titre comparatif, dans le sang périphérique de donneurs sains, la fréquence des précurseurs LT CD8⁺ spécifiques d'un antigène, aussi bien du soi (MART-1 26-35), que viraux (HIV-1 : Gag p17(77-85), HCV : NS3 (1406-1415), Core (132-140), CMV : pp65 (495-503)) ou encore tumoral (NY-ESO-1(157-165)), est estimée entre 0,6 et $500/1 \times 10^6$ LT CD8⁺ (106). La fréquence de précurseurs des LT CD8⁺ pourrait donc être jusqu'à 50 fois supérieure à celles des précurseurs naïfs LT CD4⁺. Il avait déjà été observé que la réponse T CD8⁺ impliquait beaucoup plus de LT CD8⁺ que de LT CD4⁺ (107) ce qui avait été attribué à un mode de priming différent : les LT CD4⁺ nécessitant une exposition antigénique continue contrairement aux LT CD8⁺ qui peuvent se maintenir même sans la présence de l'antigène (108) (109). Une autre explication, non exclusive, pourrait donc être la fréquence des précurseurs spécifiques d'un antigène.

Dans l'optique d'une application de ce type de système de priming *in vitro* à une thérapie par transfert adoptif, un autre point de réflexion est le nombre de lymphocytes obtenus à l'issue du priming. En se référant à divers protocoles de transferts cellulaires publiés (110), les doses de lymphocytes injectées aux patients allaient de 10^{11} dans les premières études de TIL (32), à 10^9 lymphocytes dans les stratégies de transfert plus récentes (sélection exclusive de clones spécifiques sécrétant de l'FN- γ , ou stratégies de culture de durée raccourcie avant réinjection) (110) ; ceci implique un facteur d'expansion important. A titre d'exemple, dans l'étude de Hunder et al. citée précédemment (66), les lymphocytes spécifiques d'ESO issus du sang périphérique ont été multipliés d'un facteur 3000-5000. Schématiquement ces divers protocoles aboutissent à une population d'intérêt d'environ 50×10^6 cellules, qui est ensuite intensivement multipliée (au moins d'un facteur 1000). Dans notre étude, nous partons d'un nombre de LT CD4⁺ ESO/tétramère⁺ allant d'environ 20000 à 70000 à l'issue du tri par cytométrie en flux. Notre protocole permet l'obtention d'une population lymphocytaire d'environ 10^6 cellules à l'issue du priming, du tri et d'une expansion mitogénique. Si l'on compare ces protocoles, les études précédentes utilisent des doses plus importantes de PHA lors de la phase de multiplication *in vitro*. Il est donc raisonnable de penser que notre système permettrait d'allier une haute spécificité des lignées TH obtenues tout en restant applicable en clinique. De plus, l'obtention d'une quantité importante de LT CD4⁺ spécifiques n'est pas forcément une nécessité pour avoir une bonne efficacité. Dans un modèle murin, Quezada et al. , et Xie et al, démontrent une efficacité en transférant un petit nombre de LT naïfs spécifiques qui prolifèrent, se différencient *in vivo*, et entraînent un rejet tumoral (61) (62).

Dans un second temps, afin d'évaluer la relevance physiologique des lignées cellulaires obtenues après priming *in vitro* nous avons réalisé un test de titration peptidique et protéique. Le peptide NY-ESO-1, ainsi que la protéine recombinante rESO apprêtée par des moCD sont reconnus par les lignées LT CD4⁺ ESO/tétramère⁺, avec une avidité fonctionnelle comparable à un clone de référence, issu d'une patiente vaccinée par rESO (111). En l'absence de clones issus de patients ayant rejeté spontanément leur tumeur ESO⁺, les clones issus d'une immunisation active par vaccination constituent le meilleur témoin positif dans l'évaluation de la relevance physiologique de nos lignées ESO/tétramères⁺. La comparaison du répertoire Vbeta entre nos lignées obtenues et celles issues de patients cancéreux vaccinés avec ESO retrouve une proportion comparable d'expression du Vbeta2.

La reconnaissance de l'antigène ESO dans le test de titration vérifie la spécificité ainsi que l'avidité fonctionnelle de nos lignées LT CD4⁺ ESO/tétramère⁺.

Plusieurs études s'intéressant à l'avidité fonctionnelle d'une réponse immunitaire polyclonale ont soulevé la question de la détection des LT CD4⁺ spécifiques d'un antigène par les tétramères CMHII/peptide, en fonction de leur affinité fonctionnelle et de leur degré d'activation. Chez la souris, Sabatino et al. ont observé lors d'une réponse immunitaire LT CD4⁺ polyclonale vis-à-vis d'un antigène du soi (MOG : myelin oligodendrocyte glycoprotein, protéine de la myéline) ou d'un antigène infectieux (LCMV : lymphocytic choriomeningitis virus) des LT CD4⁺ de faible affinité, non détectés par les tétramères, bien qu'ils soient capables d'induire une réponse immunitaire cliniquement détectable (112). Bien que les tétramères utilisés dans cette étude diffèrent de celui que nous avons utilisé dans ce projet, il est possible que les tétramères HLAII se lient de façon préférentielle aux LT CD4⁺ ayant une forte affinité fonctionnelle. Cette question nécessiterait chez l'humain d'autres études comparatives portant sur différents types antigènes (113).

