

Thèse de Doctorat

Maud CHARPENTIER

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Biologie-Santé*

Spécialité : *Immunologie-Cancérologie*

Unité de recherche :

*Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie
UMR INSERM 1232 / Université de Nantes*

Soutenue le 1^{er} Décembre 2017

Caractérisation et contrôle de l'expression des antigènes de mélanome issus de la traduction de l'ARN *meloe*.

JURY

| | |
|----------------------|---|
| Présidente : | Sophie LUCAS , Professeur des Universités, Université Catholique de Louvain, Bruxelles |
| Rapporteurs : | Stéphane PYRONNET , Directeur de Recherche, Centre de Recherche en cancérologie de Toulouse Pierre VAN DER BRUGGEN , Professeur des Universités, Institut de Duve, Bruxelles |
| Examineur : | Jean-Philippe COMBIER , Chargé de Recherche, Laboratoire de recherche en Sciences végétales, Toulouse |
| Directeur de Thèse : | François LANG , Professeur des Universités, Université de Nantes |

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION | 5 |
| Préambule : caractéristiques principales de la cellule tumorale | 7 |
| 1- L'acquisition du phénotype tumoral | 13 |
| I. L'instabilité génétique | 13 |
| A. Les mutations et le processus de tumorigenèse | 13 |
| B. Le mélanome, une tumeur fortement mutée | 17 |
| 1. Les mutations UV induites | 17 |
| 2. Les mutations driver dans le mélanome | 17 |
| a) La voie des MAP kinases | 18 |
| b) PTEN dans la voie PI3K/AKT | 20 |
| c) Le facteur de transcription MITF | 21 |
| II. L'environnement tumoral | 22 |
| A. Le contexte inflammatoire pro-tumoral | 22 |
| B. Le stress cellulaire | 23 |
| 2- Génération des antigènes tumoraux | 27 |
| I. Les antigènes issus de la traduction classique | 28 |
| A. Rappels sur les mécanismes de traduction coiffe-dépendante dans les cellules eucaryotes | 28 |
| 1. Le modèle général | 28 |
| 2. La régulation de la phase d'initiation de la traduction | 31 |
| a) L'inhibition d'eIF4E par 4E-BP1 | 32 |
| b) Impact de la phosphorylation d'eIF2 α | 34 |
| B. Les antigènes de tumeur traduits de façon coiffe-dépendante | 37 |
| 1. Les antigènes cancer germline | 37 |
| 2. Les antigènes de différenciation | 38 |
| 3. Les antigènes surexprimés | 40 |
| 4. Les antigènes mutés | 42 |
| 5. Les antigènes issus de transcrits aberrants | 45 |
| II. Les antigènes issus de la traduction coiffe-indépendante – implication des séquences IRES | 49 |
| A. Mise en évidence | 49 |
| B. Mécanismes d'activation des séquences IRES | 50 |
| 1. La structure secondaire | 51 |
| 2. Les interactions IRES-protéines | 53 |
| a) L'implication des facteurs de traduction classiques | 53 |
| b) Les facteurs ITAF | 54 |
| C. La traduction IRES dépendante dans les cellules tumorales | 58 |
| III. Les antigènes issus de la traduction du génome « non-codant » | 63 |
| A. La capacité codante du génome non-codant | 64 |
| 1. Les ORFs courts (sORFs) | 64 |
| 2. Les ORFs en amont (uORFs) | 64 |
| 3. Les micro ARNs (miRNAs) | 65 |
| 4. Les ARNs polycistroniques | 66 |
| 5. Les longs ARNs non codants (lncRNAs) | 66 |
| a) Description et classification | 66 |
| b) Les fonctions des lncRNAs | 70 |
| c) L'implication des lncRNA dans les cancers | 73 |

| | |
|--|------------|
| d) Les lncRNA dans le mélanome..... | 73 |
| e) La traduction des lncRNAs..... | 76 |
| B. Les antigènes traduits à partir d'ARNs « non-codants » | 77 |
| 3- La réaction immunitaire anti-tumorale..... | 81 |
| I. La théorie de l'immunosurveillance..... | 81 |
| II. De l'immunosurveillance à l'immunoediting des tumeurs | 82 |
| 4- Les antigènes de la famille MELOE..... | 87 |
| I. Mise en évidence | 87 |
| II. Réponse immunitaire spécifique des antigènes MELOE-1 et MELOE-2 | 89 |
| III. Structure de l'ARN <i>meloe</i> | 90 |
| IV. Régulation de l'expression de MELOE-1 et MELOE-2..... | 91 |
| A. Régulation transcriptionnelle..... | 91 |
| B. Régulation traductionnelle..... | 92 |
| V. Utilisation des antigènes MELOE en immunothérapie. | 93 |
| | |
| RESULTATS | 97 |
| | |
| Objectifs | 99 |
| | |
| Etude N°1 : Mécanismes de traduction et immunogénicité des protéines issues de la traduction de <i>meloe</i>..... | 101 |
| | |
| Etude n°2 : Modes activation de l'IRES de MELOE-1 dans les cellules de mélanome – résultats préliminaires. | 117 |
| I. La structure de la séquence IRES MELOE-1..... | 118 |
| II. Identification des facteurs ITAFs associés à l'IRES MELOE-1 | 119 |
| A. Caractérisation de protéines liées à l'IRES MELOE-1..... | 119 |
| B. Le rôle de hnRNP-A1 dans l'activation de l'IRES MELOE-1..... | 121 |
| 1. La protéine hnRNP-A1 | 121 |
| 2. Mise en évidence de l'interaction entre MELOE-1 et hnRNP-A1..... | 122 |
| 3. Validation du rôle ITAF de hnRNP-A1 | 123 |
| a) Mise en évidence du site d'interaction hnRNP-A1 – IRES MELOE-1..... | 123 |
| b) Mise en évidence de l'implication de hnRNP-A1 dans l'activation de l'iRES..... | 124 |
| III. Le rôle du stress du réticulum dans l'activation de l'IRES MELOE-1 | 124 |
| A. Obtention d'une lignée de mélanome MELOE-1-YFP..... | 124 |
| B. L'expression de MELOE-1 est augmentée par un traitement à la rapamycine..... | 125 |
| C. L'expression de MELOE-1 est sensible au stress du réticulum. | 126 |
| 1. Observation des M117 MELOE-1-YFP traitées TU/TH en microscopie confocale. | 126 |
| 2. Détection de la traduction de YFP (MELOE-1) cytoplasmique par Western Blot. | 128 |
| D. L'induction du stress du réticulum augmente la reconnaissance de cellules de mélanome par un clone spécifique de MELOE-1..... | 129 |
| IV. Conclusion | 131 |

| | |
|--|------------|
| DISCUSSION ET PERSPECTIVES | 135 |
| I. Rôle et origine des ARNs polycistroniques eucaryotes..... | 137 |
| II. La traduction IRES dépendante et la synthèse d'antigènes..... | 140 |
| III. Définition de la classe des « néoantigènes »..... | 142 |
| IV. L'expression des néoantigènes et la tolérance immunitaire..... | 146 |
| BIBLIOGRAPHIE | 151 |
| ANNEXES | 197 |

Introduction

Préambule : caractéristiques principales de la cellule tumorale.

Les cellules tumorales, malgré leur diversité selon les types tumoraux, sont toutes caractérisées par une prolifération incontrôlée et continue et par un phénotype altéré en terme de métabolisme et de signalisation. L'échappement de ces cellules au contrôle de la division cellulaire et l'acquisition de la capacité à coloniser des tissus à distance du site d'origine sont les piliers de la formation des tumeurs et de leur impact dramatique sur la santé humaine. En France en 2015, 385 000 nouveaux cas de cancers et 150 000 décès ont été recensés ce qui en fait un problème de santé publique majeur (chiffres Institut National du Cancer).

Les événements précoces de la transformation néoplasique impliquent dans une grande majorité des cas une altération de l'intégrité génomique de la cellule. L'accumulation d'une succession d'altérations génétiques va modifier la cellule jusqu'à ce qu'elle présente un phénotype de croissance et de division cellulaire typique des cellules tumorales. L'évolution ces cellules peut s'apparenter à un modèle de sélection darwinien : les cellules ayant subi des variations génétiques conférant un avantage de croissance, de prolifération ou de résistance à l'apoptose sont sélectionnées et servent de base à l'accumulation de mutations supplémentaires (Foulds, 1954; Hanahan & Weinberg, 2000; Nowell, 1976). A ce titre le cancer est souvent décrit comme un désordre génétique des cellules somatiques.

L'étude de cellules tumorales d'origines différentes a montré que malgré leur hétérogénéité, un certain nombre de caractéristiques moléculaires, biochimiques et cellulaires étaient partagées par un grand nombre de tumeurs humaines. En 2000 puis 2011, Hanahan et Weinberg ont décrit dans leurs publications intitulées « Hallmarks of cancer » les caractéristiques physiologiques essentielles qui, ensemble permettent la progression tumorale (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Ces « hallmarks » développées ci-dessous sont au nombre de 8 et leur acquisition est influencée par deux facteurs : la forte instabilité génomique des cellules tumorales et le contexte inflammatoire mis en place par la tumeur elle-même (figure 1). De plus, les cellules tumorales sont sujettes à divers types de stress cellulaires qui favorisent leur instabilité et la progression tumorale.

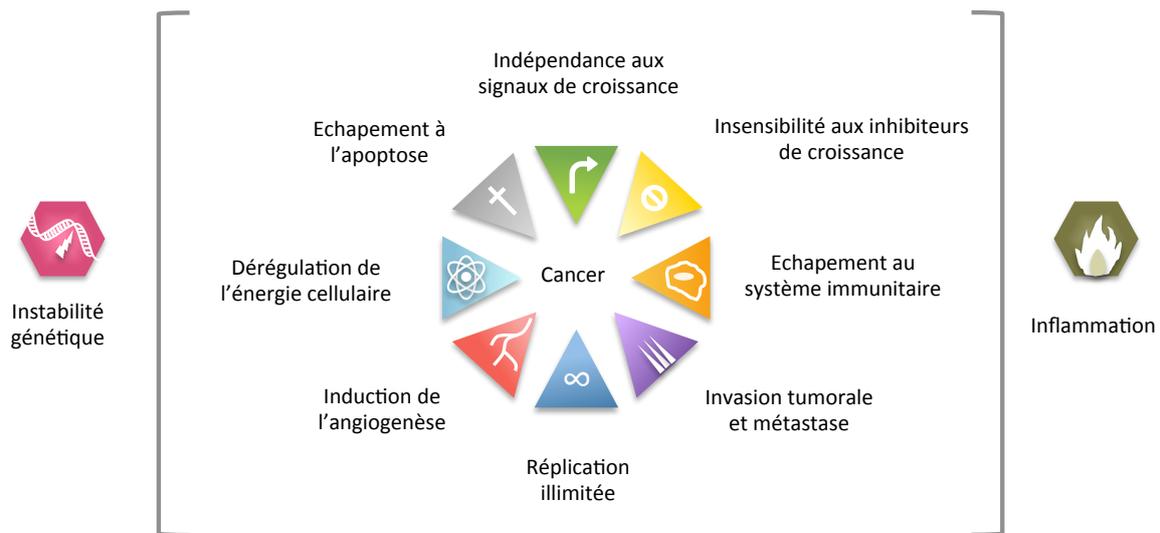


Figure 1 : « The Hallmarks of cancer ». Les cellules tumorales partagent des caractéristiques acquises qui leur confèrent leurs capacités malignes. A l'origine six « hallmarks » ont été décrites : l'indépendance aux signaux de croissance, l'insensibilité aux inhibiteurs de croissance, la résistance à l'apoptose, la réplication illimitée, l'induction de l'angiogenèse et l'invasion et la métastase. Puis la dérégulation du métabolisme énergétique et l'échappement au système immunitaire sont venus compléter cette description. Quant à l'instabilité génétique et l'inflammation, ils sont décrits comme les processus facilitant la survenue de la transformation et de la progression tumorale. Adapté de (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).

(i) Maintien des signaux prolifératifs.

Afin de maintenir l'homéostasie cellulaire et l'architecture tissulaire, les cycles de croissance et de division des cellules saines sont régulés finement par des facteurs de croissance. A l'inverse, la croissance et la division des cellules transformées est anarchique et continue. Pour cela plusieurs mécanismes peuvent entrer en jeu : les cellules tumorales sont capables de produire elles-mêmes des facteurs de croissance afin de réaliser une stimulation autocrine, d'induire la production de ces facteurs par les cellules de soutien du microenvironnement tumoral ou encore de sur-exprimer en surface les récepteurs aux facteurs de croissance ce qui les rend hyper-réactives (Bhowmick, Neilson, & Moses, 2004; Cheng, Chytil, Shyr, Joly, & Moses, 2008). De plus, des mutations dans les voies de signalisation impliquées dans la transduction des signaux de croissance peuvent induire une stimulation chronique indépendante de tout stimulus extérieur (M. a. Davies, 2012; M. A. Davies & Samuels, 2010; T L Yuan & Cantley, 2008).

(ii) Echappement aux supresseurs de croissance.

En complément du maintien de la croissance cellulaire, les cellules tumorales contournent les voies d'inhibition de croissance et notamment celles qui dépendent d'un ensemble de gènes supresseurs de tumeurs. Ces derniers jouent un rôle de point de contrôle du cycle cellulaire dans les cellules saines et induisent son arrêt voire l'apoptose de la cellule en cas de dommages importants (Burkhart & Sage, 2008; Sherr, 2004; Sherr & McCormick, 2002). Dans les cellules tumorales, l'inactivation de ces gardiens de l'intégrité cellulaire permet la poursuite du cycle cellulaire malgré les modifications subies par les cellules.

(iii) Résistance à l'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est orchestrée par des senseurs qui détectent les anomalies intra et extracellulaires et des effecteurs qui induisent en réponse des programmes de mort cellulaire. La résistance à l'apoptose des cellules tumorales est la conséquence de déséquilibres entre des signaux pro- et anti-apoptotiques en faveur de la prolifération cellulaire (J. M. Adams & Cory, 2007; Lowe, Cepero, & Evan, 2004). La stratégie la plus commune de résistance à l'apoptose est l'inhibition du gène supresseur de tumeur TP53 (Kasthuber & Lowe, 2017; Merkel et al., 2017).

(iv) Potentiel répliatif infini

Les cellules tumorales sont également capables de subir un nombre illimité de divisions, ce qui est impossible dans les cellules normales pour lesquelles seul un nombre limité de cycles de divisions est possible (limite de Hayflick (Hayflick & Moorhead, 1961)). Cette limite de division des cellules saines résulte du raccourcissement des télomères, des structures nucléoprotéiques situées aux extrémités des chromosomes, après chaque division cellulaire (Blasco, 2005; Shay & Wright, 2000). Pour empêcher ce raccourcissement, la télomérase, une ribonucléoprotéine, permet la reconstitution des télomères dans certaines cellules (cellules souches embryonnaires, cellules souches germinales). Elle est très peu exprimée dans les cellules somatiques normales mais est induite dans environ 90% des cellules immortalisées, dont les cellules tumorales humaines (Greider & Blackburn, 1996; Hackett & Greider, 2002; Shay & Bacchetti, 1997).

(v) Induction de l'angiogenèse

Lorsque les tumeurs s'établissent en masses cellulaires hétérogènes, elles doivent subvenir à leurs besoins en oxygène et en nutriments et évacuer les déchets métaboliques produits. Pour cela, elles activent la formation de nouveaux vaisseaux en leur sein, par le processus de néoangiogenèse (Hanahan & Folkman, 1996; Wicki & Christofori, 2008).

(vi) Reprogrammation du métabolisme énergétique

Dans les cellules tumorales, on remarque un ajustement du métabolisme énergétique en faveur de la glycolyse anaérobie même en situation normoxique (Hsu & Sabatini, 2008; Vander Heiden, Cantley, & Thompson, 2009; Warburg, 1956; Weinhouse, Warburg, Burk, & Schade, 1956). Ce changement métabolique a été associé à l'activation d'oncogènes et à l'inhibition de suppresseurs de tumeurs (DeBerardinis, Lum, Hatzivassiliou, & Thompson, 2008; Jones & Thompson, 2009). Ce mécanisme peut s'avérer indispensable à la survie des cellules tumorales en particulier du fait de la fragilité de la néovascularisation des tumeurs entraînant des variations de l'oxygénation des tissus (Hardee, Dewhirst, Agarwal, & Sorg, 2009).

(vii) Echappement au contrôle par le système immunitaire

L'ensemble des modifications subies par les cellules au cours du développement des tumeurs en font des unités différentes des cellules saines dont elles sont issues. Aussi ne sont-elles plus considérées comme des cellules du soi et peuvent être reconnues et éliminées par le système immunitaire. Afin de contrer son action, les cellules tumorales ainsi que les cellules de soutien du microenvironnement tumoral induisent un contexte inflammatoire immunosuppresseur permettant d'inhiber l'action des acteurs de l'immunité recrutés (Ostrand-Rosenberg & Sinha, 2009; Shields, Kourtis, Tomei, Roberts, & Swartz, 2010; H. Y. Wang & Wang, 2007; L. Yang, Pang, & Moses, 2010). Le rôle du système immunitaire est particulièrement important dans les premiers stades de la transformation des cellules durant lesquels il participe à la sélection de clones tumoraux qui lui sont résistants (cf. Partie 3-II).

(viii) Acquisition de la capacité d'invasion et de métastase

Le stade métastatique correspond au stade le plus avancé des cancers, caractérisé par une dissémination des cellules tumorales dans l'organisme et la formation de tumeurs secondaires. Il implique une cascade métastatique comprenant une succession d'événements cellulaires aboutissant à l'invasion locale puis périphérique des cellules tumorales (Fidler et al., 2003; Pienta, Robertson, Coffey, & Taichman, 2013; Talmadge & Fidler, 2010).

1- L'acquisition du phénotype tumoral.

I. L'instabilité génétique

A. Les mutations et le processus de tumorigenèse

La description des cancers comme maladies d'origine génétique place les aberrations génomiques en élément central qui initie la transformation des cellules saines. De plus, la progression tumorale elle-même est conditionnée par l'acquisition de nouvelles mutations qui confèrent aux cellules un avantage sélectif dans la formation de la tumeur. On peut donc voir la progression tumorale comme une succession de sélections et d'expansions clonales des cellules présentant un gain de fonction (Hanahan & Weinberg, 2011).

Le développement des techniques de séquençage à haut débit a mis en évidence un grand nombre de variations dans le génome de cellules tumorales en comparaison avec celui des cellules saines correspondantes. On observe également une large hétérogénéité mutationnelle entre différentes tumeurs. L'abondance des données issues du séquençage des tumeurs a entraîné la création de consortiums tels que « The Cancer Genome Atlas » (TCGA) ou l'« International Cancer Genome Consortium » (ICGC) (Hudson et al., 2010; Leiserson et al., 2014; Weinstein et al., 2013). Leur but est d'identifier les modifications génomiques, épigénomiques et transcriptomiques entre les tissus sains et tumoraux et éventuellement de mettre en évidence des motifs communs au sein des différents types tumoraux. L'observation la plus évidente est une grande variabilité des taux de mutations selon les tumeurs étudiées allant de moins d'une mutation somatique par mégabase (Mb) pour les tumeurs pédiatriques et liquides à plus de 10 mutations / Mb pour les cancers du poumon, les mélanomes et certains cancers colorectaux (figure 2) (Alexandrov et al., 2013; Lawrence et al., 2013; Michael R Stratton, Campbell, & Andrew F, 2009; The Cancer Genome Atlas Network et al., 2013; Vogelstein et al., 2013).

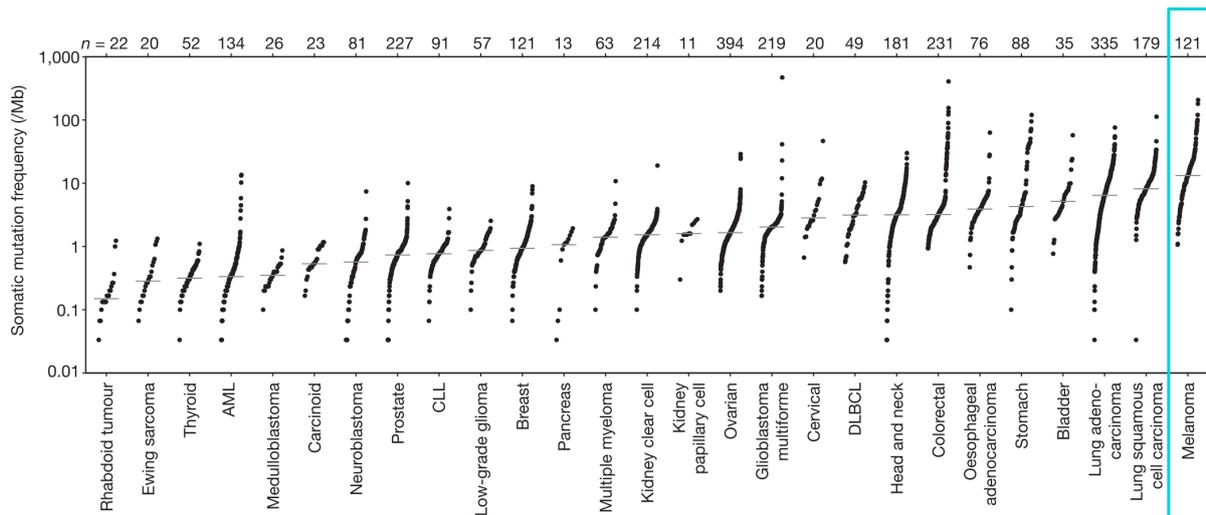


Figure 2 : Fréquence des mutations somatiques observées dans 27 tumeurs différentes par comparaison des exomes de plus de 3000 paires tumeur-tissus sain. (Lawrence et al., 2013)

Dans un contexte physiologique normal, de nombreux mécanismes de maintien de l'intégrité génomique sont mis en place par les cellules pour maintenir un taux de mutations relativement faible à chaque génération. A l'inverse, on observe une forte « mutabilité » des cellules tumorales qui peut être associée à l'addition de deux facteurs : d'une part par l'arrêt d'un ou plusieurs des mécanismes de surveillance et de réparation du génome qui favorise l'instabilité génomique (S. P. Jackson & Bartek, 2010; Kastan, 2008; Pikor, Thu, Vucic, & Lam, 2013; Sigal & Rotter, 2000). Et d'autre part l'exposition à des agents mutagènes environnementaux ou des agents chimiques qui augmentent le risque de survenue des mutations. Cette dernière catégorie peut en partie expliquer les forts taux de mutations observés dans des tumeurs dont les tissus d'origine sont particulièrement exposés à ces mutagènes comme les mélanomes (exposés aux rayonnements UV) et les cancers du poumon (exposés aux fumées de combustion du tabac).

Comme indiqué précédemment l'évolution des tumeurs suit un modèle de sélection darwinienne. Parmi les mutations somatiques acquises par la cellule, seules celles qui lui confèrent un avantage sélectif sont sélectionnées et on observe alors une expansion clonale (Greaves, 2015; Greaves & Maley, 2012; Nowell, 1976).

L'une des problématiques principales est de discriminer les mutations précoces et primordiales dans la transformation tumorale de celles qui sont simplement accumulées dans le génome et ne jouent que des rôles secondaires dans la progression (Kandoth 2013,

Weinstein 2013 dans Diederichs). Elles sont divisées en deux classes (Michael R Stratton et al., 2009) :

- les mutations « driver » : elles sont directement impliquées dans l'oncogenèse et confèrent un avantage prolifératif à la cellule mutée

- Les mutations « passager » ou stochastiques / accessoires : elles n'ont pas été sélectionnées, ne confèrent pas d'avantage prolifératif et ne sont donc pas impliquées directement dans l'oncogenèse. Elles sont retrouvées dans le génome des cellules tumorales car les mutations somatiques sans conséquences fonctionnelles surviennent spontanément et au hasard dans toutes les cellules au cours de la division cellulaire et s'accumulent dans les tissus au cours de la vie. Même si elles ne contribuent pas directement au processus de progression tumorale les mutations accessoires modifient le protéome des cellules de façon qualitative ou quantitative (sur- ou sous-expression de protéines) et en ce sens participent au phénotype des cellules tumorales.

Les modifications génomiques des cellules tumorales ne se limitent pas aux mutations somatiques qui comprennent les mutations ponctuelles (insertions, délétions, substitutions), les réarrangements chromosomiques et les modifications du nombre de copies de gènes. Les modifications épigénétiques telles que les modifications du statut de méthylation de l'ADN ou les modifications des marques d'histones participent également à l'acquisition du phénotype tumoral (Berdasco & Esteller, 2010; Esteller, 2007; Montagnani, Benelli, Apollo, Pescucci, & Stecca, 2016).

Les mutations isolées sont rarement responsables à elles seules de la transformation tumorale, pour des cellules en culture *in vitro* il semble que l'altération d'au moins 3 ou 4 gènes soit nécessaire pour présenter un phénotype malin (Rangarajan, Hong, Gifford, & Weinberg, 2004). Le modèle admis actuellement pour l'initiation du développement tumoral est donc en faveur de l'accumulation au sein du génome des cellules de plusieurs mutations driver plutôt que la présence d'une seule suffisante pour initier la transformation (Garraway & Lander, 2013; Vogelstein et al., 2013). Chacune d'entre elles va entraîner une vague d'expansion clonale de cellules qui subiront par la suite de nouveaux épisodes de mutation ce qui aboutit à des cellules dont le génome est de plus en plus déviant du modèle initial. La tumorigenèse en tant que processus évolutif résulte donc en une hétérogénéité génomique des tumeurs d'un même individu, entre les cellules de la tumeur primaire et entre tumeur primaire et métastases (Salk, Fox, & Loeb, 2010; Stoecklein et al., 2008).

Dans l'étude des mutations des cellules tumorales, le mélanome est une tumeur particulièrement intéressante et a servi de tumeur modèle pour mes travaux de thèse. Une étude de plus de 300 mélanomes primaires et/ou métastatiques d'origines diverses du consortium « The Cancer Genome Atlas » a mis en évidence près de 230 000 mutations, substitutions ou insertions et délétions de nucléotides. Avec un taux moyen de mutation de 16,8 /Mb, le mélanome fait partie des tumeurs les plus mutées qui aient été étudiées à ce jour (figure 2) (Alexandrov et al., 2013; Hodis et al., 2012; Lawrence et al., 2013; The Cancer Genome Atlas Network, 2015). Bien que ne représentant que 10% des cancers de la peau, le mélanome est le plus agressif, responsable à lui seul de 80% des décès par tumeurs cutanées (Miller & Mihm, 2006). Depuis les années 1980, c'est l'un des cancers dont l'incidence et la mortalité ont augmenté avec plus de 14 000 nouveaux cas en France en 2015 (incidence 13/100 000) et environ 2 000 décès (Les cancers en France INCA, 2015). De la même façon l'incidence mondiale, 160 000 nouveaux cas par an pour 48 000 décès, est toujours croissante malgré des campagnes de prévention (Eggermont, Spatz, & Robert, 2014). Le mélanome se développe à partir des mélanocytes, cellules de la couche basale de l'épiderme responsables de la pigmentation grâce à la production de mélanine. Dans environ 20 à 40% des cas, les mélanomes se développent à partir de nævi préexistants, tumeurs bénignes développées aux dépens des mélanocytes ; la majorité des mélanomes se développent donc *de novo* (Eggermont et al., 2014; Elder, 2006). Le développement du mélanome est associé à une combinaison de facteurs environnementaux et génétiques permettant une évolution progressive de la tumeur primaire circonscrite à un stade métastatique. La détection précoce des mélanomes est un facteur de bon pronostic puisqu'après chirurgie le taux de survie à 5 ans atteint 90%. Cependant, une fois que des métastases à distance se sont formées seulement 15% des patients survivent 5 ans après l'exérèse de la tumeur primaire (Eggermont et al., 2014).

B. Le mélanome, une tumeur fortement mutée

1. Les mutations UV induites

Si les cellules de mélanome sont si sujettes aux mutations c'est en grande partie à cause de leur exposition prolongée aux rayonnements UV fortement carcinogènes. En effet, les rayonnements solaires et en particulier les UVB (315-280nm) sont directement absorbés par l'ADN et peuvent altérer son intégrité. Les mutations induites par les UV portent une signature particulière, caractérisée par un nombre important de transitions C > T (cytosine en thymine) et de transitions de dinucléotides CC > TT (figure 3). Ces sites di-pyrimidines sont formés par liaison covalente de deux bases pyrimidiques (cytosine, thymine, uracile) sous l'effet des rayonnements UV (Hayward et al., 2017; Pleasance et al., 2010). D'après les études publiées dans le catalogue des mutations somatiques des cancers (COSMIC), qui définissent les signatures des mutations selon les facteurs extérieurs qui les induisent, les signatures retrouvées dans les mélanomes cutanés sont celles qui correspondent aux substitutions UV induites (Alexandrov et al., 2013; Greenman et al., 2007; Hayward et al., 2017). Dans l'étude TCGA 75% des mélanomes cutanés primaires et 85% des mélanomes métastatiques présentent un enrichissement des transitions C > T aux sites dipyrimidiques (The Cancer Genome Atlas Network, 2015).

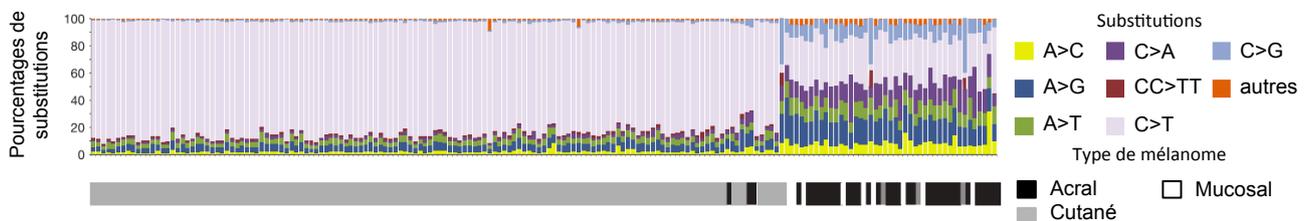


Figure 3 : Fréquences des substitutions dans les mélanomes. Deux catégories peuvent être séparées en se basant sur la signature UV induite des mutations (transitions C>T et CC>TT). Les mélanomes cutanés exposés aux rayonnements solaires présentent cette signature (d'après Hayward *et al.*, 2017).

2. Les mutations driver dans le mélanome

Parmi les mutations retrouvées dans les mélanomes certaines sont récurrentes et impliquées dans l'acquisition des caractéristiques tumorales. Elles touchent en particulier les voies métaboliques détaillées ci-dessous.

a) La voie des MAP kinases

La signalisation par la voie des MAPK (« mitogen-activated-protein kinases ») - ERK (« extracellular signal-related kinases ») est hautement conservée et impliquée dans un grand nombre de processus tels que la croissance, la différenciation et la survie cellulaire. Elle est activée par une grande variété de stimuli regroupant des facteurs de croissance, hormones, cytokines et les différents stress cellulaires par l'engagement de récepteurs membranaires (S. H. Yang, Sharrocks, & Whitmarsh, 2013). La signalisation se fait à la fois par la phosphorylation de substrats cytoplasmiques ou nucléaires par les acteurs terminaux de la voie, les protéines kinases ERK, mais également par la régulation transcriptionnelle de l'expression de gènes cibles (Burotto, Chiou, Lee, & Kohn, 2014; S. H. Yang et al., 2013) (figure 4). La voie MAPK-ERK est altérée dans environ 1/3 des tumeurs humaines et dans le cas du mélanome les protéines RAS, RAF et MEK sont respectivement mutées dans 15-29%, 50-60% et 3-8% des cas (Burotto et al., 2014). Ces mutations sont généralement mutuellement exclusives et entraînent une augmentation de l'activité des kinases indépendante des signaux d'activation en aval. La signalisation exacerbée par la voie MAPK-ERK conduit à une augmentation de la prolifération cellulaire et à une résistance à l'apoptose (Wan et al., 2004).

(i) Les mutations des protéines Ras

Les protéines Ras sont de petites GTPases de la famille des protéines G monomériques situées à la face cytoplasmique des membranes cellulaires. Leur activité est régulée par des cycles d'échanges GTP/GDP initiés par l'engagement des récepteurs auxquels leurs facteurs d'échange sont associés (figure 4). Sous leur forme active, Ras-GTP, elles initient la voie de signalisation MAPK, recrutent et activent la protéine Raf par phosphorylation. Trois isoformes Ras sont décrits chez l'Homme : H, K et N-Ras. Malgré la présence de mutations somatiques sur les trois isoformes dans les mélanomes cutanés, N-Ras est la protéine la plus fréquemment mutée, dans environ 28% des tumeurs (The Cancer Genome Atlas Network, 2015). La majorité de ces mutations a lieu sur le codon 61 par substitution de la glutamine par une leucine, une lysine ou une arginine. Ces mutations conduisent à l'activation constitutive de la protéine Ras et de la voie MAPK.

On observe également dans les mélanomes un fort taux de mutations (14%) du gène NF1 codant pour la neurofibromine, une protéine activatrice des Ras-GTPases (The Cancer

Genome Atlas Network, 2015). Les mutations de ce gène suppresseur de tumeurs inhibent son activité GAP (« GTPase activating protein ») et ainsi ont pour conséquence de diminuer la sénescence BRAF-induite, de favoriser l'hyperprolifération des mélanocytes et donc *in fine* de favoriser le développement de mélanomes (Maertens et al., 2017; Nissan et al., 2014; Philpott, Tovell, Frayling, Cooper, & Upadhyaya, 2017). Les mutations de NF1 sont également impliquées dans l'acquisition de la résistance aux traitements inhibiteurs de BRAF (Whittaker et al., 2013).

(ii) *Les mutations des protéines Raf*

La famille des sérine/thréonine kinases Raf est constituée de 3 membres : ARAF, BRAF et CRAF. Elles sont activées par l'interaction avec des Ras-GTPases et jouent un rôle d'intermédiaire dans la signalisation MAPK/ERK (figure 4). Les mutations sont rares sur les protéines ARAF et CRAF alors que les mutations de BRAF sont retrouvées dans plus de 50% des mélanomes primaires ou métastatiques. Dans plus de 90% des cas les mutations de BRAF ont pour cible la valine en position 600, située dans le domaine à activité kinase, substituée par un acide glutamique (mutation BRAF_{V600E}), ou plus rarement par une lysine ou une arginine (V600K, V600R) (Bradish et al., 2013). Cette substitution entraîne un gain de fonction de BRAF et une activation constitutive de MEK dans la voie de signalisation des MAP kinases. Bien que considérée comme une mutation « driver » sur-représentée dans les mélanomes, un génotype BRAF_{V600E} est également retrouvé dans plus de la moitié des nævi bénins (Ali, Yousaf, & Larkin, 2013; Pollock et al., 2002). La mutation de BRAF n'est donc pas une condition suffisante pour initier la genèse du mélanome mais elle pourrait survenir de façon précoce afin de potentialiser les effets d'autres stimuli oncogènes (Poynter et al., 2006). De plus, les mutations de BRAF sont plus fréquemment retrouvées dans les tumeurs de stades plus avancés, elles ne sont donc pas forcément impliquées dans l'initiation de la tumorigenèse mais plutôt dans l'hyperplasie des nævi bénins puis dans la croissance des tumeurs en association avec d'autres mutations (Greene, Johnson, Grimm, & Ellerhorst, 2009).

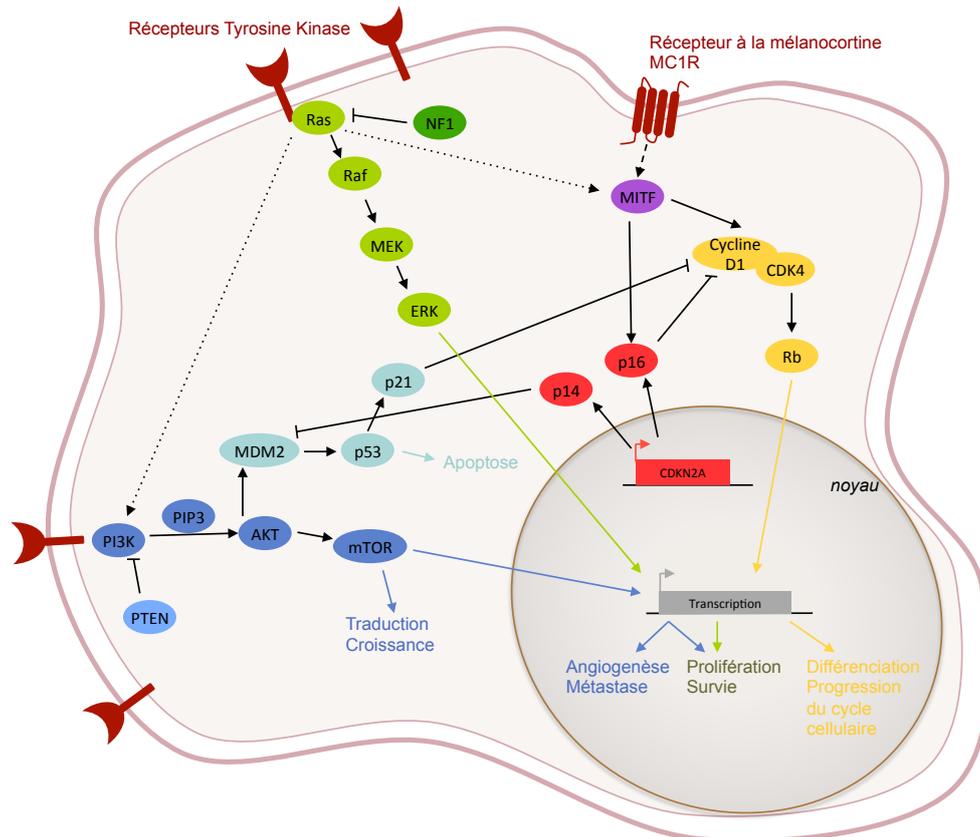


Figure 4 : Voies de signalisation impliquées dans l'oncogenèse du mélanome. (D'après Miller and Mihm, 2006; Eggermont, Spatz and Robert, 2014; The Cancer Genome Atlas Network, 2015).

b) PTEN dans la voie PI3K/AKT

La voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT est un régulateur critique de la physiologie cellulaire mais aussi l'une des plus activées dans les cancers. L'engagements de ligands sur des récepteurs de type tyrosine/kinase (RTK) couplés à des protéines G (GPCRs : « G proteins coupled receptors ») ou la protéine Ras-GTP activée entraînent l'activation de la PI3K qui convertit le phosphatidylinositol (4,5) biphosphate ou PIP2 en phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate ou PIP3 (figure 4). Le PIP3 permet de recruter la « phosphatidylinositol-dépendant kinase 1 » (PDK1) qui active des protéines telles que AKT (ou protéine kinase B, PKB) en la phosphorylant. Une fois activée, la kinase AKT peut exercer son rôle sur le métabolisme, la traduction de protéines cibles (par l'intermédiaire du complexe mTOR), la prolifération et la survie cellulaire ou encore l'angiogenèse (M. a. Davies, 2012; Hers, Vincent, & Tavaré, 2011) (figure 4).