L'analyse du profil cytokinique des lignées obtenues montre une forte sécrétion d'IL2, ainsi qu'une sécrétion d'IFN- γ dans une proportion moindre. Ces cellules IFN- γ ⁺ sont à plus de 80% polyfonctionnelles, c'est-à-dire qu'elles sécrètent également du TNF- α et de l'IL-2. Les LT polyfonctionnels ont été étudiés dans plusieurs modèles d'infections virales chroniques. Différents profils de sécrétion cytokinique semblent être directement impliqués dans l'équilibre qui se construit entre le virus et le système immunitaire (97). Schématiquement cet équilibre résulte en 4 scénarios possibles : la protection lors d'une exposition au virus, la clairance du virus, une infection chronique contrôlée par le système immunitaire avec une charge virale faible, ou au contraire une infection virale avec charge virale élevée. Dans l'infection à VIH, les patients dits « non progressseurs », chez lesquels la maladie progresse plus lentement, la proportion de LT CD8⁺ polyfonctionnels est plus importante que chez les sujets dits « progressseurs » : le pourcentage de LT CD8⁺ CD107a⁺, IFN- γ ⁺, MIP-1 β ⁺, IL-2⁺ et TNF- α ⁺ est inversement corrélé à la charge virale (114). Le rôle protecteur des LT CD4⁺ polyfonctionnels a été établi dans différents modèles d'infections intra-cellulaires : chez l'humain infecté par *Mycobacterium tuberculosis* le profil IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺ IL-2⁺ des LT CD4⁺ circulants est associé à une infection latente, tandis qu'une prépondérance d'un profil monofonctionnel TNF- α ⁺ est associé à une infection active (96). Chez la souris,

la protection vaccinale vis-à-vis de *Leishmania major* est corrélée à l'induction de LT CD4⁺ polyfonctionnels. L'IFN- γ et le TNF- α sont deux cytokines effectrices dont la synergie améliore la lyse de pathogènes intracellulaires (115). L'IL-2 ne semble pas avoir d'activité effectrice directe mais a un rôle clef dans la multiplication et la survie des LT, permettant le maintien d'une population de LT spécifiques et assurant ainsi une protection à long terme. Nous avons donc généré dans notre système de priming des lignées LT CD4⁺ ESO/tétramère⁺ dont les caractéristiques fonctionnelles sont en faveur d'une bonne efficacité potentielle *in vivo*.

Dans notre système de priming *in vitro* nous avons également généré de façon reproductible des lignées T CD4⁺ ESO/tétramère⁺ à partir des LT CD4⁺ mémoires centraux (CD45RA⁻ CCR7⁺) présents dans le sang périphérique de donneurs adultes sains. Ce résultat est surprenant, étant donnée l'expression restreinte chez l'adulte sain de l'antigène tumoral NY-ESO-1 aux testicules (au niveau des spermatogonies), qui sont un site immunologiquement privilégié. Ainsi, l'adulte sain ne développe pas de réponses immunitaires spontanées sains vis-à-vis d'ESO, comme l'illustre l'absence d'anticorps spécifiques d'ESO (116). De plus, les lignées obtenues à partir des mémoires centrales présentent une avidité fonctionnelle similaire aux LT CD4⁺ naïves des mêmes donneurs sains (n=4, données non montrées), excluant une fixation non spécifique du tétramère.

La distinction entre les différentes populations LT mémoires repose notamment sur les travaux de Sallusto et al (117) : les LT mémoires sont subdivisés en deux populations ; une population dite mémoire centrale résidant essentiellement dans les organes lymphoïdes secondaires, d'où l'expression de marqueurs de surface tels que le CCR7, ou encore le CD62L ; et une population dite mémoire effectrice résidant plutôt en périphérie (sang, rate, tissus non lymphoïdes), prête à intervenir rapidement en cas de réponse immunitaire secondaire, grâce à leurs fonctions effectrices (sécrétion cytokinique, lyse). Les cellules centrales mémoires ont une forte capacité de prolifération et constitueraient une réserve de précurseurs capables de se différencier en cellules effectrices après stimulation antigénique.

En dehors d'une expression ectopique non connue d'ESO, d'une réactivité croisée de NY-ESO-1 avec un autre épitope, l'hypothèse restante pour expliquer la présence de précurseurs mémoires centraux spécifiques d'ESO est celle d'une expansion homéostatique de cellules naïves. Les LT CD4⁺ triés de phénotype CD45RA⁻ CCR7⁺ n'auraient alors pas subi un priming *in vivo* avec l'antigène ESO, expliquant leur présence chez des donneurs sains. Cette

hypothèse se base sur la description, aussi bien chez l'animal que chez l'homme, dans des contextes non physiologiques de lymphopénie (irradiation, déficit génétique lymphocytaire T), de cellules de phénotype mémoire issues d'une expansion homéostatique et ayant un répertoire antigénique polyclonal (118).

Ces études concernent essentiellement des modèles murins lymphopéniques (irradiation ou déficit génétique : RAG^{-/-}) bénéficiant du transfert adoptif lymphocytaire de souris exprimant un TCR transgénique. L'hypothèse avancée pour la présence de ces cellules est l'absence de compétition pour des facteurs homéostatiques tels que l'IL-7 (pour la souris) ou des ligands TCR de faible affinité. D'autres cytokines seraient également impliqués dans leur prolifération (119) (120) (121). La prolifération de ces cellules dépendrait de la présence de complexe CMH-peptide du soi, mais ne dépendrait pas des signaux de co-stimulation (CD28/B7, CD40L-CD40, 4-1BB/4-1BBL) (122). On retrouve également chez la souris la présence, en néonatal (123), de cellules CD44^{high} dépourvues en marqueurs d'activation tels que le CD69 ou le CD25. Le profil génétique de ces cellules se distingue de celui des cellules mémoires issues du priming antigénique par un niveau d'expression moindre de gènes associés à la progression du cycle cellulaire. L'étude du répertoire polyclonal LT CD8⁺ par tétramère, chez des souris non transgéniques, retrouve des cellules de phénotype mémoire CD44^{high} spécifiques d'antigènes auxquels la souris n'a jamais été exposée (virus de la vaccine, HSV1 et ovalbumine) (124). L'expérience est renouvelée chez des souris dites « germ free » (littéralement sans germe) qui sont des souris ayant toujours grandi dans un environnement stérile. A nouveau, la population LT CD8⁺ naïve comporte à la fois des LT CD8⁺ CD44^{low} et des LT CD8⁺ CD44^{high}. Ces souris n'ont pas de flore digestive développée cultivable donc l'explication de cross-réactivité partagés par d'autres germes pour expliquer ces CD44^{high} est peu probable. Ces cellules CD44^{high} partagent l'expression de plusieurs marqueurs phénotypiques avec les cellules mémoires conventionnelles tels que le LFA1, Ly6C, le CD122 et se distinguent par une diminution d'expression de marqueurs d'activation tels que le CD25 et le CD69. Enfin elles expriment très peu d'alpha-4-intégrine, contrairement aux LT CD8⁺ effecteurs stimulés par l'antigène. Sur un plan fonctionnel, ces cellules ont une capacité de prolifération, de sécrétion des cytokines effectrices (IFN- γ) supérieure aux cellules naïves CD44^{low}. Ces capacités fonctionnelles sont démontrées par la protection apportée par le transfert adoptif de ces cellules, en cas d'exposition à l'antigène infectieux dont elles sont spécifiques (125).