Bien que fréquemment activées par des mutations somatiques ou des changements du nombre de copies de gènes dans une variété de types tumoraux, *PI3K* et *AKT* sont

rarement atteintes par des événements oncogéniques dans le mélanome cutané (Omholt, Kröckel, Ringborg, & Hansson, 2006). Cependant, le gène suppresseur de tumeur *PTEN* codant pour une phosphatase qui dé-phosphoryle le PIP3, présente une délétion allélique ou une expression altérée dans respectivement 20% et 40% des mélanomes (Hensin Tsao, Chin, Garraway, & Fisher, 2012). Les événements affectant *PTEN* sont essentiellement des changements de cadre de lecture ou des modifications épigénétiques qui lèvent l'inhibition de la voie PI3K/AKT (Aguissa-Touré & Li, 2012; M. a. Davies, 2012; Zhou et al., 2000). La perte de fonction de *PTEN* est mutuellement exclusive avec la mutation de *NRAS* mais concomitante avec les mutations de *BRAF* : cette association permet une activation constitutive des voies MAPK/ERK et PI3K/AKT en s'affranchissant de signaux d'initiation tels que l'engagement des récepteurs de surface ou le complexe Ras-GTP (figure 4) (Goel, Lazar, Warneke, Redston, & Haluska, 2006; H Tsao, Zhang, Fowlkes, & Haluska, 2000).

Enfin, l'activation de la voie PI3K dans les tumeurs a également un rôle sur les cellules endothéliales et les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral et favorise la croissance tumorale et l'invasion (Koyasu, 2003; T L Yuan & Cantley, 2008; Tina L Yuan et al., 2008).

c) Le facteur de transcription MITF

Le facteur de transcription MITF (« Microphthalmia-associated transcription factor ») en influant sur la différenciation et la progression du cycle cellulaire des mélanocytes est un régulateur essentiel de leur développement, de leur fonction et de leur survie (Hodgkinson et al., 1993). MITF est en particulier impliqué dans la cascade de signalisation permettant la production de pigments en activant la transcription des gènes responsables de la production de mélanine (Hensin Tsao et al., 2012). Il permet aussi l'activation de l'expression d'antigènes spécifiques des mélanocytes comme MelanA/Mart1 (J. Du et al., 2003) ou de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (J. Du et al., 2004; Loercher, Tank, Delston, & Harbour, 2005). MITF est induit dans les mélanocytes par l'engagement du récepteur à la mélanocortine MCR1 par son ligand l' α -MSH (« Melanocyte Stimulating Hormon ») (Levy, Khaled, & Fisher, 2006).

MITF a été identifié comme un oncogène lignage-spécifique car il est amplifié dans 10% des mélanomes primaires, 21% des mélanomes métastatique mais pas dans les nævi bénins (Garraway et al., 2005b). Cette amplification génique, en particulier cumulée avec

l'activation constitutive de la voie des MAPK ou la dérégulation du cycle cellulaire permet donc la transformation et/ou la survie tumorale (Garraway et al., 2005b). De plus, on observe une survie globale à 5 ans diminuée chez les patients présentant une augmentation somatique du nombre de copies du gène. MITF peut également subir des mutations somatiques ponctuelles, en particulier dans le cas de mélanomes familiaux (Bertolotto et al., 2011; Cronin et al., 2009).

Les modifications (SVN, amplifications, délétions) de ces différents gènes sont retrouvées dans une majorité de mélanomes, seules ou en association. Dans le cas du mélanome les mutations UV induites sont accumulées tout au long de la vie et la survenue de mutations driver isolées ne semble pas être suffisante pour modifier le phénotype et les fonctions des cellules (Martincorena et al., 2015). Dans l'étude de Martincorena et collaborateurs, des mutations dont le rôle a été décrit dans les mélanomes ont en effet été retrouvées dans environ ¼ des cellules d'un tissu exposé aux UV (la paupière) sans pour autant provoquer de tumeurs. Cependant elles sont conservées dans le génome des cellules et dans le cas de la survenue de mutations driver complémentaires les effets combinés peuvent conduire à la transformation tumorale.

II. L'environnement tumoral

A. Le contexte inflammatoire pro-tumoral

Au sein des masses tumorales hétérogènes, on retrouve une infiltration de cellules immunitaires de l'immunité innée et de l'immunité adaptative (Dvorak, 1986). Malgré un rôle initial de contrôle de la prolifération des cellules tumorales il semble que ces acteurs immunitaires et notamment ceux de l'immunité innée puissent favoriser l'acquisition des « hallmarks » et la progression tumorale (Colotta, Allavena, Sica, Garlanda, & Mantovani, 2009; DeNardo, Andreu, & Coussens, 2010; B. Z. Qian & Pollard, 2010). En effet, le maintien de l'inflammation fournit des molécules bioactives à l'environnement tumoral telles que des facteurs de croissance, de survie, pro-angiogéniques ainsi que des enzymes qui facilitent les processus d'invasion et de dissémination métastatique (Hanahan & Weinberg, 2011). De plus, les cellules immunitaires relarguent des dérivés réactifs de l'oxygène (ou ROS :

« reactive oxygen species ») hautement mutagènes pour les cellules environnantes, participant ainsi à l'instabilité génétique (Grivennikov, Greten, & Karin, 2010).

B. Le stress cellulaire

Le stress cellulaire n'est pas décrit comme un facteur favorisant l'émergence des caractéristiques indispensables des cellules tumorales, cependant une fois les tumeurs établies, son action modifie les capacités métaboliques des cellules et participe à l'évolution du phénotype tumoral. L'une des caractéristiques des tumeurs solides en particulier est de présenter des défauts d'approvisionnement des cellules en oxygène et en nutriments (glucose, acides aminés). Malgré l'activation des voies d'angiogenèse, la néo-vascularisation imparfaite conduit la majorité des tumeurs à des situations d'hypoxie et de privations de nutriments. Des études ont même démontré que l'hypoxie pouvait participer à la transformation et à la progression cellulaire (J. T. Lee & Herlyn, 2007; X. Ma, Zhang, Xue, & Shah, 2017; Michaylira & Nakagawa, 2006).

De plus, la combinaison de l'hypoxie et de la privation de nutriments favorise une augmentation de la production de protéines non fonctionnelles au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Les cellules subissent alors un stress du RE qui provoque une « réponse aux protéines non conformées » ou UPR (« Unfolded Protein Response »). L'UPR est transduite par les trois principaux médiateurs de la réponse au stress cellulaire, IRE1, PERK et ATF-6 situés à la paroi du réticulum endoplasmique, qui une fois activés entraînent une réponse cellulaire dont le but principal est de restaurer l'homéostasie du RE et d'assurer la survie cellulaire (figure 5A). Pour cela les signaux de stress exercent des actions directes sur le métabolisme de la cellule. On observe par exemple une adaptation du métabolisme énergétique à des conditions anoxiques (Effet Warburg) et la mise en place de processus tels que l'autophagie pour tenter de compenser la privation d'acides aminés (J. Y. Guo & White, 2016; Xie & Simon, 2017). Les conséquences de ces modifications métaboliques sont paradoxales et dépendent de la durée, l'intensité et l'intégration des signaux de stress. Ils semblent favoriser la transformation des cellules et leur acquisition de caractéristiques tumorales cependant le maintien des conditions de stress ou leur sévérité peut entraîner la mort cellulaire (figure 5B) (Bedogni & Powell, 2009; Clarke, Chambers, Liniker, & Marciniak, 2014; X. Ma et al., 2017; Maxwell et al., 1997). Le stress cellulaire observé au sein des

tumeurs a également un impact sur les cellules du système immunitaires infiltrantes. L'expression des médiateurs de l'UPR permet en effet d'établir au sein des tumeurs un environnement immunosuppresseur favorable à la croissance tumorale (Cubillos-Ruiz, Bettigole, & Glimcher, 2017; Mohamed, Cao, & Rodriguez, 2017; M. Wang & Kaufman, 2014).

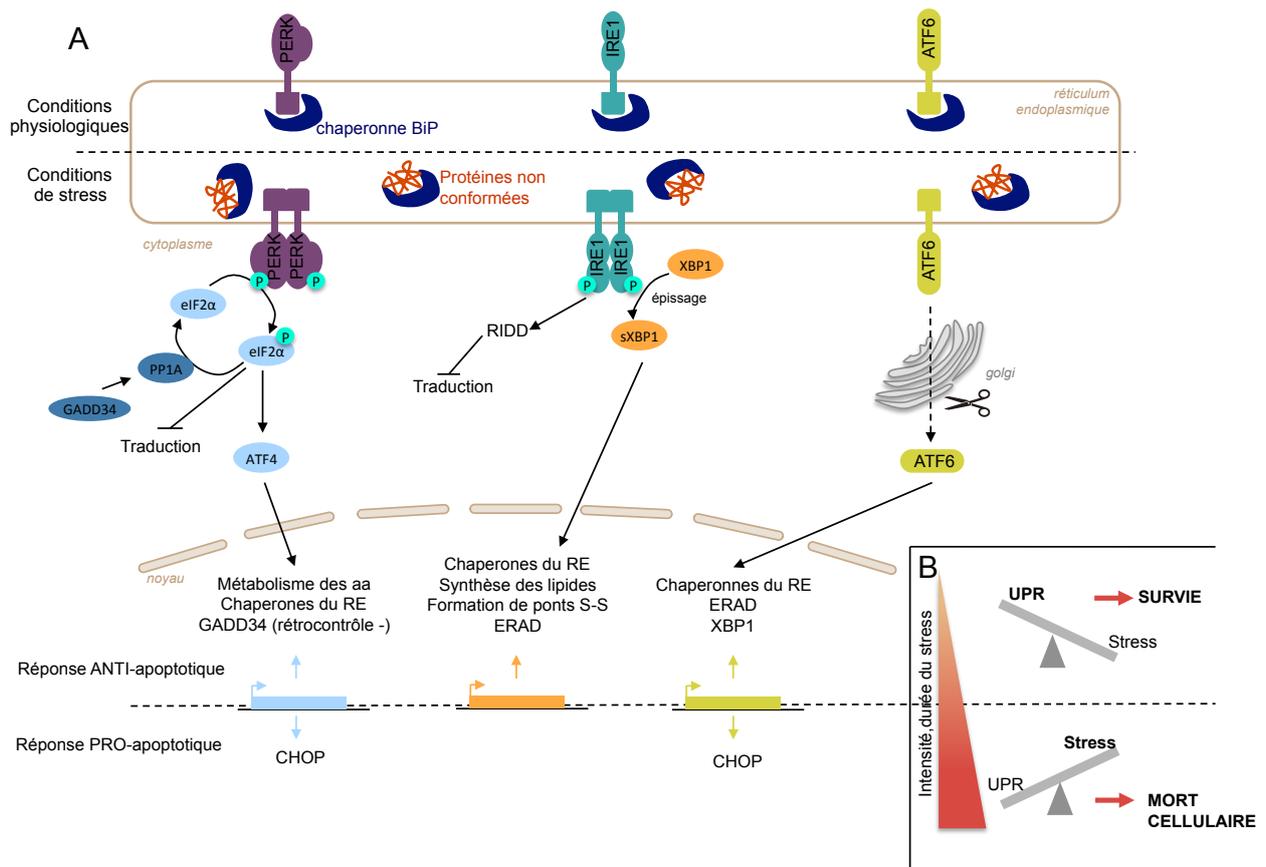


Figure 5 : Voies de signalisation de l'UPR. (A) L'association des chaperones réticulaires BiP avec les protéines non conformées dans la lumière du RE entraîne l'activation de trois senseurs du stress : PERK, IRE1 et ATF6 par dimérisation et auto-phosphorylation (PERK, IRE1) ou clivage dans l'appareil de Golgi (ATF6). L'activation de la réponse au stress entraîne une diminution globale de la traduction par la phosphorylation d'eIF2α et la dégradation des ARN messagers (RIDD : « regulated IRE1-dependent decay »). A l'inverse, l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire est activée par les facteurs de transcription ATF4, ATF6 et sXBP1. Ils permettent également d'activer l'expression de médiateurs de l'apoptose (CHOP). (B) L'intensité et la durée du stress du réticulum orientent l'issue de l'UPR vers la survie cellulaire ou l'induction de l'apoptose. Adapté de (Rufo, Garg, & Agostinis, 2017).

En complément des conséquences métaboliques on observe dans ces cellules stressées des modifications des modes d'expression des protéines et même de la composition du pool de protéines cellulaire lui-même. L'une des actions les plus précoces de la réponse au stress du réticulum est une inhibition globale de la traduction afin de tenter de conformer correctement le pool de protéines déjà traduit et séquestré par des chaperonnes du réticulum (chaperonnes BiP) (figure 5A). Cette inhibition touche en particulier la traduction dépendante de la coiffe 5' des ARNs. En effet d'un point de vue moléculaire le stress cellulaire induit la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α ce qui le rend indisponible pour jouer son rôle dans l'association de la sous unité 40S du ribosome et de la coiffe 5'. Cependant la traduction de certaines protéines est maintenue, notamment celle de facteurs de transcription impliqués dans l'UPR (Clarke et al., 2014). L'activation de modes de traduction alternatifs insensibles à l'inhibition de la traduction coiffe-dépendante permet également aux cellules tumorales en situation de stress de produire un ensemble de protéines uniques et donc spécifiques qui peuvent constituer des cibles thérapeutiques de choix. Le mécanisme d'inhibition d'eIF2 α sera développé plus en détail dans la Partie 2 I-A-2.

2- Génération des antigènes tumoraux.

La reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire et la réaction qui en découle reposent sur l'expression de protéines spécifiques ou antigènes de tumeur. Depuis le clonage du premier gène codant pour un antigène de tumeur reconnu par des lymphocytes T en 1991, l'identification moléculaire et la caractérisation des antigènes de tumeur a connu un essor considérable (van der Bruggen et al., 1991).

A l'heure actuelle, on considère que la majorité des antigènes cellulaires sont issus de la dégradation de protéines intracellulaires par le protéasome, protéase intracellulaire constituée de multiples sous-unités catalytiques. Les peptides produits par cette digestion partielle sont ensuite associés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) puis présentés à la membrane des cellules où ils peuvent être reconnus par les lymphocytes. Selon les molécules CMH sur lesquelles les peptides antigéniques sont présentés ils activeront les lymphocytes T CD8⁺ (CMH de classe I) ou CD4⁺ (CMH de classe II). Les lymphocytes T sont capables de reconnaître des cellules portant très peu de complexes peptide-CMH (10 par cellule au minimum) et des changements même discrets dans la composition protéique de la cellule peuvent être détectés à condition d'être présentés au système immunitaire (Kageyama, Tsomides, Sykulev, & Eisen, 1995). Les antigènes cibles de l'immunothérapie doivent posséder les caractéristiques suivantes : une expression suffisante pour que la détection par les cellules immunitaires induise une réponse efficace, et suffisamment restreinte pour pouvoir cibler spécifiquement les cellules tumorales sans provoquer de réaction auto-immune sur les cellules saines.

Les antigènes tumoraux sont classés selon plusieurs critères dont les plus consensuels sont leur profil d'expression cellulaire et leur origine moléculaire. Des classifications complémentaires se basent sur le partage des antigènes par plusieurs types tumoraux ou plusieurs patients, la stabilité de l'expression sous la pression de sélection immunitaire et la spécificité ou non de l'expression des antigènes restreinte aux cellules tumorales (Kvistborg, van Buuren, & Schumacher, 2013).

I. Les antigènes issus de la traduction classique

A. Rappels sur les mécanismes de traduction coiffe-dépendante dans les cellules eucaryotes

1. Le modèle général

Le contrôle de la traduction est le niveau le plus en aval de régulation de l'expression des gènes. En comparaison de la régulation transcriptionnelle qui implique toute la chaîne d'expression, les variations de la traduction des ARN messagers entraînent des changements immédiats du protéome. Ces modifications sont associées avec la plupart des désordres cellulaires (infections, transformations, modifications de l'environnement cellulaire).

Le mécanisme de traduction coiffe-dépendant est décrit pour une certaine catégorie d'ARNs : les ARNs messagers monocistroniques qui possèdent à leur extrémité 5' une coiffe 7-méthylguanosine, codent pour un cadre de lecture ouvert (ORF : « open reading frame ») unique de plus de 100 codons commençant par un codon d'initiation AUG et dont l'extrémité 3' porte une queue poly-adénylée. Le processus de traduction est divisé en trois grandes étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison (figure 6).

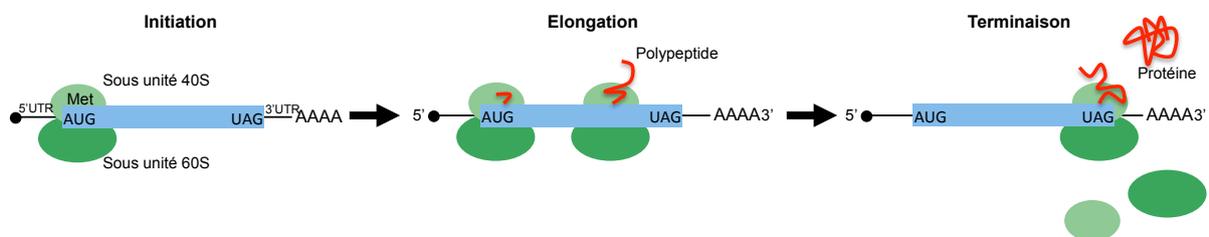


Figure 6 : Les trois phases de la traduction eucaryote.

Les ribosomes, complexes ribonucléoprotéiques, sont le cœur de la machinerie de synthèse des protéines. Ils sont composés de deux sous unités : la grande sous-unité et la petite, respectivement 60S et 40S chez les mammifères qui s'associent pour former le ribosome 80S. Les sous unités sont recrutées sur les ARNm de façon séquentielle durant la phase d'initiation. A la suite de l'initiation le ribosome 80S commence la synthèse protéique en associant à chaque codon de l'ORF l'ARNt contenant l'anti-codon correspondant. Les acides aminés associés aux tRNAs sont liés les uns aux autres par des liaisons peptidiques

formant la future protéine. C'est la phase d'élongation (Dever & Green, 2012; Lareau, Hite, Hogan, & Brown, 2014). Lorsque le ribosome atteint un codon STOP (UAA, UAG ou UGA) l'étape de terminaison entraîne la libération de la protéine nouvellement formée, la dissociation des sous-unités du ribosome et des facteurs de traduction dont certains sont recyclés (Dever & Green, 2012; Scheper, van der Knaap, & Proud, 2007).

La finalité de la phase d'initiation est d'associer un ribosome complet (80S) à l'ARNm à traduire au niveau du codon d'initiation. Chez les eucaryotes le modèle d'initiation le plus répandu est le scanning, c'est à dire que la petite sous unité du ribosome entre sur l'ARNm au niveau de la coiffe en 5' et scanne ou lit les différents codons jusqu'à rencontrer un codon d'initiation, s'y associer et recruter la sous unité 60S pour commencer l'élongation (Hinnebusch, 2014; Kozak, 1978).

Pour cela, un certain nombre de facteurs d'initiation ou eIFs (« eukaryotic initiation factors ») entrent en jeu. Les étapes de l'initiation de la traduction décrites ci-dessous sont illustrées sur la figure 7. Dans un premier temps, la petite sous-unité ribosomale 40S se complexe avec les facteurs d'initiation eucaryotes eIF 1, 1A, 3 et 5 ainsi qu'au complexe ternaire (TC) Met-tRNA_i – eIF2-GTP pour former le complexe 43S (Feoktistova et al., 2013; Passmore et al., 2007). Celui-ci est recruté sur l'ARN au niveau de la coiffe 7-methylguanosine qui couvre l'extrémité 5' du transcrit. La liaison avec l'ARN peut se faire sans intervention de facteurs supplémentaires mais à cause des repliements des régions 5'UTR, elle doit être guidée par le complexe de liaison à la coiffe (CBC), composé d'eIF4F, eIF4B et eIF4H (Pestova & Kolupaeva, 2002).

eIF4F est un complexe composé des trois protéines eIF4G, eIF4E et eIF4A nécessaire au bon positionnement du complexe 43S sur l'extrémité 5'. eIF4G sert de protéine d'échafaudage sur laquelle viennent se fixer eIF4E qui possède un site de reconnaissance de la coiffe et eIF4A qui possède une activité hélicase et permet de déstructurer la région 5' de l'ARN afin de faciliter sa lecture par le ribosome. Ensemble, les complexes eIF4E et 43S forment la sous unité du ribosome 48S aussi appelée complexe de pré-initiation (PIC). Lorsque ces éléments sont assemblés sur l'ARNm, celui-ci se replie sous l'effet de protéines de liaison à la queue poly(A) (PABP) et font le pont entre les extrémités 5' et 3' de l'ARNm (Mangus, Evans, & Jacobson, 2003).

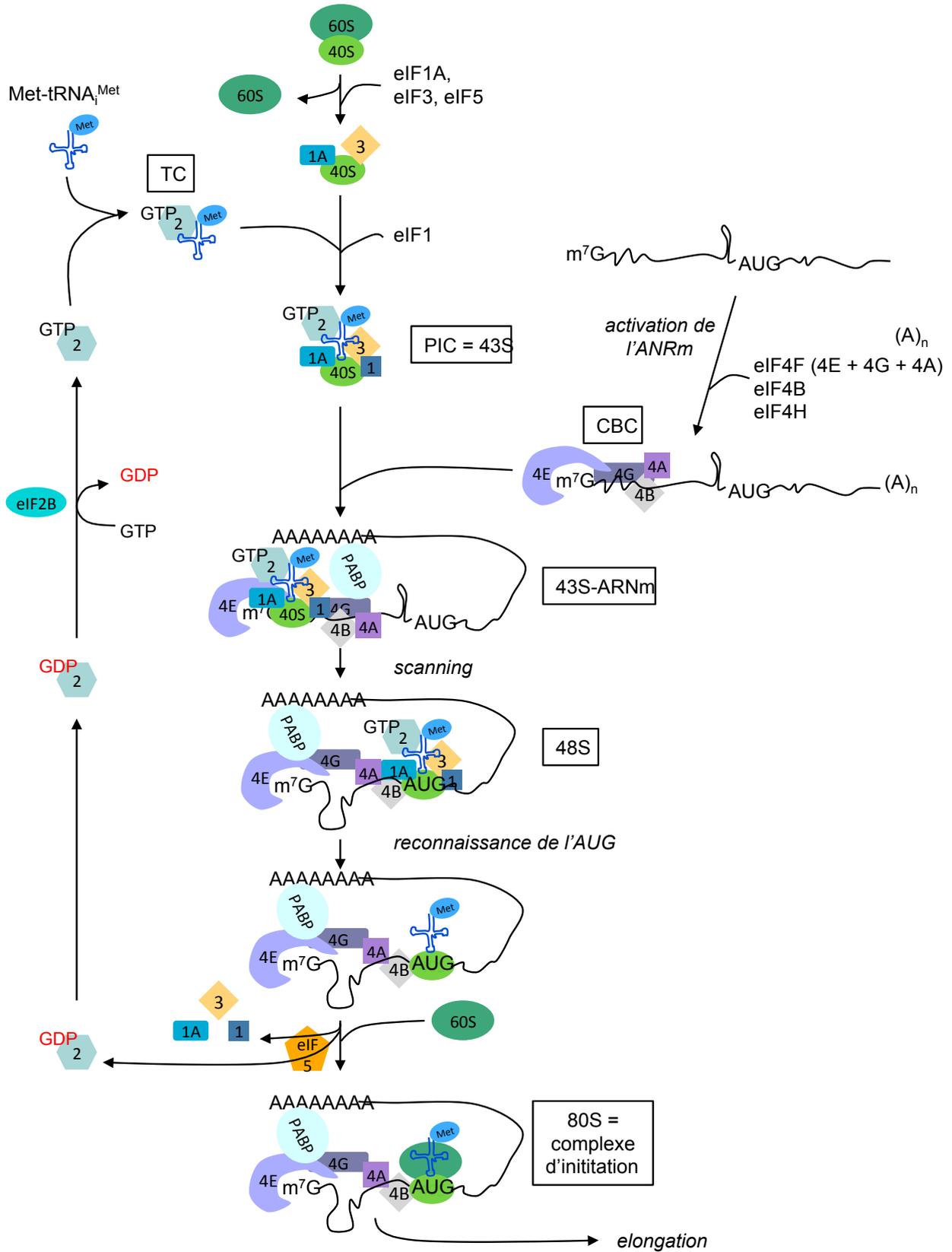


Figure 7: Schéma récapitulatif des mécanismes d'initiation de la traduction coiffe dépendante chez les eucaryotes. TC : ternary complex ; PIC : pre-initiation complex ; CBC : cap-binding complex

Une fois le complexe de pré-initiation formé le scanning de l'ARNm commence et lorsque le ribosome 43S reconnaît un codon d'initiation il se stabilise à son niveau grâce à la complémentarité avec l'anticodon de l'ARN de transfert Met-tRNA_i^{Met}. Le facteur d'initiation eIF2α-GTP est hydrolysé en eIF2α-GDP puis recyclé et lui et les autres facteurs eIF du PIC sont relargués. L'assemblage de la sous unité 60S avec le complexe 40S-Met-tRNA_i^{Met}-AUG est alors possible pour former le ribosome 80S et poursuivre la traduction.

2. La régulation de la phase d'initiation de la traduction

L'initiation est l'étape critique pour la traduction des protéines, c'est pourquoi la majorité des mécanismes de régulation de la traduction sont mis en œuvre à ce stade (R. J. Jackson, Hellen, & Pestova, 2010; Nahum Sonenberg & Hinnebusch, 2009). L'intégration de signaux par différents récepteurs tels que les récepteurs aux hormones, par mesure de la disponibilité intra-cytoplasmique d'acides aminés, hèmes ou de glucose ainsi que les différents types de stress cellulaire ont un rôle direct sur la régulation de l'initiation de la traduction. Ils s'accompagnent souvent d'un stress du réticulum qui déclenche alors des voies de réponse au stress particulières regroupées sous le terme UPR (« unfolded protein response »). Pour que la cellule puisse gérer le surplus de protéines mal conformées, l'UPR va bloquer la traduction, permettant aux protéines déjà présentes dans le réticulum endoplasmique de prendre une conformation correcte ou bien d'être dégradées. Cela permet également de limiter la consommation énergétique de la cellule car le processus de traduction est l'un des plus gros consommateurs de d'énergie (jusqu'à 50%) (Martin Holcik & Sonenberg, 2005; Rolfe & Brown, 1997; Warner, 1999).

Ces différents signaux intégrés par les cellules entraînent l'activation ou l'inhibition globale de la traduction. Pour cela ils influent sur la formation de deux complexes indispensables à l'initiation de la traduction : le complexe de liaison à la coiffe (CBP) et le complexe ternaire (TC). La modulation de la formation de ces complexes repose sur la phosphorylation de deux protéines clés : respectivement 4E-BP1 et eIF2α.

a) L'inhibition d'eIF4E par 4E-BP1.

L'un des points de régulation de l'initiation est la formation du complexe de liaison à la coiffe dont eIF4F est le composant principal. Au sein de ce complexe, eIF4E, protéine de liaison à la coiffe et activateur de l'hélicase eIF4A, est le facteur dont l'activité est la plus régulée (Feoktistova, Tuvshintogs, Do, & Fraser, 2013; N Sonenberg, Morgan, Merrick, & Shatkin, 1978). Cette régulation se fait à plusieurs niveaux.

Tout d'abord le facteur d'initiation eIF4E peut être phosphorylé par les kinases Mnk1 et Mnk2 (« MAPK-interacting kinases ») sur la sérine en position 209 (Flynn & Proud, 1995; Joshi et al., 1995). Si l'impact de la phosphorylation d'eIF4E est sujet à débat, son implication dans les processus tumoraux est particulièrement documentée (Proud, 2015). En effet, eIF4E est décrit comme étant un proto-oncogène et sa forme phosphorylée semble augmenter l'activité oncogénique (Avdulov et al., 2004; Fan et al., 2009; Furic et al., 2010; a E. Koromilas, Lazaris-Karatzas, & Sonenberg, 1992; Lazaris-Karatzas, Montine, & Sonenberg, 1990; Robichaud et al., 2014; Ueda et al., 2010; F. Yang, Zhang, Mei, & Wu, 2014). On observe ainsi une surexpression d'eIF4E dans de nombreux cancers, souvent associé à un mauvais pronostic (De Benedetti & Graff, 2004; Hsieh & Ruggero, 2010; Khosravi et al., 2015). Dans les cellules tumorales la surexpression d'eIF4E permet d'orienter la machinerie vers la traduction d'ARNm dont les produits sont impliqués dans les processus oncogéniques de prolifération, survie, angiogenèse ou encore dans la formation de métastases (Mamane et al., 2004; Wendel et al., 2007).

De plus, l'activation de la traduction par eIF4E est régulée par sa disponibilité pour la formation du complexe eIF4F. En effet, elle interagit avec des protéines de la famille 4E-IP (« eIF4E interacting proteins ») dont le membre le plus connu est 4E-BP1 (« 4E binding protein 1 »). Sous sa forme hypo-phosphorylée, 4E-BP1 séquestre eIF4E, l'empêchant ainsi de former le complexe eIF4F (Gingras et al., 2001; Marcotrigiano, Gingras, Sonenberg, & Burley, 1999; Siddiqui et al., 2012). La phosphorylation de 4E-BP1, principalement contrôlée par la voie PI3k/Akt/mTOR en réponse à des signaux de croissance cellulaire, diminue l'affinité de 4E-BP1 pour eIF4E et conduit à l'activation de la synthèse protéique (figure 8) (Laplante & Sabatini, 2013; Leprivier, Rotblat, Khan, Jan, & Sorensen, 2015a; Reiling & Sabatini, 2006). En tant qu'inhibiteur d'eIF4E, 4E-BP1 est décrit comme un facteur suppresseur de tumeur (Polunovsky et al., 2000; Rousseau, Gingras, Pause, & Sonenberg, 1996). De fait, des études dans différents types tumoraux ont montré une hyper-

phosphorylation (inactivation) de 4E-BP1 ce qui favorise la prolifération des cellules tumorales (pour revue (Musa et al., 2016a)). En revanche, en cas de stress cellulaire, la surexpression et la déphosphorylation de 4E-BP1 sont souvent observées afin de ralentir la synthèse protéique et / ou de favoriser la mort cellulaire en cas de stress non résolu (Yamaguchi et al., 2008).

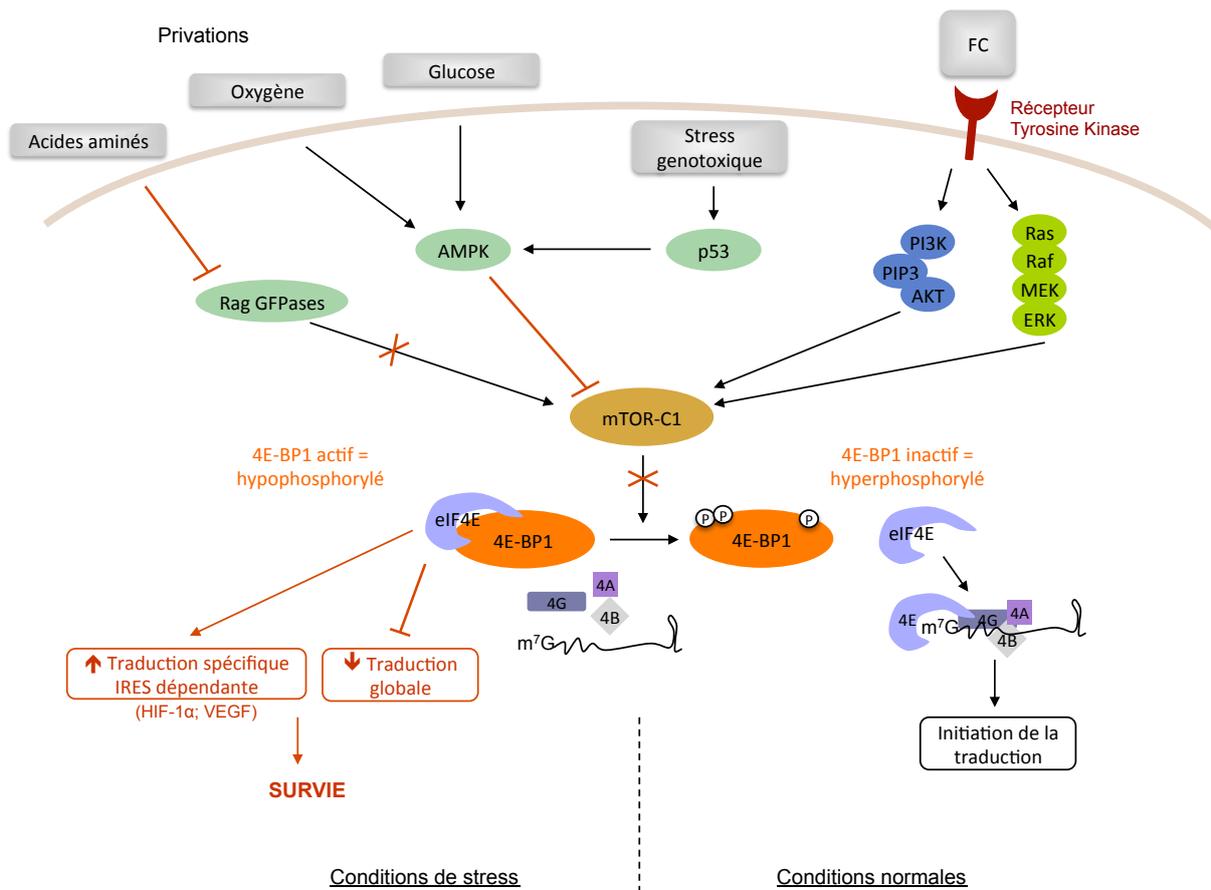


Figure 8 : Régulation de la formation du complexe eIF4F par la phosphorylation de 4E-BP1. L'activation de 4E-BP1 dépend directement de l'activité kinase de mTORC-1 ("mammalian Target Of Rapamycin"). Elle est sous le contrôle de l'intégration de différents signaux tels que les facteurs de croissance, la disponibilité de nutriments ou d'oxygène. L'activation de 4E-BP1 en conditions de stress induit l'inhibition de la traduction globale et l'activation de la traduction de transcrits spécifiques impliquant des modes de traduction alternatifs. Adapté de (Leprivier, Rotblat, Khan, Jan, & Sorensen, 2015b; Musa et al., 2016b).

Le rôle de 4E-BP1 dans la régulation de la traduction est en fait plus complexe qu'une simple inhibition globale de la synthèse protéique due à l'inhibition de formation du complexe eIF4F. En effet, 4E-BP1 actif (hypo-phosphorylé) exerce une inhibition préférentielle de la traduction d'ARNs aux extrémités 5'UTR longues, riches en G/C et fortement structurées. Ces ARNs qui codent par exemple les protéines c-Myc, Cycline-D1, FGF2, VEGF sont très dépendants de l'activité hélicase d'eIF4F pour l'initiation de la traduction, c'est pourquoi ils sont fortement sensibles aux variations de la disponibilité d'eIF4E (De Benedetti & Graff, 2004; Graff, Konicek, Carter, & Marcusson, 2008; Kevil, Carter, Hu, & DeBenedetti, 1995; a E. Koromilas et al., 1992; Rosenwald et al., 1995). L'inhibition de traduction de ces protéines sous-tend la capacité de 4E-BP1 à bloquer le cycle cellulaire (Fingar et al., 2004; Fingar, Salama, Tsou, Harlow, & Blenis, 2002; Fingar & Blenis, 2004).

b) Impact de la phosphorylation d'eIF2 α .

Le complexe ternaire composé du facteur d'initiation eIF2-GTP et de l'ARN de transfert initiateur Met-tRNA_i permet la liaison de ce dernier avec la sous unité 40S du ribosome indispensable pour l'initiation de la traduction. La liaison d'eIF2 avec le GTP est l'étape limitante de la formation de ce complexe et est particulièrement sensible à différents types de stress cellulaire. En effet, dans des conditions de stress, la sous-unité α d'eIF2 est phosphorylée sur la sérine 51 ce qui rend l'échange GDP / GTP et donc la formation du complexe ternaire impossible. Cet échange est catalysé par eIF2B qui possède une activité GEF (« guanine exchange factor ») (figure 9) (Dever *et al.*, 1992; Clemens, 2004; Koromilas, 2014). De plus, la phosphorylation d'eIF2 α stabilise sa liaison avec eIF2B, qui n'est alors plus disponible pour activer de nouveaux complexes eIF2-GDP car en concentration limitante. C'est pourquoi des modifications même très fines du ratio eIF2 α /eIF2 α ^{P51S} ont des conséquences directes sur le niveau de traduction protéique. La phosphorylation d'eIF2 α est réalisée par quatre kinases homologues pour leur domaine catalytique mais comportant des domaines régulateurs variables. Elles sont sensibles à des signaux de stress différents mais déclenchent toutes des voies de stress communes (figure 9) (Martin Holcik & Sonenberg, 2005; Kimball, 2001; Ron, 2002).