L'ensemble de ces expériences menées chez la souris permet d'émettre l'hypothèse d'un compartiment lymphocytaire exprimant des marqueurs phénotypiques de cellules mémoires au sein des cellules naïves LT conventionnelles. L'avantage physiologique pour les mammifères serait l'induction d'une réponse adaptative plus précoce. En effet, ces cellules semblent partager les propriétés fonctionnelles des cellules mémoires : prolifération rapide lors de la reconnaissance antigénique, migration en de nombreux sites en dehors des tissus lymphoïdes, sécrétion de cytokines et activité de lyse accrue. En situation de lymphopénie, l'organisme étant plus vulnérable, ce compartiment bénéficierait d'une forte expansion homéostatique, le rendant plus facilement détectable qu'en condition physiologique.

L'étude des LT CD4⁺ présents dans le sang périphérique de l'adulte sain a retrouvé la présence de LT CD4⁺ de phénotype mémoire (CD45RA⁻), spécifiques d'antigènes infectieux (*Bacillus anthracis*) vis-à-vis duquel un adulte sain n'a a priori jamais été exposé (105).

De plus, le compartiment LT CD4⁺ mémoire central pourrait être subdivisé en sous-compartiments en fonction du profil fonctionnel des cellules (126). En effet, l'analyse des LT CD4⁺ mémoires centraux a retrouvé une hétérogénéité de profil fonctionnel, avec des CM pre-TH0, pre-TH1 et pre-TH2. Les populations pre-TH1 et pre-TH2 produisent respectivement de faibles quantités d'IFN- γ et d'IL-4 comparativement aux cellules effectrices mémoires CXCR3⁺ (TH1) et CCR4⁺ (TH2). Ces lymphocytes pré-TH1 et pré-TH2 se différencient spontanément en TH1 et TH2 en réponse aux cytokines d'homéostasie IL-7 et IL-15, et ce indépendamment des cytokines polarisantes nécessaires aux cellules naïves. Les cellules mémoires centrales « pré-TH0 » (CXCR3⁻ CCR4⁻ CXCR5⁺) peuvent se différencier en cellules effectrices TH1 ou TH2 après stimulation via leur TCR en présence de cytokines polarisantes.

Enfin, il a été démontré que des CD CD11c⁺, activées en présence de TSLP (thymic stromal lymphopoietin) étaient capables de stimuler la multiplication homéostatique de LT CD4⁺ autologues naïfs qui adoptent alors et maintiennent un phénotype de cellules centrales mémoires (CD45RA⁻ CD45RO⁺ CD25^{low} CD62L⁺ CCR7⁺), ainsi qu'un répertoire polyclonale (127). Cette population de phénotype CM est capable lors d'une stimulation secondaire en présence de cytokines de se polariser en TH1, TH2. La capacité de prolifération en réponse à une stimulation TCR (mimée par un anti-CD3) est accrue dans cette population cellulaire par rapport aux cellules naïves. Les CD cultivées avec TSLP ont une expression accrue de AIRE (autoimmune regulator : facteur transcriptionnel impliqué dans la tolérance centrale

thymique), HLA-DR, CD80, CD86. La capacité unique des CD activées en présence de TSLP à induire la multiplication homéostatique des LT CD4⁺ naïfs autologues serait directement liée aux propriétés de la TSLP qui stimule l'expression de complexes HLA-peptide du soi, des molécules de costimulation et qui favorise également la formation de conjugués CD-LT stables, ainsi que la survie des CD.

Ainsi, les précurseurs de phénotype mémoire centrale spécifiques d'ESO que nous observons dans notre étude résulteraient de l'expansion homéostatique du compartiment des LT CD4⁺ conventionnel naïf, qui conserve le répertoire polyclonal de ces dernières. La confirmation de cette hypothèse nécessiterait cependant d'autres études approfondies chez l'humain, en s'intéressant à différents antigènes du soi ainsi qu'à des antigènes dérivés des pathogènes.

Au contraire, nous n'avons pas détecté de LT CD4⁺ spécifiques d'ESO après priming *in vitro* des cellules T régulatrices naïves ou mémoires.

Le rôle physiologique des LTreg est la maintenance de la tolérance au soi en périphérie. Ainsi, leur absence s'accompagne chez la souris d'un large spectre de maladies auto-immunes. Ils sont cependant également impliqués dans le contrôle des autres réponses immunitaires, qu'elles soient dirigées vers des agents infectieux, des allergènes, ou des allo-antigènes. Dans le cadre des tumeurs solides humaines, la présence des LT CD4⁺ régulateurs a été mise en évidence au niveau de la tumeur, des ganglions de drainage, ainsi que dans le sang périphérique. Leur présence est corrélée à un mauvais pronostic (28) (29). Les LT CD4⁺ régulateurs sont divisés en deux catégories : les LT CD4⁺ dits naturels, dérivant du thymus, et les LTreg dits induits, qui correspondent à des LT CD4⁺ ayant acquis secondairement en périphérie des propriétés immunosuppressives suite à une présentation antigénique dans un contexte de stimulation particulier (128). Dans le cadre de la pathologie tumorale, leur origine ainsi que leur répertoire antigénique restent encore débattus. En effet, cette réponse régulatrice peut être soit induite non spécifiquement par l'environnement tumoral ou résulter de la stimulation de LTreg spécifiques d'antigènes exprimés par la tumeur. Cette dernière exprime essentiellement des antigènes du soi partagés par les cellules normales, mais également des néo-antigènes tumoraux. Les LTreg semblent avoir un répertoire polyclonal spécifique du soi (129) (130) (131). En effet, lors de la sélection centrale thymique des LT, la génération de LTreg naturels résulterait, comparativement aux LT conventionnels, d'une affinité accrue pour les

antigènes du soi (132) (133). L'expression thymique d'ESO reste controversé (83); L'ARNm d'ESO a été détecté dans les cellules épithéliales médullaires thymiques (134). Chez les patients développant une tumeur exprimant ESO, l'existence ou non de LTreg CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ spécifiques d'ESO reste débattue (135) (136).