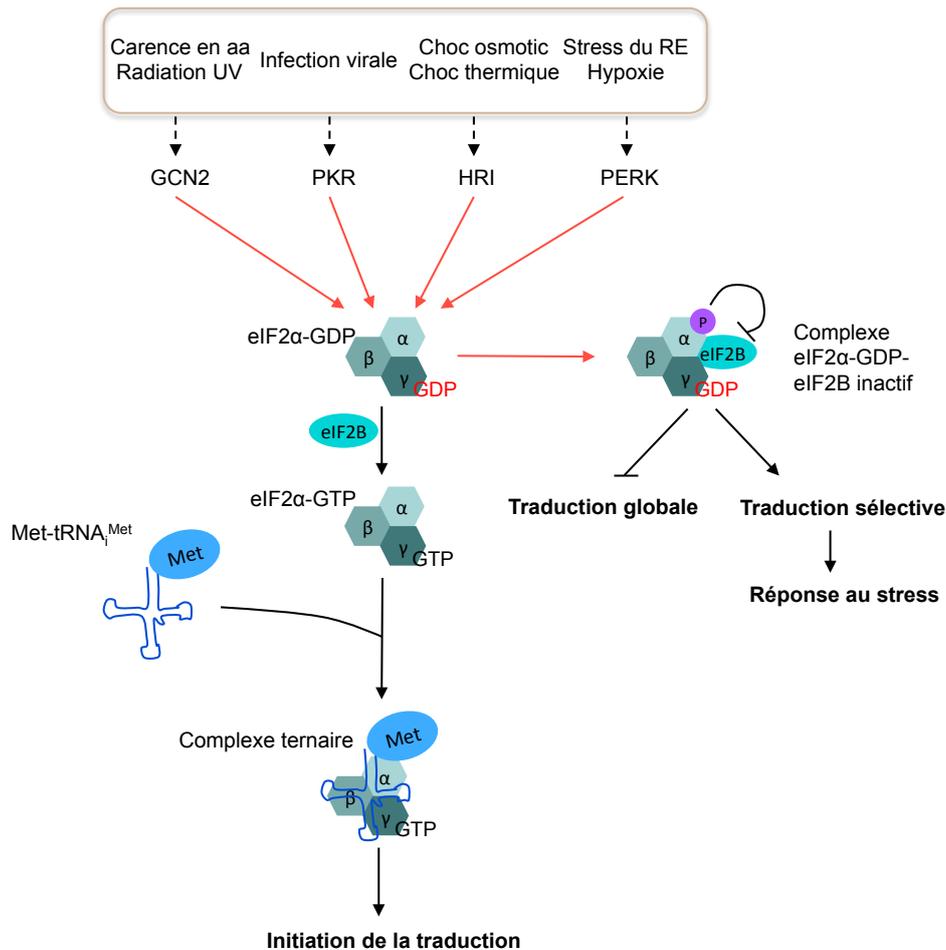


Figure 9 : Intégration de la réponse au stress par la phosphorylation d'eIF2α. En réponse à différents stress cellulaires la sous unité α du facteur de traduction eIF2 est phosphorylée par quatre kinases (GCN2, PKR, HRI, PERK). Sous cette forme, son association avec eIF2B est stabilisée, ce qui inhibe la fonction GEF d'eIF2B et donc la formation du complexe ternaire eIF2α-GTP-Met-tRNA^{Met}. Sans formation de ce complexe, la traduction globale est inhibée tandis que les voies de réponse au stress cellulaire sont activées. Adapté de (Martin Holcik & Sonenberg, 2005).

La phosphorylation d'eIF2α entraîne une diminution globale de la traduction et paradoxalement l'activation de la traduction de quelques ARNs spécifiques (Harding, Novoa, et al., 2000; Harding, Zhang, Bertolotti, Zeng, & Ron, 2000; M Holcik, Yeh, Korneluk, & Chow, 2000). Les protéines concernées par cette activation sont notamment celles dont l'expression est requise pour la survie en conditions de stress telles que le facteur de transcription ATF4 (« Activating transcription Factor-4 ») (P. D. Lu, Harding, & Ron, 2004; Pavitt & Ron, 2012; Vattem & Wek, 2004). L'ARNm codant pour ATF4 comporte deux ORFs en amont de celui d'ATF4 ou uORFs (« upstream ORFs ») dans sa région 5'UTR qui sont traduits en conditions normales : le premier très court (3aa) de façon coiffe dépendante et le

second, qui chevauche l'ORF d'ATF4 par réinitiation du ribosome (figure 10). Dans ces conditions ATF4 n'est pas traduit. En conditions de stress cellulaire, l'augmentation de la forme phosphorylée d'eIF2 α entraîne un retard dans la réinitiation des ribosomes sur l'ARN et dans ce cas certains peuvent atteindre le codon initiateur d'ATF4 (figure 10).

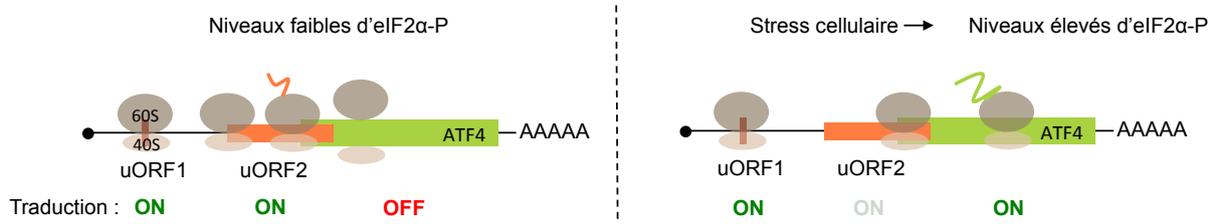


Figure 10: Contrôle de la traduction d'ATF4 par ses uORFs. Selon les conditions cellulaires, normales (à gauche) ou de stress (à droite), les protéines ou polypeptides traduits à partir de l'ARNm ATF4 varient. uORF1 (marron) est constamment traduit et c'est sa réinitiation qui est plus ou moins retardée en fonction de la disponibilité du facteur d'initiation eIF2 α . En conditions normales uORF2 (orange) est exprimé tandis qu'en conditions de stress sa traduction est très réduite au profit de celle de l'ORF ATF4 (vert).

D'autres ARNs peuvent être traduits dans les conditions de stress par des mécanismes indépendants de la coiffe, grâce à la présence dans les régions 5' ou 3' UTR de séquences IRES.

Ces modes de traduction eIF2 α -indépendants dans des conditions de stress cellulaire, qu'ils soient dûs à l'environnement comme ceux décrits précédemment dans le cas des cellules tumorales ou bien associés à des infections virales, mettent en jeu des systèmes de recrutement particuliers de l'ARN initiateur et de la sous unité 40S du ribosome. Des protéines ou complexes protéiques tels que ligatine/eIF2D, eIF5B ou eIF2A ont ainsi été décrits comme facilitant le recrutement de l'ARNt initiateur Met-tRNAi au complexe ribosome 40S-ARNm lorsque la forme eIF2 α ^{P51S} est majoritaire (Joon Hyun Kim, Park, Park, Keum, & Jang, 2011; Pestova, de Breyne, Pisarev, Abaeva, & Hellen, 2008; Reineke, Cao, Baus, Hossain, & Merrick, 2011; Skabkin et al., 2010; Terenin, Dmitriev, Andreev, & Shatsky, 2008a).

Le mode de traduction coiffe-dépendante est largement majoritaire, parmi les protéines qui en sont issues on retrouve donc une fraction importante des antigènes décrits.

B. Les antigènes de tumeur traduits de façon coiffe-dépendante

1. Les antigènes cancer germline

Parmi les premiers antigènes tumoraux identifiés figurent les antigènes cancer-germline. Les gènes codant pour ces antigènes sont physiologiquement exprimés dans les cellules de la lignée germinale mâle et dans le trophoblaste placentaire et majoritairement absents des autres tissus adultes. Ils peuvent cependant être ré-exprimés par les cellules tumorales grâce à une hypo-méthylation de leur promoteur. Cette modification épigénétique est non-spécifique ; on observe en effet une large hypo-méthylation du génome des cellules tumorales (Akers, Odunsi, & Karpf, 2010; De Smet et al., 1996; Grunau et al., 2005; Weber et al., 1994). Dans les cellules germinales mâles les protéines issues de la traduction de ces gènes ne sont pas présentées au système immunitaire car les molécules CMH n'y sont pas exprimées (Haas, D'Cruz, & De Bault, 1988).

Depuis la description du premier antigène de la catégorie cancer germline induisant une réponse T anti-tumorale, *MAGE-A1* (« Melanoma Antigen A1 ») plus de 40 familles d'antigènes humains de ce type ont été identifiés, certaines comprenant de multiples membres (Coulie, Van den Eynde, van der Bruggen, & Boon, 2014; Hofmann et al., 2008; van der Bruggen et al., 1991). Ces antigènes peuvent-être divisés en deux classes, ceux dont les gènes se trouvent sur le chromosome X dont l'expression est restreinte aux tissus germinaux et ceux dont les gènes se trouvent sur d'autres chromosomes dont l'expression dans des tissus sains est plus fréquente (Hofmann et al., 2008). Les gènes codants pour les antigènes de cette catégorie associés au chromosome X incluent les antigènes *MAGE-A*, *-B* et *-C*, *BAGE*, *GAGE*, *LAGE/NY-ESO1* ou encore *SSX* (Boël et al., 1995; De Backer et al., 1999; De Plaen et al., 1994; Gure et al., 1997; Lethé et al., 1998; Lucas et al., 1998; Lurquin et al., 1997; Ruault et al., 2002).

L'expression de ces gènes est plus fréquente dans les tumeurs de stade avancé que dans les tumeurs primaires ce qui est cohérent avec la déméthylation de plus en plus étendue du génome des cellules tumorales au cours de la progression de la tumeur.

La fonction des antigènes cancer-germline en dehors de leur capacité à fournir des épitopes reconnus par les lymphocytes T reste peu connue, cependant leur association à des partenaires protéiques tels que des régulateurs transcriptionnels, *SKIP* (« Ski interacting

proteïn »), histones déacétylases ou des oncogènes ou supresseurs de tumeurs suggère que des rôles dans les processus de croissance et la survie des cellules tumorales pourraient leur être attribuées (Cilensek, Yehiely, Kular, & Deiss, 2002; Gjerstorff, Andersen, & Ditzel, 2015; Laduron et al., 2004; Monte et al., 2006; Nagano & Fraser, 2011; Weon & Potts, 2015).

La spécificité tumorale de ces antigènes et leur expression fréquente et partagée entre tumeurs d'origines histologiques semblables ou non en font des cibles privilégiées pour les stratégies d'immunothérapie (Snyder et al., 2014). Des études détaillées de répartition de l'expression des antigènes « cancer-germline » ont néanmoins révélé que certains pouvaient être exprimés en faible quantité dans des tissus sains adultes (Hofmann et al., 2008). De plus, l'expression dans les épithéliums médullaires thymiques, bien que faible, pourrait induire une tolérance thymique à l'encontre de ces antigènes du soi et la réponse-immunitaire induite serait d'efficacité moindre (Gallegos & Bevan, 2006; Huijbers et al., 2012).

2. Les antigènes de différenciation

La différenciation terminale des cellules de différents tissus implique l'expression de protéines spécifiques, souvent impliquées dans une fonction spécialisée de ce tissu. Malgré l'accumulation d'aberrations génétiques et métaboliques, les cellules tumorales conservent plusieurs caractéristiques des tissus à partir desquels elles se développent. Les protéines fonctionnelles correspondantes peuvent être la source de peptides reconnus par le système immunitaire et constituent les antigènes de différenciation.

Dans le mélanome, on parle d'antigènes de différenciation mélanocytaires qui sont partagés par les cellules de mélanome et les mélanocytes normaux de la peau, de la rétine et de l'oreille interne. La première observation de lymphocytes T CD8⁺ capables de reconnaître à la fois les cellules de mélanome et les mélanocytes mais ne présentant aucune réactivité face à des cellules d'origine différente a été réalisée en 1993 par le groupe du Pr Parmiani (Anichini et al., 1993). Puis en 1994 les groupes de recherche des Pr Rosenberg et Boon identifièrent concomitamment l'antigène de différenciation mélanocytaire MelanA/MART-1 (Melanoma Antigen Recognized by T cells) exprimé dans plus de 90% des mélanomes et dans les mélanocytes (Coulie et al., 1994; Kawakami et al., 1994). Les antigènes tyrosinase, gp100, TRP-1 et TRP-2 font aussi partie de cette famille et des réponses spontanées à des peptides issus de ces protéines ont été mises en évidence (pour revue (Vigneron, 2015)). La

plupart de ces protéines sont impliquées dans la production de la mélanine et leur expression implique souvent le facteur de transcription MITF (Hoek et al., 2008).

L'expression des antigènes de différenciation dans les mélanocytes en fait des protéines du soi et à ce titre l'existence d'un répertoire lymphocytaire spécifique dirigé contre eux révèle un défaut de tolérance immunitaire. Ainsi, quand elle existe, la réaction immunitaire dirigée contre les antigènes du soi est limitée par les processus de sélection thymique et le répertoire spécifique est biaisé vers un répertoire de faible affinité (Redmond & Sherman, 2005; Träger et al., 2012).

Dans le cas particulier de l'antigène Melan-A/MART-1, il existe un paradoxe entre la fréquence élevée du répertoire T CD8+ spécifique dans le contexte HLA-A*0201 chez les individus sains et les patients et le fait qu'il s'agisse d'un antigène du soi. La fréquence des lymphocytes T spécifiques de l'épitope immunodominant Melan-A/MART-1₂₆₋₃₅ chez les individus sains HLA-A2 est 100 à 1000 fois supérieure à celle observée pour tout autre antigène (Alanio, Lemaitre, Law, Hasan, & Albert, 2010; Engels et al., 2013; Lonchay et al., 2004; Pittet et al., 1999; Voelter et al., 2008). De telles fréquences sont habituellement observées contre des antigènes viraux ou bactériens après des épisodes d'amplification périphérique due à un épisode infectieux. Cependant le répertoire T spécifique de Melan-A₂₆₋₃₅/A*0201 présente un phénotype majoritairement naïf chez les individus sains, en désaccord avec l'hypothèse d'une amplification périphérique (Pittet et al., 2002; Speiser et al., 2002). Ce répertoire est activé chez les patients porteurs de mélanome et peut subir une nouvelle expansion, atteignant jusqu'à 1/10^{ème} des lymphocytes T CD8+ infiltrants (TILs), et jusqu'à 3% du compartiment périphérique (Pittet et al., 2002; Romero et al., 1998).

L'origine de ce vaste répertoire spécifique naïf a été étudiée de façon extensive et a permis de mettre en évidence une forte fréquence de lymphocytes T CD8+ Melan-A₂₆₋₃₅ spécifiques dès la sortie du thymus (Zippelius et al., 2002). Son existence peut être en partie expliquée par deux phénomènes :

D'une part, au sein du répertoire Melan-A/MART-1 spécifique on observe une récurrence de la chaîne V α TRAV 12-2 du TCR (Trautmann et al., 2002). L'utilisation de cette chaîne permettrait à la fois une interaction plus stable avec l'épitope Melan-A₂₆₋₃₅ (Cole et al., 2009) mais également une permissivité dans la conformation du TCR qui conduirait à la sélection de lymphocytes cross-réactifs (Pinto et al., 2014).

D'autre part, l'expression des protéines du soi par les cellules épithéliales médullaires thymiques (mTEC) conditionne la mise en place de la tolérance centrale du système immunitaire. L'équipe du Pr Kyewski a mis en évidence dans ces cellules l'expression majoritaire d'un ARNm de Melan-A tronqué ne comprenant pas la séquence codant pour l'épitope immunodominant en HLA A*0201 alors que les cellules de la lignée mélanocytaire expriment principalement le transcrit complet. Ainsi cet épissage alternatif du transcrit MLANA dans les mTEC permettrait aux lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de Melan-A26-35 d'échapper à la sélection négative (Pinto et al., 2014).

Quoiqu'il en soit, l'épitope Melan-A₂₆₋₃₅ est exprimé dans les mélanocytes sains, ce qui les rend vulnérables à l'activation de ce large répertoire lymphocytaire T. Des destructions de mélanocytes normaux de la peau entraînant des vitiligos ont été observés, parfois associés avec des TCR Melan-A₂₆₋₃₅ de forte affinité (Mantovani et al., 2003; Palermo et al., 2001, 2005). Certains patients atteints de mélanome développent également spontanément des vitiligos qui s'avèrent souvent des signes de bon pronostic pour la survie globale (Nordlund et al., 1983; Quaglino et al., 2010). Enfin des cas de vitiligo, d'uvéïtes ou des pertes de l'audition rares et réversibles ont été observés comme effets secondaires d'immunothérapies ciblant Melan-A (Gattinoni, Powell, Rosenberg, & Restifo, 2006; L. A. Johnson et al., 2009; Khammari et al., 2009; Yee et al., 2000).

Dans le cadre du mélanome la balance bénéfique/risque reste toutefois en la faveur de l'utilisation de ces antigènes comme cibles d'immunothérapies.

3. Les antigènes surexprimés

Les antigènes surexprimés sont issus de protéines ubiquitaires dont l'expression faible dans les cellules saines est considérablement augmentée dans les cellules tumorales par des processus épigénétiques. L'utilisation de ces antigènes en immunothérapie repose sur l'existence d'un seuil qui permettrait aux cellules immunitaires de distinguer les cellules saines des cellules tumorales sur la base du niveau d'expression. Comme les antigènes de différenciation, ce sont des protéines du soi et leur utilisation en immunothérapie sera conditionnée à l'existence d'un répertoire T spécifique efficace à la sortie du thymus et à l'absence d'effets secondaires sur des tissus sains exprimant les protéines cibles (pour revue Bright, Bright and Byrne, 2014).

Certains antigènes surexprimés sont impliqués dans l'oncogenèse et sont cruciaux pour la maintenance du phénotype tumoral, ce sont donc des cibles de choix dont l'expression est stable. De plus, les mécanismes d'oncogenèse étant pour partie partagés entre différents types tumoraux, l'utilisation de ces antigènes en thérapie peut être applicable à différents patients.

C'est le cas des antigènes hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) et survivine qui sont surexprimés dans la majorité des cancers et sont donc considérés comme des antigènes « universels ».

hTERT est la sous-unité catalytique de la télomérase, complexe protéique responsable de la synthèse des extrémités télomériques des chromosomes. L'activité de la télomérase permet de prévenir l'apoptose et confère aux cellules tumorales la capacité d'immortalité (Hanahan & Weinberg, 2000; Meyerson et al., 1997). Indépendamment de leur origine, 85% des tumeurs humaines présentent une surexpression de hTERT, souvent associée avec un mauvais pronostic (Beatty & Vonderheide, 2008). Des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de peptides issus de hTERT et présentés dans des contextes HLA divers ont pu être mis en évidence chez des patients porteurs de tumeurs et des individus sains (Zanetti, Hernandez, & Langlade-Demoyen, 2005). Des immunothérapies et notamment des stratégies de vaccination ont montré l'établissement d'une réponse hTERT-spécifique CD4⁺ et CD8⁺ robuste, qui pour les patients répondeurs est associée à un bénéfice clinique (Godet et al., 2012; Harley, 2008; Thalmensi et al., 2016).

La survivine est une protéine anti-apoptotique qui inhibe l'activation des caspases 3 et 7. Comme hTERT elle est faiblement exprimée dans les cellules saines et surexprimée dans de nombreux types tumoraux (Mads Hald Andersen, Svane, Becker, & Straten, 2007; S. M. Schmidt et al., 2003). Son potentiel immunogène est attesté par la détection de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques dans le sang périphérique de patients atteints de cancers (M. H. Andersen, Pedersen, Becket, & Thor Straten, 2001).

4. Les antigènes mutés

Les multiples aberrations génomiques accumulées au sein de l'ADN des cellules tumorales, en plus de permettre la transformation des cellules et la progression tumorale peuvent être une source d'antigènes ; on parle alors d'antigènes mutés communément appelés « néoantigènes ». Ces antigènes sont strictement tumeur spécifiques et apparaissent donc comme des cibles de choix pour l'immunothérapie car ils ne présentent pas de risque d'effets secondaires sur les tissus sains (Gilboa, 1999). De plus, les lymphocytes T spécifiques de ces antigènes ne subissent pas la tolérance centrale aux antigènes du soi, on peut donc retrouver les lymphocytes spécifiques d'antigènes mutés de forte affinité en périphérie.

Les techniques de séquençage exhaustif du génome complet, du génome codant (exome) ou du génome exprimé dans une cellule (transcriptome) permettent d'identifier les mutations présentes dans une tumeur particulière en comparaison au tissu sain autologue et les épitopes mutés putatifs peuvent être prédits en fonction de leur score d'ancrage dans les molécules HLA (Meyerson, Gabriel, & Getz, 2010; Segal et al., 2008). La détection de lymphocytes T spécifiques d'antigènes mutés parmi les lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) mais également plus récemment dans le sang de patients atteints de mélanome permet de valider l'immunogénicité de ces antigènes (Cohen et al., 2015; Gros et al., 2016; Van Rooij et al., 2013)

Cependant tous les antigènes mutés ne sont pas capables d'être reconnus par le système immunitaire. En effet, les mutations peuvent avoir lieu dans des gènes non exprimés par la cellule tumorale ou lorsqu'ils sont exprimés les peptides dégradés par le protéasome qui portent la mutation peuvent ne pas être apprêtés sur les molécules du CMH. Si le peptide est correctement ancré dans les molécules du CMH et présenté en surface des cellules ils est alors nécessaire qu'il soit reconnu par des lymphocytes T spécifiques du complexe CMH-peptide muté et non des lymphocytes cross-réactifs spécifiques du peptide naturel (Kessels et al., 2004). Dans le cas contraire la réponse associée risquerait d'être faible car ces lymphocytes spécifiques de protéines du soi auront subi la sélection thymique négative.

L'un des défis principaux dans le champ de recherche des antigènes mutés est donc la prédiction des épitopes mutés qui seront effectivement immunogènes. Pour cela des outils bio-informatiques de prédiction du processing des protéines mutées et du chargement dans les molécules HLA des cellules tumorales ont été développés (Bassani-Sternberg et al., 2016; Paul et al., 2013; Jonathan W Yewdell, 2006). Le développement de la technologie de spectrométrie de masse permettant la détection de courts fragments protéiques est également mis à profit afin d'identifier les épitopes élués à partir des molécules HLA de surface d'une cellule (Bassani-Sternberg & Coukos, 2016). Ces épitopes constituent une base de travail solide car leur processing dans les cellules tumorales est avéré et non prédit. Ces filtres successifs appliqués à la prédiction des peptides antigéniques réduisent considérablement les candidats potentiels pour des traitements d'immunothérapie (T. N. Schumacher & Hacohen, 2016; Vitiello & Zanetti, 2017). Au final, il est estimé que seuls environ 0,1% des peptides mutants d'une tumeur sont de réels épitopes spécifiques de tumeur.

La première observation d'une réponse T CD8 spécifique d'un antigène de tumeur muté a été réalisée en 1995 par l'équipe du Pr T. Boon (Coulie et al., 1995) et depuis une vingtaine d'années les preuves de l'implication des antigènes mutés dans la réponse immunitaire anti-tumorale se sont accumulées. Parmi les TILs de patients porteurs de tumeur on observe un enrichissement en lymphocytes T reconnaissant des épitopes mutés (Lennerz et al., 2005; Verdegaal et al., 2016a). De plus, chez des patients ayant reçu un transfert adoptif de populations de TILs et expérimentant une régression tumorale durable on détecte un enrichissement de lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ spécifiques de d'épitopes mutés (Prickett et al., 2016; P F Robbins & Kawakami, 1996). L'importance de la réponse immunitaire anti-tumorale contre les antigènes mutés peut également être indirectement suggérée par la corrélation entre l'efficacité clinique des inhibiteurs de checkpoints immunitaires (notamment les anticorps monoclonaux anti-CTLA-4 ou anti-PD-1) et la charge mutationnelle du cancer traité (Rizvi et al., 2015; Topalian et al., 2012; Van Rooij et al., 2013). Enfin, une étude récente a montré l'efficacité de la vaccination tumorale ciblant de multiples épitopes mutés identifiés chez 6 patients atteints de mélanome. La vaccination induisait chez les patients une réponse T CD4⁺ et CD8⁺ fonctionnelle contre 60% des antigènes mutés ciblés et une régression tumorale complète chez tous les individus (dont 2 après un traitement supplémentaires par anticorps anti-PD-1) (Ott et al., 2017).

Les gènes sur lesquels les mutations surviennent ne sont pas majoritairement ceux impliqués dans l'oncogenèse et dont la présence confère un avantage sélectif aux cellules. Bien que de telles mutations sur les gènes IDH1 et la cycline CDK4 et induisant des réponses T CD8+ spécifiques aient été décrites elles restent très rares (seulement 2% des gènes codants (T. Schumacher, Bunse, Pusch, et al., 2014; T. Schumacher, Bunse, Wick, & Platten, 2014; M. R. Stratton, 2011; The Cancer Genome Atlas Network, 2015; Wölfel et al., 1995). La majorité des mutations dans les tumeurs sont des mutations sporadiques, dont les conséquences sont neutres quant au fonctionnement de la cellule (Heemskerk, Kvistborg, & Schumacher, 2012; Kvistborg et al., 2012; The Cancer Genome Atlas Network, 2015)

Cette observation pose deux limites majeures à l'utilisation des antigènes mutés en immunothérapie.

Tout d'abord, les mutations sur les gènes ne conférant pas d'avantage sélectif aux cellules surviennent de façon aléatoire dans le génome; les motifs de mutation préférentiels et récurrents comme par exemple la mutation BRAF^{V600E} ne sont pas observés pour ces mutations. Aussi de telles mutations sont généralement spécifiques de chaque patient, et les réponses associées mises en évidence chez les patients sont rarement partagées (Linnemann et al., 2015). Les traitements immunothérapeutiques qui peuvent être développés sont donc personnalisés et requièrent l'identification des mutations et des épitopes mutés éventuellement produits pour chaque patient. Qu'il s'agisse d'immunothérapies par transfert de cellules spécifiques ou de vaccination, chaque traitement sera donc à usage unique.

De plus, les mutations sporadiques ne sont pas stables car pas essentielles aux cellules tumorales et peuvent être acquises à différents moments du développement des tumeurs. Des études ont démontré une forte hétérogénéité du génome des cellules tumorales entre les tumeurs primaires et les métastases, entre différentes métastases et même au sein de la tumeur primaire elle-même (Gerlinger et al., 2012; Navin et al., 2011; Shah et al., 2009; Yachida et al., 2010). Ces observations sont cohérentes avec l'accumulation constante de mutations au cours de la croissance tumorale et dans ce cas, l'utilisation des antigènes mutés comme cible thérapeutique peut s'avérer hasardeuse, avec un risque élevé de survenue de variants tumoraux n'exprimant pas la mutation.

Il a également été montré que le système immunitaire lui-même par la lyse cellulaire par les lymphocytes T CD8+ pouvait participer à la perte d'expression d'un antigène muté (Matsushita et al., 2012). Sous la pression du système immunitaire, par exemple dans le cas d'un transfert adoptif de lymphocytes enrichis en T spécifiques d'un antigène muté, la perte d'expression par la tumeur de l'antigène ciblé était associée à un enrichissement de TILs spécifiques de mutations différentes (Verdegaal et al., 2016a). Ainsi, la forte plasticité des cellules tumorales leur permet donc de favoriser l'émergence de clones tumoraux qui échappent aux lymphocytes T spécifiques d'antigènes mutés lorsque ceux-ci sont utilisés comme cibles thérapeutiques.

5. Les antigènes issus de transcrits aberrants

Enfin, parmi les lymphocytes T participant à la réponse immunitaire anti-tumorale certains sont spécifiques d'épitopes issus de défauts ou de variations du processus d'expression des gènes. Différents mécanismes entrent en jeu tels que la traduction d'ORFs partiellement ou totalement introniques, des défauts d'épissage alternatif ainsi que des répétitions de fragments géniques ou des translocations à l'échelle chromosomique (tableau 1). Les mutations somatiques subies par le génome des cellules tumorales peuvent également entraîner des décalages de cadre de lecture par rapport aux protéines classiques et constituer des sources d'antigènes spécifiques.

| Mode d'expression | Nom | Références |
|--|---------------------------------------|--|
| Pseudogène issu de la rétroposition d'un ARN messenger. | NA-88-A | (Moreau-Aubry et al., 2000) |
| Variants d'épissage | TRP-2-INT2 | (Lupetti et al., 1998) |
| Traduction d'introns ou de fragments d'introns | TRP-2-6b, MUM1, gp100-int4, NA-17-A | (Coulie et al., 1995; Guilloux et al., 1996; Khong & Rosenberg, 2002; Paul F Robbins et al., 1997) |
| Issu de la traduction d'ORFs alternatifs de la protéine naturelle. | Gp75-ORF3, CAG-3 (NY-ESO-ORF2), CAMEL | (Aarnoudse, Van den Doel, Heemskerk, & Schrier, 1999; R F Wang, Parkhurst, Kawakami, Robbins, & Rosenberg, 1996; Rong-fu F Wang et al., 1998) |
| Variations de cadre de lecture suite à des mutations somatiques | CASP5, CDKN2A, OGT | (Huang et al., 2004; Ripberger, Linnebacher, Schwitalle, Gebert, & Von Knebel Doeberitz, 2003; Schwitalle, Linnebacher, Ripberger, Gebert, & von Knebel Doeberitz, 2004) |
| Translocation chromosomique | ABL-BCR et BCR-ABL | (Bocchia et al., 1996; Buzyn et al., 1997; Wagner, Ouyang, & Pawelec, 2003) |
| Duplications de régions géniques | FLT3 | (Graf et al., 2007) |

Tableau 1: Exemples d'antigènes de tumeur générés dans les cellules tumorales l'expression aberrante de gènes.

Bien qu'issus de transcrits aberrants, ces antigènes restent traduits dans les cellules tumorales par un mécanisme coiffe-dépendant classique. Malgré son utilisation largement majoritaire dans les cellules ce mécanisme n'est pas le seul qui soit possible. Les antigènes issus de modes de traduction alternatifs seront abordés dans la partie 2 – II : Les antigènes issus de la traduction coiffe-indépendante.

En conclusion, à chaque classe d'antigènes de tumeur est associée une réponse immunitaire aux caractéristiques propres et dont les bénéfices thérapeutiques et risques associés sont variables (figure 11). L'évaluation du répertoire des antigènes tumoraux peut être réalisé selon trois critères principaux :

- leur expression : partagée entre plusieurs patients / types tumoraux
- leur degré de spécificité pour les cellules tumorales
- la stabilité de leur expression

Un antigène idéal regroupant stabilité, expression partagée et spécificité tumorale n'est pour le moment disponible dans aucune de ces différentes classes.

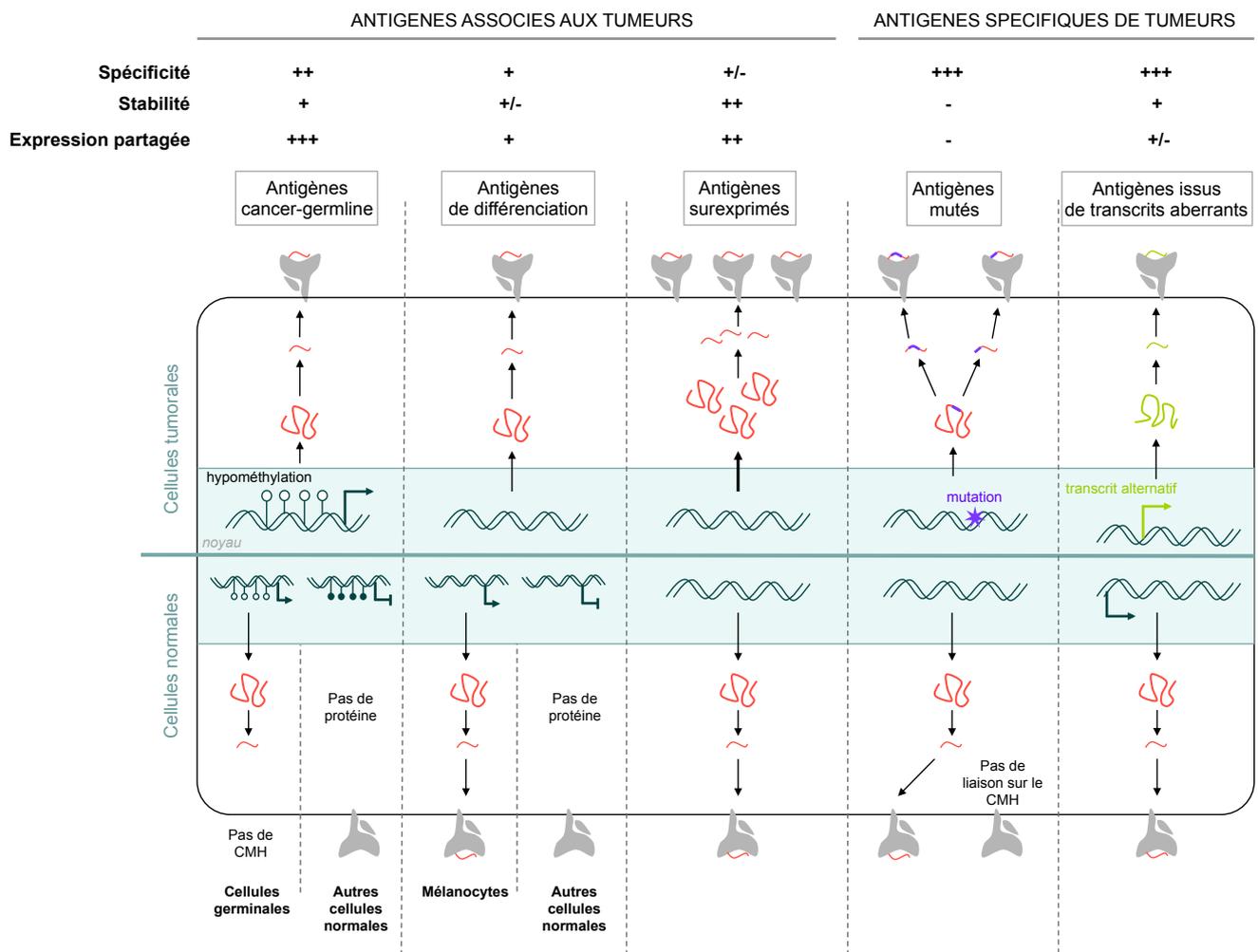


Figure 11: Expression des différentes catégories d'antigènes de tumeur reconnus par les lymphocytes T dans les cellules saines ou tumorales. D'après (Coulie, Van den Eynde, van der Bruggen, & Boon, 2014b).

La traduction coiffe-dépendante permet donc la traduction dans les cellules tumorales de la majorité des antigènes décrits. Il existe cependant des mécanismes de traduction alternatifs mis en place dans des conditions d'inhibition de la traduction classique comme les différents stress cellulaires qui entraînent notamment l'inactivation des facteurs eIF2 α et eIF4E. L'un de ces modes de traduction repose sur l'existence de séquences d'ARN en amont des ORFs possédant une structure secondaire appelées séquences IRES.

II. Les antigènes issus de la traduction coiffe-indépendante – implication des séquences IRES

A. Mise en évidence

L'étude de la traduction des ARNs viraux dans des cellules infectées a révélé des incohérences avec les mécanismes classiques et ont remis en cause le dogme de l'initiation de la traduction énoncé en 1979 par Marylin Kozak selon lequel les ribosomes entrent obligatoirement sur les ARNm eucaryotes par leur extrémité 5' porteuse d'une coiffe. Or certains ARNs viraux traduits ne possèdent pas de coiffe à leur extrémité 5' et s'associent pourtant avec des polysomes pour traduire des protéines virales. Ces dernières sont également capables de cliver des facteurs de traduction, interférant ainsi avec la traduction d'ARNs cellulaires sans diminuer celle des ARNs viraux (pour revue (Hellen & Sarnow, 2001). En 1988 Pelletier et Sonenberg ont décrit des sites d'entrée interne du ribosome ou IRES (« Internal Ribosome Entry Site »), séquences cis-régulatrices fortement repliées qui permettent le recrutement du ribosome indépendamment de la coiffe (Pelletier & Sonenberg, 1988). Ces séquences sont présentes sur une grande majorité des ARNs viraux et permettent de maintenir la synthèse de protéines virales dans un contexte cellulaire où la traduction coiffe-dépendante est compromise (Hellen & Sarnow, 2001; Hershey, Sonenberg, & Mathews, 2012; R. J. Jackson et al., 2010).

Rapidement, le concept d'initiation coiffe-indépendante de la traduction a été étendu aux ARNs eucaryotes et en 1991, Macejak et Sarnow ont montré que la traduction de la protéine de liaison aux chaînes lourdes d'immunoglobulines dépendait de la présence d'une séquence IRES dans sa région 5'UTR (Macejak & Sarnow, 1991). L'identification de séquences IRES par la prédiction est difficile et la majorité de celles actuellement décrites ont été validées par la démonstration de leur fonction. En effet, tandis que les IRES virales peuvent être regroupées grâce à des séquences ou des motifs structuraux communs (pour revue Fitzgerald and Semler, 2009), la séquence primaire ainsi que la structure secondaire des IRES cellulaires sont très peu partagées malgré la présence d'une structure tige-boucle en Y sur différentes IRES (Fitzgerald & Semler, 2009; Le & Maizel, 1997). Il est plutôt admis que

les IRES cellulaires sont définies individuellement par leur fonction et les conditions de leur activation.