Les tétramères de classe II constituent un nouvel outil intéressant pour étudier la question de la fréquence des précurseurs spécifiques d'antigènes tumoraux au sein des populations LTreg. En effet, les LTreg sont, entre autres, caractérisés par leur quasi absence de production de cytokines ainsi qu'une faible capacité d'expansion *in vitro*. Les tétramères de classe II semblent donc être des outils de détection des Treg plus adaptés que les tests fonctionnels basés sur la sécrétion de cytokines telles que l'IFN- γ en présence d'une reconnaissance antigénique. Les résultats de notre étude sont donc à ces égards intéressants, mais doivent être considérés avec prudence en tenant compte des limites de notre système. Tout d'abord nous avons estimé approximativement qu'il était nécessaire de partir d'environ 5×10^6 cellules naïves conventionnelles pour isoler de façon régulière et efficace une population spécifique d'ESO à l'issue des 12 jours de priming *in vitro*. Ceci s'explique par la faible fréquence initiale des précurseurs avant stimulation, que nous avons estimé allant de $1/10^5$ à $1/10^6$. Il faudrait donc partir du même nombre de LTreg, ce qui est expérimentalement difficile à réaliser. De plus, les LTreg se distinguent des LT dits conventionnels par une capacité de prolifération *in vitro* moindre. Cet écueil technique concerne plus précisément les MTreg, les NTreg ayant une bonne capacité de prolifération après stimulation en présence de l'IL-2 (130).

Dans l'optique d'une constitution d'une banque de lignées lymphocytaires allogéniques, nous avons ensuite testé l'alloréactivité de nos lignées. Un des risques serait l'induction d'une maladie du greffon contre l'hôte. Cette complication a été décrite dans le cadre des greffes de moelle osseuse allogénique. La maladie du greffon contre l'hôte survient lorsque les lymphocytes contenus dans le greffon attaquent les tissus du receveur qu'ils perçoivent comme étranger. Le receveur, en état de déficit immunitaire, ne peut pas réagir à ces agressions. Etant donnée la spécificité de notre tétramère DR52b/ESO119-143 servant d'outil de détection et de tri dans notre protocole, l'alloréactivité des lignées lymphocytaires ESO/ tétramère⁺ obtenues est supposée être minime. Nous n'avons pas détecté de reconnaissance de CD DR52b⁺ allogéniques par les lignées issues du priming testées. L'idée de constituer une banque de lignées LT CD4⁺ spécifiques à

partir du sang périphérique de donneurs sains s'inspire de ce qui est déjà utilisé en clinique dans le cadre des syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation. Jusqu'à présent, les essais cliniques menés dans ce cadre, basés sur le transfert de lignées LT CD8⁺ et LT CD4⁺ spécifiques d'EBV générés à partir du sang périphérique de donneurs sains, n'ont pas déploré d'effet secondaire notable résultant d'une alloréactivité (137). De plus, contrairement aux patients bénéficiant d'une greffe de moelle osseuse allogénique, les patients traités pour une tumeur solide ne subissent pas de traitement lympho- voire myéloablatif ; par conséquent le risque principal d'une alloréactivité de nos lignées serait le rejet de ces dernières par le système immunitaire de l'hôte. L'utilisation des lignées lymphocytaires obtenues pourrait tout de même être envisagée en association avec un protocole de conditionnement adapté par lymphodéplétion, permettant de créer une fenêtre thérapeutique , ou par l'utilisation de biothérapie permettant la rétention des LT dans les ganglions (FTY720 : agoniste des récepteurs de la sphingosine 1-phosphate(138).

En conclusion, les lignées T CD4⁺ ESO/tétramère⁺ ne semblent pas présenter une forte alloréactivité, cependant leur utilisation à visée clinique nécessiterait une vérification vis-à-vis de chaque patient receveur avant le transfert.

Afin de pouvoir couvrir le répertoire HLA d'une majorité de patients, nous avons testé notre système de priming sur un allèle HLA-DR ne co-exprimant pas le HLA-DR52b. La stimulation, dans des conditions identiques, des LT CD4⁺ naïfs d'un donneur sain DR7+ conduit à la détection et au tri d'une population ESO/tétramère⁺ (en utilisant le tétramère DR7/ESO119-143), dans les mêmes proportions que celles retrouvées chez les donneurs DR52b. La majorité des individus pourrait bénéficier d'un traitement par transfert adoptif cellulaire à partir d'une banque de lignées cellulaires restreintes aux allèles les plus fréquents.

CONCLUSION

En conclusion, l'utilisation d'un tétramère HLA classe II permet, à l'issue d'une étape de priming *in vitro*, la mise en évidence et la séparation de précurseurs spécifiques d'ESO parmi les LT CD4⁺ naïfs d'individus sains, en dehors d'un développement tumoral, et pourrait servir dans les stratégies de transferts adoptifs. L'application clinique, à terme, de ce type de plate-forme serait alors la possibilité de générer une banque de lignées LT CD4⁺ spécifiques de l'antigène tumoral. Ce type de traitement pourrait être proposé dans le cadre du traitement de tumeurs solides (ex. cancer épithéliale de l'ovaire, mélanome) ou hématopoiétiques (ex. myélome) exprimant l'antigène tumoral (ESO).