Afin de prédire l'importance des séquences IRES dans la traduction du génome humain, les premières études ont quantifié le pool d'ARNs associés à des polyribosomes dans des cellules infectées par un poliovirus, c'est-à-dire dans lesquelles la traduction coiffe-dépendante est diminuée (Johannes, Carter, Eisen, Brown, & Sarnow, 1999). Les auteurs ont estimé que 3 à 5% des ARNm cellulaires pouvaient être traduits par des mécanismes coiffe-indépendants. Les données sur les IRES cellulaires sont depuis accumulées et compilées dans la base de données « IRESsite » qui recensait en 2009 115 IRES eucaryotes (<http://www.iresite.org>) (Mokrejs et al., 2006). Ces IRES sont souvent impliquées dans des processus cellulaires primordiaux tels que la croissance ou la différenciation cellulaires, l'apoptose, la traduction.

Dans une étude récente l'équipe d'Eran Segal a développé un système de détection à haut débit d'activité IRES dans des génomes viraux ou humains à partir d'oligonucléotides issus de régions 5'UTR, de transcrits complets ou de séquences IRES décrites (Weingarten-Gabbay et al., 2016). Une activité traductionnelle coiffe-indépendante a pu être mise en évidence sur 10% de régions 5'UTR humaines sélectionnées de façon aléatoire. Parmi les régions identifiées, les auteurs n'ont pas mis en évidence des processus biologiques ou moléculaires préférentiellement concernés par la traduction coiffe-indépendante. Il s'agit donc d'un mécanisme global partagé dans le génome pour l'expression de gènes de fonctions différentes.

B. Mécanismes d'activation des séquences IRES

Les mécanismes aboutissant au recrutement des ribosomes au niveau des séquences IRES sont encore assez mal connus malgré un grand nombre d'études sur le sujet (figure 12). Cependant deux facteurs complémentaires semblent jouer sur les capacités d'initiation de la traduction IRES dépendante, la structure secondaire de l'IRES et les protéines qui lui sont associées.

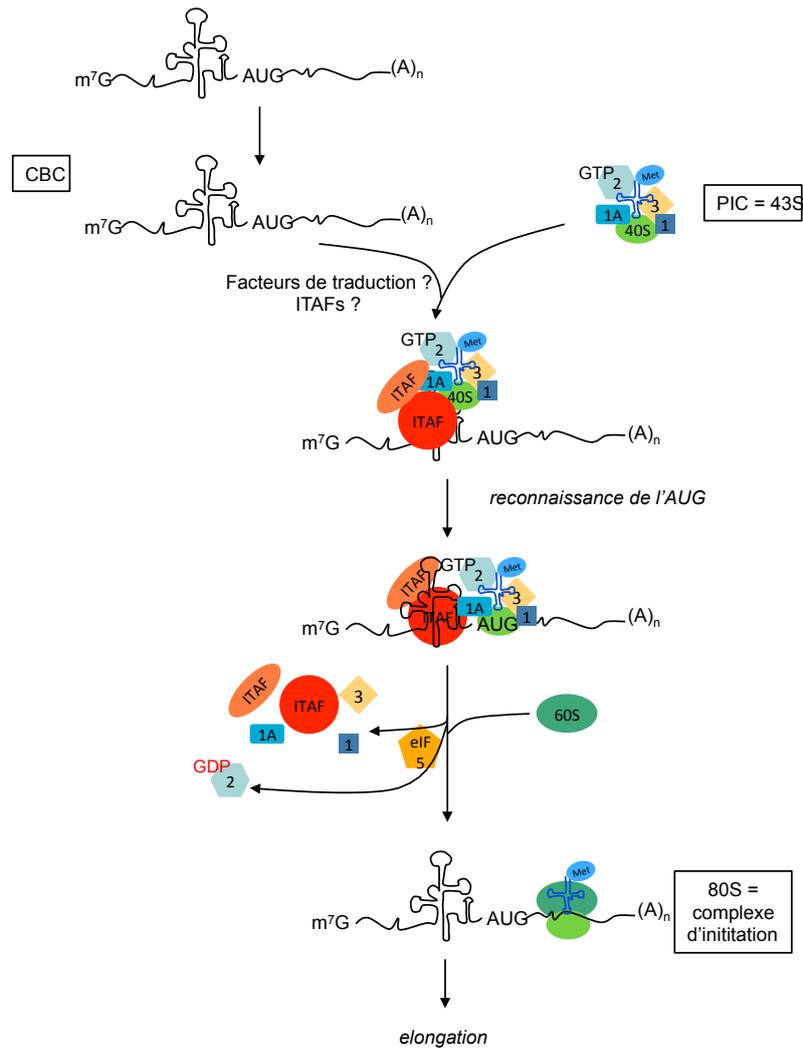


Figure 12: Schéma global de l'initiation de la traduction IRES-dépendante.

1. La structure secondaire

Les séquences IRES sont de longues régions ARN riches en guanine et cytosine, elles sont donc capables de se replier en structures secondaires complexes. L'absence de conservation des séquences primaires à l'exception d'ARNs issus d'espèces proches peut laisser penser que ce sont les repliements de l'ARN en structures secondaires ou tertiaires qui sont partagées et responsables du recrutement du ribosome (Baird, Turcotte, Korneluk, & Holcik, 2006; Komar & Hatzoglou, 2005). Dans le cas des IRES virales cette hypothèse est vérifiée car elles peuvent être regroupées en différentes classes selon les conformations secondaires qu'elles adoptent (Baird et al., 2006; Fitzgerald & Semler, 2009). Ces différentes structures participent à l'ancrage du ribosome sur l'ARN à proximité du codon initiateur et dans certains cas en sont les seules responsables. L'IRES impliquée dans la traduction du

génomique de la paralysie du criquet (CrPV) est l'exemple le plus frappant de ce mécanisme car elle est capable d'initier la traduction en absence de tous facteurs de traduction, y compris le complexe 43S contenant l'ARNt initiateur (Kanamori & Nakashima, 2001). La sous-unité 40S du ribosome se lie directement à l'ARN et une portion de l'IRES formant une structure tige-boucle dite en « pseudo-nœud » occupe le site P du ribosome afin de recruter la sous-unité 60S (Colussi et al., 2015; Jan & Sarnow, 2002; Pestova, Lomakin, & Hellen, 2004).

Ce mode d'activation n'est pas commun à toutes les IRES virales et certaines ont besoin de facteurs protéiques pour initier la traduction. Une classification en 4 groupes reposant sur ces critères de structure et de recrutement de facteurs a été réalisée pour les IRES virales (Kieft, 2008). De façon générale il semble que plus elles ont des structures secondaires fortes et moins elles reposent sur des facteurs *-trans* pour recruter les ribosomes (Filbin & Kieft, 2009).

Cependant ces caractéristiques structurales ne sont pas transposables aux IRES cellulaires dont la structure secondaire n'est pas aussi primordiale à l'initiation de la traduction (Baird et al., 2006; Xia & Holcik, 2009). Il semble même que l'activation de certaines nécessite de déstructurer les repliements de la séquence ARN afin que des facteurs d'initiation classiques ou spécifiques des séquences IRES puissent s'y associer (Baird, Lewis, Turcotte, & Holcik, 2007; Mitchell, Spriggs, Coldwell, Jackson, & Willis, 2003a; Pickering, Mitchell, Spriggs, Stoneley, & Willis, 2004). Au sein de l'IRES de l'oncogène c-myc des mutations perturbant la structure secondaire ne modifient pas l'activité d'initiation de la traduction qui semble plutôt reposer sur des courtes portions de séquences pouvant correspondre à des sites de liaison de facteurs protéiques (Cencig et al., 2004).

A plus grande échelle, l'introduction de mutations aléatoires dans les séquences de 100 IRES décrites a permis à Weingarten-Gabbay et collaborateurs de mettre en évidence deux profils de fonctionnement des IRES cellulaires. Pour certaines séquences, la majorité des mutations induisaient une diminution de l'activité IRES indépendamment de leur position tandis que d'autres ne subissaient cette diminution que pour des mutations sur des sites précis (figure 13). Les IRES de sensibilité globale et locale aux mutations ont donc été distinguées en deux catégories (Weingarten-Gabbay et al., 2016). Ces différences de sensibilité peuvent être expliquées par des modes de fonctionnement différents, selon le facteur limitant pour le recrutement du ribosome ; la structure secondaire (sensibilité

globale) ou la liaison de facteurs associés sur des régions précises de l'ARN (sensibilité locale).

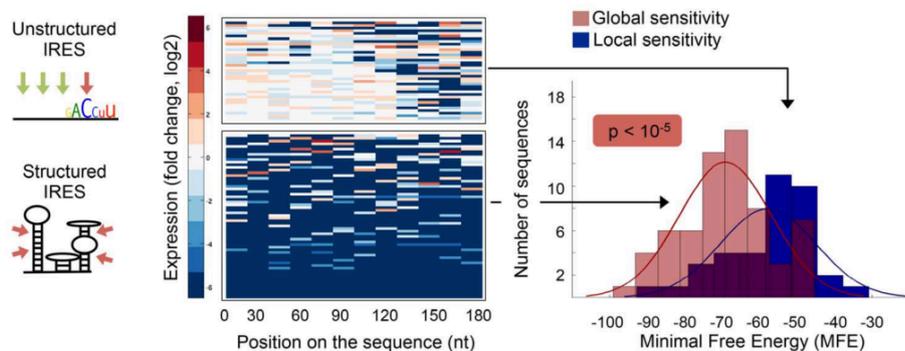


Figure 13: Impact de mutations aléatoires sur l'activation de séquences IRES. 100 IRES connues ont été mutées sur des régions de 14nt couvrant l'ensemble de la séquence. Panel gauche : Heat map des profils de mutagenèse. Chaque ligne représente une IRES, chaque colonne une position différente de la séquence mutée. On peut séparer les IRES en fonction de leur sensibilité locale ou globale aux mutations. Panel droit : Minimum d'énergie libre (MFE) calculé pour les IRES sauvages de chaque classe. Une MFE plus faible, c'est à dire une séquence plus structurée est observée pour les IRES à sensibilité globale. (Weingarten-Gabbay et al., 2016).

2. Les interactions IRES-protéines

De façon similaire au rôle facilitateur des facteurs d'initiation eIFs au cours de l'initiation de la traduction coiffe dépendante les IRES cellulaires et virales interagissent avec des protéines de liaison à l'ARN qui participent au recrutement du ribosome. Ces protéines peuvent être des facteurs de traduction classiques ou des facteurs spécifiques appelés « IRES trans-acting factor » ou ITAFs. Le rôle de ces partenaires protéiques des IRES peut être détecté par leur association avec les séquences IRES et leur rôle activateur ou inhibiteur de la traduction. Cependant les mécanismes moléculaires précis qui aboutissent à l'assemblage du ribosome 80S fonctionnel au niveau d'un codon initiateur restent encore peu élucidés.

a) L'implication des facteurs de traduction classiques

La traduction IRES-dépendante intervient en général lorsque la traduction classique est compromise comme par exemple en conditions de stress cellulaire, d'apoptose ou lors d'infections virales des cellules. Comme décrit précédemment, la majorité des stress cellulaires entraînent la phosphorylation de la sérine 51 d'eIF2a et l'hypophosphorylation de 4E-BP1 qui ont pour conséquence l'inhibition de la formation des complexes ternaires et de préinitiation respectivement. De plus, les infections virales peuvent entraîner un clivage d'un

ou plusieurs facteurs d'initiation incluant eIF4G, eIF4b et eIF3 par des protéases virales (Bushell et al., 2001).

Malgré leur disponibilité limitée ou leur inactivation en conditions physiopathologiques certains facteurs de traduction influencent la traduction IRES dépendante. On note par exemple l'effet positif de l'association avec DAP5/p97, membre de la famille eIF4G qui active la traduction IRES dépendante lorsqu'il est clivé en DAP5/p86 ou encore le rôle de protéines ribosomales (Henis-Korenblit et al. 2002; Nevins et al. 2003; Warnakulasuriyarachchi et al. 2004; Marash and Kimchi 2005 Cherry et al. 2005). A l'opposé, l'absence de certains facteurs peut favoriser l'activation de certaines IRES comme c'est le cas avec l'IRES *Drosophila reaper* dont l'activité est augmentée en absence d'eIF4E (Hernandez 2004).

b) Les facteurs ITAF

De nombreuses protéines de liaison à l'ARN sont capables de moduler l'activité des séquences IRES et sont regroupées sous l'appellation « IRES Trans-acting factors » ou ITAFs. Par leur association à l'ARN traduit, entre eux pour former des complexes et/ou aux sous unités ribosomales, ils activent ou inhibent la traduction IRES-dépendante (Spriggs, Bushell, Mitchell, & Willis, 2005). Les ITAFs fréquemment impliquées dans la traduction IRES-dépendante eucaryote sont listées dans le tableau 2.

| ITAF | IRES | Références |
|------------------------|---|---|
| PTB / hnRNP I | BiP, Apaf-1, IGF-1R, p53, Cyclin D1, HIF1a, | (Grover, Ray, & Das, 2008; Y. K. Kim, Hahm, & Jang, 2000; Mitchell, Spriggs, Coldwell, Jackson, & Willis, 2003b; Schepens, Tinton, Bruynooghe, Beyaert, & Cornelis, 2005) |
| La (Lupus autoantigen) | XIAP, Lamb1, BiP, | (M Holcik & Korneluk, 2000; Y. K. Kim, Back, Rho, Lee, & Jang, 2001; Petz, Them, Huber, Beug, & Mikulits, 2012) |
| hnRNP A1 | Cyclin D1, c-myc, XIAP, FGF2, Apaf-1, sST2 | (Bonnal et al., 2005; Cammas et al., 2007; Jo et al., 2008; Kunze, Benz, Brauß, et al., 2016; Stephen M Lewis, Veyrier, Ungureanu, Bonnal, & Holcik, 2007) |
| hnRNP C1/C2 | XIAP, c-myc, Unr | (Jong Heon Kim et al., 2003; Schepens et al., 2007; Spahn, Blondeau, Heurteaux, Dehghani, & Rami, 2008) |
| hnRNP K | c-myc | (Joanne R Evans et al., 2003) |
| Unr | Apaf-1 | (Mitchell et al., 2003b) |
| PCBP1/ hnRNP E1 | XIAP, c-myc | (Joanne R Evans et al., 2003; Holčík, Gordon, & Korneluk, 2003) |
| PCBP2/ hnRNP E2 | XIAP, PV1, c-myc | (Joanne R Evans et al., 2003; Holčík et al., 2003) |

Tableau 2: Exemples de facteurs ITAFs fréquemment impliqués dans l'activation d'IRES cellulaires.

(i) *La famille des hnRNPs*

Une grande partie des ITAFs décrites appartiennent à la famille des hnRNPs (« heterogenous nuclear RiboNucleoProteins ») (Dreyfuss, Kim, Kataoka, & Medical, 2002) (tableau 2). Cette famille comporte 17 membres principaux de structures et fonctions hétérogènes. Ils partagent certaines caractéristiques structurales et notamment de domaines de liaison à l'ARN dont le plus commun est le motif RRM (« RNA Recognition Motives ») (Birney, Kumar, & Krainer, 1993; Hoffman, Query, Golden, White, & Keene, 1991). Les hnRNPs sont initialement localisées dans le noyau et s'associent aux ARNs transcrits par l'ARN polymérase II. Les associations hnRNP-ARN se font à la fois de façon non spécifique sur une grande variété de transcrits et de façon dépendante de sites de fixation propres à chacun pour des associations plus spécifiques (Dreyfuss, Matunis, Piiiol-roma, & Burd, 1993). L'une de leurs caractéristiques les plus fondamentales est la capacité de transiter du noyau vers le cytoplasme et d'entraîner avec elles les ARNs qui leurs sont associés (Han, Tang, & Smith, 2010). La translocation nucléocytoplasmique est également nécessaire pour les différents rôles des hnRNPs. Elles sont impliquées dans de multiples

étapes du métabolisme des ARNs, l'épissage, le transport, la stabilité et la traduction (pour revue Han, Tang and Smith, 2010). Leur rôle dans la traduction IRES dépendante a été décrit pour de nombreuses IRES cellulaires (tableaux 2 et 3).

L'un des facteurs ITAF les plus décrits dans des contextes cellulaires ou viraux est PTB (« Polypyrimidine tract binding Protein ») ou hnRNP I dont l'influence peut être activatrice ou inhibitrice selon les IRES considérées. Il existe au moins trois variants d'épissage de PTB, des paralogues tissus-spécifiques ainsi que plusieurs sites de liaison à l'ARN par protéine (pour revue Baird *et al.*, 2006; Romanelli, Diani and Lievens, 2013). Aussi il est difficile de décrire un mode d'interaction ou un mécanisme moléculaire commun à plusieurs IRES malgré le fait que toutes soient associées à ce facteur.

En ce qui concerne les IRES cellulaires, on observe une forte variabilité d'efficacité de la traduction IRES-dépendante selon les types cellulaires et le contexte environnemental. Leur régulation pourrait donc être liée à la disponibilité des facteurs dans certaines conditions plutôt qu'à leur simple expression dans les cellules.

(ii) Le facteur eIF2A

La traduction IRES-dépendante nécessite comme la traduction classique une étape d'association de l'ARN de transfert Met-tRNA_i à la sous-unité 40S du ribosome. Or les situations dans lesquelles les IRES sont activées sont souvent concomitantes à la phosphorylation d'eIF2 α , habituellement impliqué dans la formation du complexe ternaire (Terenin, Dmitriev, Andreev, & Shatsky, 2008b). Outre les IRES capables de mimer la fonction du tRNA_i et d'initier la traduction en son absence comme les IRES CrPV des facteurs d'initiation alternatifs ayant les mêmes capacités qu'eIF2 dans l'initiation de la traduction sont recrutés (Pisarev, Shirokikh, & Hellen, 2005).

Le facteur d'initiation – 2A (eIF2A) est une protéine de 65kDa capable de stimuler la liaison de l'ARNt initiateur à la petite sous-unité du ribosome grâce à une capacité de liaison à de dernier et aux ARNs messagers (S. L. Adams, Safer, Anderson, & Merrick, 1975; Golovko *et al.*, 2016; Merrick & Anderson, 1975). Son rôle dans l'initiation de la traduction a été montré dans le cas de l'IRES du virus de l'hépatite C (HCV) mais également dans celui de l'IRES de l'oncogène c-Src (Joon Hyun Kim *et al.*, 2011; Kwon *et al.*, 2017). La protéine c-Src est une tyrosine kinase qui régule la prolifération, la motilité et la mort cellulaire. L'activation de sa voie de signalisation est observée dans environ 50% des tumeurs solides

(Boyer, Bourgeois, & Poupon, 2002; De Toni et al., 2007). En conditions normales, la traduction de c-Src dépend quasi-exclusivement de eIF2 α tandis qu'après phosphorylation de cette dernière, sa traduction IRES-dépendante est fortement conditionnée par la présence d'eIF2A (Allam & Ali, 2010). L'initiation de la traduction de c-Src en conditions de stress est ainsi possible grâce à la liaison spécifique d'une boucle de l'IRES et d'eIF2A-tRNA_i (Kwon et al., 2017).