D'autre part, ce système de priming *in vitro* pourrait également servir de plate-forme préclinique. A titre d'exemple, il pourrait permettre une étude comparative de divers adjuvants utilisés dans des protocoles vaccinaux tels que les ligands des récepteurs toll-like (TLR). Les TLR sont exprimés chez l'humain principalement par les cellules immunitaires et épithéliales. La découverte de leur rôle de transmission des « signaux de danger » induits par les agents infectieux, mis en évidence ces dernières années, a ouvert la voie à de nouvelles approches thérapeutiques. L'expression des TLR n'étant pas forcément la même chez l'animal et chez l'homme, la possibilité de tester leur efficacité relative dans un système de priming *in vitro* chez l'homme pourrait accélérer considérablement leur utilisation clinique.

Enfin, ce système permettrait d'explorer des questions immunologiques plus fondamentales. Ainsi, l'étude des précurseurs LT CD4⁺ de phénotype mémoire centrale dans différents systèmes antigéniques permettrait d'approfondir notre hypothèse d'un compartiment naïf polyclonal de phénotype mémoire résultant d'une expansion homéostatique. Cette étude permettrait d'évaluer conjointement la relevance physiologique de ces précurseurs.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004 août;21(2):137-48.
2. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv. Immunol.* 2006;90:1-50.
3. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998 juin 23;95(13):7556-61.
4. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001 avr 26;410(6832):1107-11.
5. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 2007 déc 6;450(7171):903-7.
6. Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996 avr 1;77(7):1303-10.
7. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003 janv 16;348(3):203-13.
8. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, et al. CD8 $^{+}$ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998 août 15;58(16):3491-4.
9. Schumacher K, Haensch W, Röefzaad C, Schlag PM. Prognostic Significance of Activated CD8 $^{+}$ T Cell Infiltrations within Esophageal Carcinomas. *Cancer Res*. 2001 mai 15;61(10):3932-6.
10. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006 sept 29;313(5795):1960-4.
11. Darnell RB. Onconeural antigens and the paraneoplastic neurologic disorders: at the intersection of cancer, immunity, and the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996 mai 14;93(10):4529-36.

12. Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. 1990 déc 15;76(12):2462-5.
13. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*. 2008 avr;8(4):299-308.
14. MacKie RM, Reid R, Junor B. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N. Engl. J. Med*. 2003 févr 6;348(6):567-8.
15. Penn I. Posttransplant malignancies. *Transplant. Proc*. 1999 mars;31(1-2):1260-2.
16. Penn I. Malignant melanoma in organ allograft recipients. *Transplantation*. 1996 janv 27;61(2):274-8.
17. Penn I. Sarcomas in organ allograft recipients. *Transplantation*. 1995 déc 27;60(12):1485-91.
18. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol*. 2002 nov;3(11):991-8.
19. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991 déc 13;254(5038):1643-7.
20. Mellor AL, Munn DH. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nat. Rev. Immunol*. 2008 janv;8(1):74-80.
21. Mellor AL, Baban B, Chandler PR, Manlapat A, Kahler DJ, Munn DH. Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling. *J. Immunol*. 2005 nov 1;175(9):5601-5.
22. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med*. 2001 sept 17;194(6):769-79.
23. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol*. 2006 juin;6(6):476-83.
24. Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou D-Y, Singh N, Yagita H, et al. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest*. 2007 sept;117(9):2570-82.

25. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends in Molecular Medicine*. 2007 mars;13(3):108-16.
26. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res*. 2001 juin 15;61(12):4766-72.
27. Liyanage UK, Moore TT, Joo H-G, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J. Immunol*. 2002 sept 1;169(5):2756-61.
28. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med*. 2004 sept;10(9):942-9.
29. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2005 déc 20;102(51):18538-43.
30. Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, Fiegl H, Zeimet AG, Muller-Holzner E, et al. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res*. 2005 déc 1;11(23):8326-31.
31. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science*. 1986 sept 19;233(4770):1318-21.
32. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N. Engl. J. Med*. 1988 déc 22;319(25):1676-80.
33. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 2002 oct 25;298(5594):850-4.
34. Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U, et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J. Clin. Oncol*. 2008 nov 10;26(32):5233-9.

35. Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarlı A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, et al. CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J. Immunol.* 2005 mars 1;174(5):2591-601.
36. Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, Antony PA, Palmer DC, Spiess PJ, et al. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 2005 oct 3;202(7):907-12.
37. Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, et al. 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.* 2002 déc 10;99(25):16168-73.
38. Sadelain M, Rivière I, Brentjens R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat. Rev. Cancer.* 2003 janv;3(1):35-45.
39. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science.* 2006 oct 6;314(5796):126-9.
40. Rooney CM, Smith CA, Ng CY, Loftin SK, Sixbey JW, Gan Y, et al. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood.* 1998 sept 1;92(5):1549-55.
41. Wilkie GM, Taylor C, Jones MM, Burns DM, Turner M, Kilpatrick D, et al. Establishment and characterization of a bank of cytotoxic T lymphocytes for immunotherapy of Epstein-Barr virus-associated diseases. *J. Immunother.* 2004 août;27(4):309-16.
42. Zhou J, Shen X, Huang J, Hodes RJ, Rosenberg SA, Robbins PF. Telomere length of transferred lymphocytes correlates with in vivo persistence and tumor regression in melanoma patients receiving cell transfer therapy. *J. Immunol.* 2005 nov 15;175(10):7046-52.
43. Berger C, Jensen MC, Lansdorp PM, Gough M, Elliott C, Riddell SR. Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J. Clin. Invest.* 2008 janv;118(1):294-305.
44. Hinrichs CS, Borman ZA, Cassard L, Gattinoni L, Spolski R, Yu Z, et al. Adoptively transferred effector cells derived from naive rather than central memory CD8+ T cells mediate superior antitumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009 oct 13;106(41):17469-74.

45. Gattinoni L, Zhong X-S, Palmer DC, Ji Y, Hinrichs CS, Yu Z, et al. Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. *Nat. Med.* 2009 juill;15(7):808-13.
46. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat. Med.* 2011 oct;17(10):1290-7.
47. Hinrichs CS, Borman ZA, Gattinoni L, Yu Z, Burns WR, Huang J, et al. Human effector CD8+ T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood.* 2011 janv 20;117(3):808-14.
48. Sant AJ, McMichael A. Revealing the role of CD4+ T cells in viral immunity. *J. Exp. Med.* 2012 juill 30;209(8):1391-5.
49. Surman DR, Dudley ME, Overwijk WW, Restifo NP. Cutting edge: CD4+ T cell control of CD8+ T cell reactivity to a model tumor antigen. *J. Immunol.* 2000 janv 15;164(2):562-5.
50. Wong SBJ, Bos R, Sherman LA. Tumor-specific CD4+ T cells render the tumor environment permissive for infiltration by low-avidity CD8+ T cells. *J. Immunol.* 2008 mars 1;180(5):3122-31.
51. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J. Virol.* 1994 déc;68(12):8056-63.
52. Cardin RD, Brooks JW, Sarawar SR, Doherty PC. Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 1996 sept 1;184(3):863-71.
53. Aubert RD, Kamphorst AO, Sarkar S, Vezyz V, Ha S-J, Barber DL, et al. Antigen-specific CD4 T-cell help rescues exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011 déc 27;108(52):21182-7.
54. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature.* 2003 févr 20;421(6925):852-6.
55. Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science.* 2003 avr 11;300(5617):337-9.
56. Gao FG, Khammanivong V, Liu WJ, Leggatt GR, Frazer IH, Fernando GJP. Antigen-specific CD4+ T-cell help is required to activate a memory CD8+ T cell to a fully functional tumor killer cell. *Cancer Res.* 2002 nov 15;62(22):6438-41.

57. Muranski P, Restifo NP. Adoptive immunotherapy of cancer using CD4(+) T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2009 avr;21(2):200-8.
58. Fujiwara H, Fukuzawa M, Yoshioka T, Nakajima H, Hamaoka T. The role of tumor-specific Lyt-1+2- T cells in eradicating tumor cells in vivo. I. Lyt-1+2- T cells do not necessarily require recruitment of host's cytotoxic T cell precursors for implementation of in vivo immunity. *J. Immunol.* 1984 sept;133(3):1671-6.
59. Therapy of disseminated murine leukemia with cyclophosphamide and immune Lyt-1+,2- T cells. Tumor eradication does not require participation of cytotoxic T cells. *The Journal of Experimental Medicine.* 1985 mai 1;161(5):1122.
60. Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, Chan WFN, Anderson CC, Lantz O, et al. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood.* 2007 juin 15;109(12):5346-54.
61. Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, et al. Tumor-reactive CD4+ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *The Journal of Experimental Medicine.* 2010 mars 15;207(3):637 -650.
62. Xie Y, Akpınarlı A, Maris C, Hipkiss EL, Lane M, Kwon E-KM, et al. Naive tumor-specific CD4+ T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *The Journal of Experimental Medicine.* 2010 mars 15;207(3):651 -667.
63. Ossendorp F, Mengedé E, Camps M, Filius R, Melief CJ. Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J. Exp. Med.* 1998 mars 2;187(5):693-702.
64. Corthay A, Skovseth DK, Lundin KU, Røsjø E, Omholt H, Hofgaard PO, et al. Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity.* 2005 mars;22(3):371-83.
65. Mumberg D, Monach PA, Wanderling S, Philip M, Toledano AY, Schreiber RD, et al. CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999 juill 20;96(15):8633-8.
66. Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N. Engl. J. Med.* 2008 juin 19;358(25):2698-703.
67. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens.* 2005 avr;65(4):301-69.

68. Zhou L, Chong MMW, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009 mai;30(5):646-55.
69. Zygunt B, Veldhoen M. T helper cell differentiation more than just cytokines. *Adv. Immunol.* 2011;109:159-96.
70. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 1986 avr 1;136(7):2348-57.
71. Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell*. 2006 févr 24;124(4):823-35.
72. Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, et al. Interleukin 17, a T-cell-derived Cytokine, Promotes Tumorigenicity of Human Cervical Tumors in Nude Mice. *Cancer Res.* 1999 janv 8;59(15):3698-704.
73. Benchetrit F, Ciree A, Vives V, Warnier G, Gey A, Sautès-Fridman C, et al. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood*. 2002 mars 15;99(6):2114-21.
74. Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*. 2008 juill 15;112(2):362 - 373.
75. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995 août 1;155(3):1151-64.
76. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol. Rev.* 2006 août;212:28-50.
77. Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity*. 1998 janv;8(1):89-95.
78. Godefroy E, Scotto L, Souleimanian NE, Ritter G, Old LJ, Jotereau F, et al. Identification of two Melan-A CD4+ T cell epitopes presented by frequently expressed MHC class II alleles. *Clin. Immunol.* 2006 oct;121(1):54-62.
79. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*. 1996 oct 4;274(5284):94-6.

80. Cecconi V, Moro M, Del Mare S, Dellabona P, Casorati G. Use of MHC class II tetramers to investigate CD4+ T cell responses: problems and solutions. *Cytometry A*. 2008 nov;73(11):1010-8.
81. Novak EJ, Liu AW, Nepom GT, Kwok WW. MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4+ T cells proliferating in response to influenza A antigen. *J Clin Invest*. 1999 déc 15;104(12):R63-R67.
82. Ayyoub M, Dojcinovic D, Pignon P, Raimbaud I, Schmidt J, Luescher I, et al. Monitoring of NY-ESO-1 specific CD4+ T cells using molecularly defined MHC class II/His-tag-peptide tetramers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010 avr 20;107(16):7437-42.
83. Gnjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Güre AO, Ritter G, Jäger E, et al. NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Adv. Cancer Res*. 2006;95:1-30.
84. van Baren N, Brasseur F, Godelaine D, Hames G, Ferrant A, Lehmann F, et al. Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells. *Blood*. 1999 août 15;94(4):1156-64.
85. Valmori D, Souleimanian NE, Tosello V, Bhardwaj N, Adams S, O'Neill D, et al. Vaccination with NY-ESO-1 protein and CpG in Montanide induces integrated antibody/Th1 responses and CD8 T cells through cross-priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 mai 22;104(21):8947-52.
86. Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin. Cancer Res*. 2009 sept 1;15(17):5323-37.
87. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J. Clin. Oncol*. 2011 mars 1;29(7):917-24.
88. Zarour HM, Storkus WJ, Brusic V, Williams E, Kirkwood JM. NY-ESO-1 Encodes DRB1*0401-Restricted Epitopes Recognized by Melanoma-Reactive CD4+ T Cells. *Cancer Res*. 2000 sept 9;60(17):4946-52.
89. Valmori D, Souleimanian NE, Hesdorffer CS, Old LJ, Ayyoub M. Quantitative and qualitative assessment of circulating NY-ESO-1 specific CD4+ T cells in cancer-free individuals. *Clin. Immunol*. 2005 nov;117(2):161-7.
90. Ayyoub M, Souleimanian NE, Godefroy E, Scotto L, Hesdorffer CS, Old LJ, et al. A phenotype based approach for the immune monitoring of NY-ESO-1-specific CD4+ T cell responses in cancer patients. *Clin. Immunol*. 2006 mars;118(2-3):188-94.

91. Bioley G, Dousset C, Yeh A, Dupont B, Bhardwaj N, Mears G, et al. Vaccination with Recombinant NY-ESO-1 Protein Elicits Immunodominant HLA-DR52b-restricted CD4+ T Cell Responses with a Conserved T Cell Receptor Repertoire. *Clinical Cancer Research*. 2009 juill 1;15(13):4467-4474.
92. Sintasath DM, Tang T, Slack R, Tilley EE, Ng J, Hartzman RJ, et al. Relative HLA-DRB1*13 allele frequencies and DRB3 associations of unrelated individuals from five US populations. *Hum. Immunol*. 1999 oct;60(10):1001-10.
93. Gans CP, Tang TF, Slack R, Ng J, Hartzman RJ, Hurley CK. DRB1*14 diversity and DRB3 associations in four major population groups in the United States. *Tissue Antigens*. 2002 mai;59(5):364-9.
94. Tang TF, Huang AY, Pappas A, Slack R, Ng J, Hartzman RJ, et al. Relative frequencies of DRB1*11 alleles and their DRB3 associations in five major population groups in a United States bone marrow registry. *Hum. Immunol*. 2000 août;61(8):820-7.
95. Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RWB, Davey DF, Flynn BJ, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat. Med*. 2007 juill;13(7):843-50.
96. Harari A, Rozot V, Enders FB, Perreau M, Stalder JM, Nicod LP, et al. Dominant TNF- α + Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. *Nat. Med*. 2011 mars;17(3):372-6.
97. Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat. Rev. Immunol*. 2008 avr;8(4):247-58.
98. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*. 1998 juin 4;393(6684):478-80.
99. van Rhee F, Szmania SM, Zhan F, Gupta SK, Pomtree M, Lin P, et al. NY-ESO-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood*. 2005 mai 15;105(10):3939-44.
100. Atanackovic D, Arfsten J, Cao Y, Gnjatic S, Schnieders F, Bartels K, et al. Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2007 févr 1;109(3):1103-12.
101. Bains I, Antia R, Callard R, Yates AJ. Quantifying the development of the peripheral naive CD4+ T-cell pool in humans. *Blood*. 2009 mai 28;113(22):5480-7.

102. Arstila TP, Casrouge A, Baron V, Even J, Kanellopoulos J, Kourilsky P. A direct estimate of the human alpha beta T cell receptor diversity. *Science*. 1999 oct 29;286(5441):958-61.
103. Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW. Autoreactive T cells in healthy individuals. *J. Immunol*. 2004 mai 15;172(10):5967-72.
104. Chu HH, Moon JJ, Takada K, Pepper M, Molitor JA, Schacker TW, et al. Positive selection optimizes the number and function of MHCII-restricted CD4+ T cell clones in the naive polyclonal repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009 juill 7;106(27):11241-5.
105. Kwok WW, Tan V, Gillette L, Littell CT, Soltis MA, LaFond RB, et al. Frequency of epitope-specific naive CD4(+) T cells correlates with immunodominance in the human memory repertoire. *J. Immunol*. 2012 mars 15;188(6):2537-44.
106. Alanio C, Lemaitre F, Law HKW, Hasan M, Albert ML. Enumeration of human antigen-specific naive CD8+ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood*. 2010 mai 6;115(18):3718-25.
107. Homann D, Teyton L, Oldstone MB. Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory. *Nat. Med.* 2001 août;7(8):913-9.
108. Prlic M, Hernandez-Hoyos G, Bevan MJ. Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8+ T cell response. *J. Exp. Med.* 2006 sept 4;203(9):2135-43.
109. Obst R, van Santen H-M, Mathis D, Benoist C. Antigen persistence is required throughout the expansion phase of a CD4(+) T cell response. *J. Exp. Med.* 2005 mai 16;201(10):1555-65.
110. Besser MJ, Shapira-Frommer R, Treves AJ, Zippel D, Itzhaki O, Hershkovitz L, et al. Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* 2010 mai 1;16(9):2646-55.
111. Valmori D, Souleimanian NE, Tosello V, Bhardwaj N, Adams S, O'Neill D, et al. Vaccination with NY-ESO-1 protein and CpG in Montanide induces integrated antibody/Th1 responses and CD8 T cells through cross-priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 mai 22;104(21):8947-52.
112. Sabatino JJ, Huang J, Zhu C, Evavold BD. High prevalence of low affinity peptide-MHC II tetramer-negative effectors during polyclonal CD4+ T cell responses. *J. Exp. Med.* 2011 janv 17;208(1):81-90.

113. Reichstetter S, Ettinger RA, Liu AW, Gebe JA, Nepom GT, Kwok WW. Distinct T cell interactions with HLA class II tetramers characterize a spectrum of TCR affinities in the human antigen-specific T cell response. *J. Immunol.* 2000 déc 15;165(12):6994-8.
114. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood.* 2006 juin 15;107(12):4781-9.
115. Liew FY, Li Y, Millott S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J. Immunol.* 1990 déc 15;145(12):4306-10.
116. Hamaï A, Duperrier-Amouriaux K, Pignon P, Raimbaud I, Memeo L, Colarossi C, et al. Antibody responses to NY-ESO-1 in primary breast cancer identify a subtype target for immunotherapy. *PLoS ONE.* 2011;6(6):e21129.
117. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999 oct 14;401(6754):708-12.
118. Marleau AM, Sarvetnick N. T cell homeostasis in tolerance and immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2005 sept;78(3):575-84.
119. Kamimura D, Bevan MJ. Naive CD8⁺ T cells differentiate into protective memory-like cells after IL-2 anti IL-2 complex treatment in vivo. *J. Exp. Med.* 2007 août 6;204(8):1803-12.
120. Kieper WC, Prlic M, Schmidt CS, Mescher MF, Jameson SC. IL-12 enhances CD8 T cell homeostatic expansion. *J. Immunol.* 2001 mai 1;166(9):5515-21.
121. Sandau MM, Winstead CJ, Jameson SC. IL-15 is required for sustained lymphopenia-driven proliferation and accumulation of CD8 T cells. *J. Immunol.* 2007 juill 1;179(1):120-5.
122. Prlic M, Blazar BR, Khoruts A, Zell T, Jameson SC. Homeostatic expansion occurs independently of costimulatory signals. *J. Immunol.* 2001 nov 15;167(10):5664-8.
123. Le Campion A, Bourgeois C, Lambolez F, Martin B, Léaument S, Dautigny N, et al. Naive T cells proliferate strongly in neonatal mice in response to self-peptide/self-MHC complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002 avr 2;99(7):4538-43.
124. Haluszczak C, Akue AD, Hamilton SE, Johnson LDS, Pujanauski L, Teodorovic L, et al. The antigen-specific CD8⁺ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. *J. Exp. Med.* 2009 févr 16;206(2):435-48.

125. Hamilton SE, Wolkers MC, Schoenberger SP, Jameson SC. The generation of protective memory-like CD8+ T cells during homeostatic proliferation requires CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* 2006 mai;7(5):475-81.
126. Rivino L, Messi M, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F, Geginat J. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *J. Exp. Med.* 2004 sept 20;200(6):725-35.
127. Watanabe N, Hanabuchi S, Soumelis V, Yuan W, Ho S, de Waal Malefyt R, et al. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat. Immunol.* 2004 avr;5(4):426-34.
128. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2003 mars;3(3):253-7.
129. Hsieh C-S, Zheng Y, Liang Y, Fontenot JD, Rudensky AY. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat. Immunol.* 2006 avr;7(4):401-10.
130. Valmori D, Merlo A, Souleimanian NE, Hesdorffer CS, Ayyoub M. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *J. Clin. Invest.* 2005 juill;115(7):1953-62.
131. Rivino L, Gruarin P, Häringer B, Steinfeldler S, Lozza L, Steckel B, et al. CCR6 is expressed on an IL-10-producing, autoreactive memory T cell population with context-dependent regulatory function. *J. Exp. Med.* 2010 mars 15;207(3):565-77.
132. van den Boorn JG, Le Poole IC, Luiten RM. T-cell avidity and tuning: the flexible connection between tolerance and autoimmunity. *Int. Rev. Immunol.* 2006 août;25(3-4):235-58.
133. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature Immunology.* 2001 avr 1;2(4):301-6.
134. Gotter J, Brors B, Hergenhausen M, Kyewski B. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J. Exp. Med.* 2004 janv 19;199(2):155-66.
135. Redjimi N, Duperrier-Amouriaux K, Raimbaud I, Luescher I, Dojcinovic D, Classe J-M, et al. NY-ESO-1-specific circulating CD4+ T cells in ovarian cancer patients are prevalently T(H)1 type cells undetectable in the CD25+ FOXP3+ Treg compartment. *PLoS ONE.* 2011;6(7):e22845.

136. Fourcade J, Sun Z, Kudela P, Janjic B, Kirkwood JM, El-Hafnawy T, et al. Human tumor antigen-specific helper and regulatory T cells share common epitope specificity but exhibit distinct T cell repertoire. *J. Immunol.* 2010 juin 15;184(12):6709-18.
137. Haque T, Wilkie GM, Jones MM, Higgins CD, Urquhart G, Wingate P, et al. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood.* 2007 août 15;110(4):1123-31.
138. Marcus A, Waks T, Eshhar Z. Redirected tumor-specific allogeneic T cells for universal treatment of cancer. *Blood.* 2011 juill 28;118(4):975-83.

SERMENT MEDICAL

Au moment d'être admis (e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis (e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré (e) et méprisé (e) si j'y manque.

NOM : POLI

PRENOM : Caroline

Titre du Mémoire /Thèse : Génération de lignées lymphocytaires T CD4⁺ spécifiques de l'antigène tumoral NY-ESO-1 à partir du sang périphérique de donneurs sains par priming *in vitro* et utilisation de tétramères CMHII/peptide

Résumé du Mémoire/Thèse :

La génération de lignées lymphocytaires T CD4⁺ auxiliaires (TH) spécifiques d'antigènes tumoraux humains, tels que NY-ESO-1 (ESO), à partir de lymphocytes circulants, par priming* *in vitro*, constituerait une immunothérapie adoptive anti-tumorale prometteuse. Différentes sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ (LT CD4⁺) isolées du sang périphérique de donneurs sains non immunisés ont été stimulées *in vitro* en présence du peptide ESO₁₁₉₋₁₄₃. L'utilisation de tétramères de complexes CMH de classe II/peptide, qui incorporent des peptides immunodominants d'ESO, a ensuite permis de détecter puis d'isoler les LT CD4⁺ spécifiques d'ESO. Par cette approche, nous avons généré des lignées TH à partir de LT CD4⁺CD25⁻ conventionnels naïfs et mémoires centraux. En revanche, aucune lignée n'a été

obtenue à partir de populations mémoires effectrices ou de LT régulateurs CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. Les lignées TH ainsi obtenues permettraient de nouvelles approches thérapeutiques de transfert adoptif chez les patients porteurs de tumeurs solides ou de cancers hématopoiétiques exprimant ESO.

*stimulation primaire de cellules

MOTS-CLES : transfert adoptif cellulaire, immunothérapie spécifique, lymphocytes T CD4⁺, tétramère CMH II/peptide, antigène tumoral, NY-ESO-1