Les mécanismes moléculaires de l'activation d'eIF2A en conditions de stress sont encore peu connus mais semblent liés à la localisation d'eIF2A. En effet elle est principalement nucléaire en conditions normales et est retrouvée dans le cytoplasme lorsque les cellules subissent un stress (Joon Hyun Kim et al., 2011).

Le facteur eIF2A n'est pas le seul capable de suppléer eIF2 α dans le complexe ternaire lorsque celui-ci est phosphorylé. Au cours de la traduction IRES-dépendante de la protéine XIAP (« X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein») et dans des conditions entraînant la phosphorylation d'eIF2 α , l'ARNt initiateur est pris en charge par le facteur eIF5B (Martin Holcik, 2015; Thakor & Holcik, 2012).

(iii) Mécanismes de régulation médiée par les ITAFs

Parmi les mécanismes de régulation de l'activation des IRES, la localisation cellulaire des facteurs ITAFs semble jouer un rôle important (S M Lewis & Holcik, 2008). Sous l'effet de différents stimuli tels que le stress cellulaire, l'infection virale ou l'action de molécules thérapeutiques les ITAFs localisés dans le noyau en conditions physiologiques sont exportés au niveau cytoplasmique (Cammass et al., 2007; Dobbyn et al., 2008; S M Lewis & Holcik, 2008; Stephen M Lewis, Veyrier, Hosszu Ungureanu, et al., 2007; Lin, Hsu, & Tarn, 2007). Ce mécanisme de translocation des ITAFs peut être l'un des éléments expliquant les modifications de la traduction IRES-dépendante sous l'effet de différents signaux extracellulaires. Les ARNm eucaryotes porteurs d'IRES sont tous produits dans les noyaux, il est donc possible qu'ils s'associent avec des ITAFs dès leur synthèse par l'ARN polymérase II et qu'ils soient exportés ensemble dans le cytoplasme.

Les mécanismes moléculaires mis en jeu à la suite de l'association des ITAFs sur les IRES ne sont pas totalement élucidés et plusieurs hypothèses sont avancées :

- Les ribosomes peuvent être recrutés directement en interagissant avec les facteurs ITAFs associés aux IRES et qui remplacent alors complètement les facteurs de traduction classiques.
- Les ITAFs peuvent remodeler la structure spatiale de l'IRES afin de promouvoir une configuration de meilleure affinité avec des composants de l'appareil de traduction ou d'autres facteurs ITAFs.
- Les ITAFs identifiés peuvent enfin faire partie de complexes protéiques plus importants associés aux IRES et recrutant le ribosome.

C. La traduction IRES dépendante dans les cellules tumorales

En conditions physiologiques, la traduction des ARNs messagers eucaryotes se fait majoritairement par le mécanisme coiffe-dépendant classique excepté quelques cas de traduction coiffe-indépendante dans les processus de mitose, de spermatogenèse, de plasticité neuronale et de différenciation cellulaire (Audigier et al., 2008; Conte et al., 2009; Gonzalez-Herrera et al., 2006; Nahum Sonenberg & Hinnebusch, 2007). Le changement de mode traductionnel n'est souvent observé dans les cellules que sous l'effet d'un stress extracellulaire (Lieberman et al., 2015; Philippe et al., 2016; Rübsamen et al., 2012, 2014; Shi et al., 2016a). Non seulement ces conditions limitent la disponibilité des deux éléments clés de l'initiation coiffe-dépendante que sont eIF4E et eIF2 α -GTP ce qui diminue la compétition pour les autres acteurs des voies de traduction mais ils permettent également une plus grande disponibilité des facteurs ITAFs par leur relocalisation dans le cytoplasme.

Dans une étude regroupant les gènes dont la traduction est gouvernée par des IRES selon leur fonction protéique, Rafaela Lacerda et ses collaborateurs ont montré que les protéines les plus susceptibles d'être traduites par ce biais étaient des éléments fondamentaux de l'homéostasie cellulaire tels que les facteurs de transcription, les récepteurs, transporteurs ou canaux ainsi que les facteurs de croissance (figure 14) (Lacerda, Menezes, & Romão, 2017).

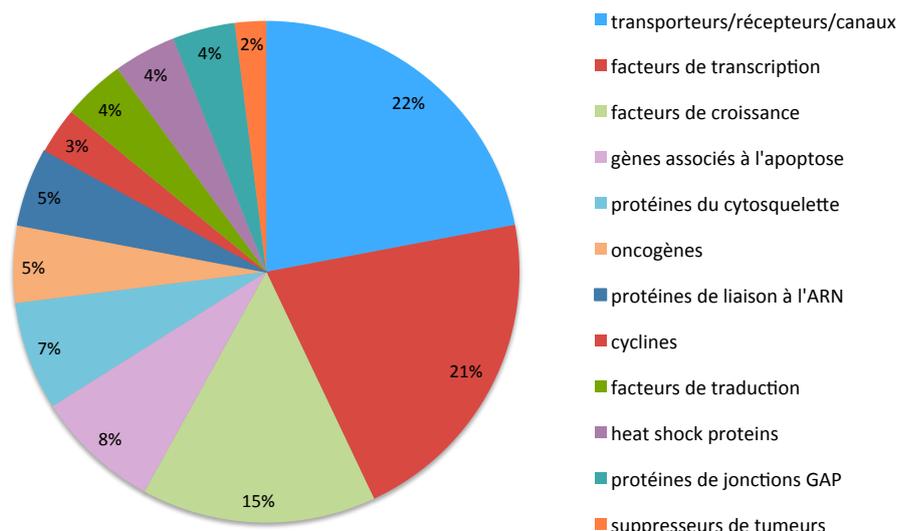


Figure 14 : Distribution des transcrits contenant des séquences IRES selon les familles de gènes. (Lacerda, Menezes, & Romão, 2017).

Les cellules tumorales, sous l'effet de leur microenvironnement, opèrent donc une reprogrammation de leur composition protéique par l'expression de protéines IRES-dépendantes (Lacerda et al., 2017; Walters & Thompson, 2016). L'activation de ces programmes de substitution permet d'éviter l'apoptose des cellules transformées qui sont alors capables d'entrer en dormance voire dans certains cas de poursuivre leur croissance ou d'activer le processus métastatique (Bi et al., 2005; Blais et al., 2006; Braunstein et al., 2007; Gaccioli et al., 2006).

Parmi les transcrits capables d'être traduits de manière IRES-dépendante on retrouve également des oncogènes, des facteurs de croissance, des transcrits impliqués dans le processus apoptotique et plus rarement des suppresseurs de tumeur (tableau 3) (Lacerda et al., 2017). Si l'initiation du processus tumoral repose principalement sur l'altération de l'intégrité du génome, les modifications du protéome imputables à la traduction IRES-dépendante participent activement à l'acquisition du phénotype tumoral. Dans le tableau 3 sont reportés des exemples de transcrits impliqués dans les tumeurs et possédant des IRES ainsi que les processus au(x)quel(s) ils participent.

| Gène | Conditions cellulaires | Fonction | ITAF | Type tumoral |
|---------------------|---|---|--|--|
| VEGF-A | hypoxie | angiogenèse | hnRNP L | Lymphome inflammatoire, cancer du sein |
| HIF1a | hypoxie | angiogenèse | PTB | Cancer du colon |
| FGF2 | hypoxie | angiogenèse | hnRNP A1 | Cancer de la prostate, du colon, myélome multiple |
| CDKN2A/ p16INK4A | hypoxie | Apoptose/prolifération cellulaire | YBX1 | Mélanome |
| c-myc | stress du RE | Apoptose/prolifération cellulaire Facteur de transcription | hnRNP A1, RPS25, GRSF-1, PSF, p54nrb, p97 | Myélome multiple |
| CAT-1 | privation aa, Glc | Transporteur d'acides aminés (prolifération) | hnRNP L, PTB | Cancer colo-rectal |
| XIAP | privation de facteurs de croissance, irradiation | Inhibiteur d'apoptose | PTB-1, hnRNP C1/C2, La, hnRNP A1 | Myélome |
| BAG-1 | stress oxydatif et génotoxique | Anti-apoptotique | membres de la famille PCBP | Cancer du sein |
| ciAP1 | stress oxydatif et génotoxique | Inhibiteur d'apoptose | DAP5, IGF2BP1 | Rhabdomyosarcome |
| Bcl-2 | stress oxydatif et génotoxique | Anti-apoptotique | DAP5 | Lymphome |
| p53 | dommages à l'ADN, radiations ionisantes, stress du RE, privation de Glc | Anti-apoptotique | PTB, HDM2/4, DAP5, Anexine A2, PSF, SMAR1, RHA | Mélanome, cancer du sein, cancer cervical, leucémie, carcinome suquamex de la tête et du cou |
| Apaf-1 | dommages à l'ADN | Anti-apoptotique | PTB, La, hnRNP-A1, Unr | Leucémie myéloïde chronique, mélanome, cancer cervical et du colon |
| Lamb1 | Stress oxydatif | Transition epithelio-mésenchymateuse, métastase | La, PDGF | Carcinome hépatocellulaire |

Tableau 3: Implication de la traduction IRES-dépendante dans les processus tumoraux. (d'après Stoneley and Willis, 2004; Fitzgerald and Semler, 2009; Faye and Holcik, 2015; Walters and Thompson, 2016).

Le développement des tumeurs est donc accompagné d'une reprogrammation du pool de protéines traduites qui permettent aux cellules de survivre et de s'adapter à des conditions de stress et à des fonctions cellulaires différentes de celles d'origine. L'intérêt de la communauté scientifique pour ces mécanismes de substitution et notamment de la traduction IRES dépendante est grandissant. A ce titre des traitements ciblant l'activation d'IRES sont actuellement à l'étude (Ji et al., 2017). Cependant les travaux actuels s'intéressent peu au potentiel antigénique des protéines traduites par des IRES. Les conditions de stress cellulaire dans le microenvironnement tumoral et la reprogrammation de la traduction seraient pourtant favorables à l'expression de protéines spécifiques qui, si elles sont présentées en surface et reconnues par le système immunitaire, seraient des cibles thérapeutiques de choix. L'antigène MPD6 traduit de façon IRES-dépendante à partir d'un ORF cryptique situé dans la région 3'UTR de l'ARNm codant pour la myotrophine a ainsi pu être mis en évidence. Dans des syndromes myéloprolifératifs ainsi que dans les leucémies myéloïdes chroniques et certains cancers de la prostate, on détecte une réponse humorale dirigée contre cet antigène cryptique (Xiong et al., 2006).

La difficulté de prédiction des séquences IRES cellulaires reste un frein majeur à leur étude malgré le développement récent de méthodes à haut débit (Weingarten-Gabbay et al., 2016). De plus, les méthodes de criblage actuelles sont souvent axées sur le génome traduit en protéines connues car les conséquences des modifications éventuelles sont plus facilement prédites et vérifiables. Or cette fraction codante représente une minorité du génome et des travaux divers montrent l'importance du génome non codant non seulement dans la régulation de l'expression des gènes mais aussi comme source de protéines.

La description dans les cellules eucaryotes de modes d'initiation de la traduction à des codons non-AUG, de « skipping » d'un AUG ou de changements de cadre de lecture au cours de la traduction ont remis en doute la définition des séquences codantes (Gesteland & Atkins, 1996; Hinnebusch, 2014). Des études récentes ont développées la technique du « ribosome profiling » qui permet d'obtenir des cartes d'occupation de l'ensemble des ARNs cellulaires par les ribosomes et donc des informations sur les régions traduites du transcriptome (Ingolia, Brar, Rouskin, Mcgeachy, & Weissman, 2013; Ingolia, Ghaemmaghami, Newman, & Weissman, 2009; Ingolia, Lareau, & Weissman, 2011). Les

données issues de ces analyses complexifient encore le tableau car elle révèlent une expression beaucoup plus permissive de protéines courtes, non annotées et issues d'ARNs autres que les ARNm (Bazzini et al., 2014; Calviello et al., 2015; Chew et al., 2013; Fields et al., 2015; Ingolia et al., 2014).

III. Les antigènes issus de la traduction du génome « non-codant »

Le séquençage du génome humain dans les années 2000 et l'analyse ultérieure réalisée par les collectifs ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) et Ensembl ont permis de caractériser les $3,4 \times 10^9$ paires de bases du génome et en particulier de séparer les régions codant pour des protéines connues des régions non codantes. Selon ces analyses seules 2% des bases du génome correspondent à des gènes codants. De fait, le dogme central de la biologie moléculaire établi dans les années 1950 donnait un rôle primordial aux ARN messagers (ARNm) comme intermédiaire direct entre la séquence ADN et la synthèse protéique. Dans l'analyse du génome les règles initiales d'annotation ont défini les séquences codantes selon différentes caractéristiques : les ARNm sont monocistroniques, l'initiation de la traduction se fait au niveau du premier codon AUG, pour un ORF d'une longueur d'au moins 100 codons, et la conservé dans la phylogénie (Brent, 2005; Fields et al., 2015; Maeda et al., 2006). Les régions non codantes considérées alors comme un « ADN poubelle » (Ohno, 1972) ont donc été laissées de côté au profit des ARNs messagers codants. Les analyses du génome ont démontré qu'en réalité plus de 90% du génome est transcrit sur au moins un brin, on parle alors pour la partie non annotée de transcriptome non codant et la fonction de ces ARNs est alors le sujet de nombreuses études (Derrien et al., 2012; Frith, Pheasant, & Mattick, 2005; Harrow et al., 2012; The FANTOM consortium & RIKEN Genome exploration, 2005). De plus, tandis que le nombre de gènes dans le génome des différentes espèces reste assez stable au cours de la phylogénie, la proportion du génome transcrite en ARNs non codants (ncRNAs : « non coding RNAs) a été corrélée au degré de complexité des organismes indiquant qu'une pression de sélection s'opère sur cette partie du génome (Frith et al., 2006; Mattick, 2001, 2003; Prasanth & Spector, 2007).

Pour évaluer plus précisément le degré de traduction du génome, l'équipe du Pr Weissman a développé la technologie du « ribosome profiling », permettant le séquençage haut débit des ARNs associés aux ribosomes (Ingolia et al., 2009). L'utilisation de cette technique dans des cellules embryonnaires de souris a révélé que de nombreux ARNs définis comme non-codants (ncRNA) étaient associés à des ribosomes et donc potentiellement traduits (Ingolia et al., 2014, 2011). Ainsi, les ncRNA pourraient représenter une source de protéines malgré leurs différences avec les ARNm.

La mise en évidence de ces produits d'ARN « non-codant » remet en question non seulement la définition des ORFs codants mais également le principe selon lequel la traduction dans les organismes eucaryotes se fait à partir d'ARNs monocistroniques. De plus, la définition des ORFs codants et de leur traduction souffre de nombreuses exceptions comme l'ignorance du codon AUG, l'initiation de la traduction à un codon non AUG, le changement de cadre de lecture au cours de la traduction ou sa poursuite malgré la présence d'un codon stop (Gesteland & Atkins, 1996; Hinnebusch, 2014).

A. La capacité codante du génome non-codant

1. Les ORFs courts (sORFs)

Les ARNs non codants ne comportent par définition pas d'ORFs de plus de 100 acides aminés mais un très grand nombre d'ORFs courts (sORFs : « small/shortORFs ») est retrouvé sur leur structure primaire (Pueyo, Magny, & Couso, 2016). Ces ORFs sont retrouvés sur presque tous les types d'ARN, messagers ou ARNs non codants comme les miRNAs ou les lncRNAs (Chew et al., 2013; Galindo, Pueyo, Fouix, Bishop, & Couso, 2007; Laouressergues et al., 2015). En 1996, les premières protéines courtes (ou polypeptides) issues de sORFs (SEP : « sORFs encoded peptides » Van de Sande et al. 1996) ont été décrites chez les plantes puis dans un grand nombre d'organismes y compris chez l'homme (Hanada, Zhang, Borevitz, Li, & Shiu, 2007; Slavoff et al., 2013). L'association des techniques de ribosome profiling et de spectrométrie de masse a permis l'identification d'un grand nombre de sORFs et de SEPs putatifs, cependant la vérification de la traduction et le décryptage des fonctions cellulaires des SEPs restent la limite principale à leur annotation (J. Ma et al., 2014). Les études du groupe du Pr Weissman ont montré que l'empreinte ribosomale en dehors des ORFs codants décrits était principalement retrouvée sur la portion 5' des transcrits et de façon cohérente, la majorité des SEPs potentiels sont codés par des « upstream » ORFs (uORFs) proches de l'extrémité 5' de l'ARN en amont du transcrit principal (Ingolia et al., 2014, 2011).

2. Les ORFs en amont (uORFs)

Les uORFs sont retrouvés sur environ 50% des mRNAs et leur présence est corrélée avec la diminution des niveaux d'expression des ORFs principaux (Cabrera-Quio, Herberg, & Pauli, 2016; Morris & Geballe, 2000). Lorsque les uORFs sont exprimés on observe une diminution de 30 à 80% de l'expression de l'ORF majoritaire du mRNA (Calvo, Pagliarini, &

Mootha, 2009; Johnstone, Bazzini, & Giraldez, 2016). L'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress est sujette à ce type de régulation comme développé précédemment pour le facteur de transcription ATF4. Le rôle des polypeptides traduits à partir des uORFs n'est pas connu.

Ce rôle des uORFs dans la régulation de la transcription est conservé dans de nombreuses espèces. Aussi, certaines pathologies ou susceptibilités à des pathologies sont associées à la perte ou le création d'uORFs (Barbosa, Peixeiro, & Romão, 2013; Wethmar, Smink, & Leutz, 2010).

3. Les micro ARNs (miRNAs)

Les miRNA sont de petites séquences d'environ 22 nucléotides dérivées de précurseurs simple brin. En association avec des complexes protéiques ils interfèrent avec la traduction d'ARNm cibles en s'appariant avec eux. Ces mécanismes d'action sont les bases du phénomène d'interférence ARN (RNAi) qui régule la traduction des ARNm en inhibant leur interaction avec le ribosome et les facteurs d'initiation ou en entraînant leur dégradation. On estime qu'approximativement 1/3 des gènes codants humains sont contrôlés par des miRNA (T. Du, 2005).

Pour pouvoir jouer leur rôle d'interférence sur la traduction d'ARNs précis, les miRNAs doivent subir différentes étapes de maturation : ils sont tout d'abord transcrits sous la forme de pri-miRNAs qui sont ensuite clivés en pre-miRNAs eux-mêmes subissant une étape de maturation pour former les miRNAs fonctionnels. Une étude récente a mis en évidence la présence d'ORFs codants pour des petits peptides dans la région 5' des pri-miRNAs traduits chez les plantes en peptides courts et fonctionnels appelés miPEPs (Laouressergues et al., 2015). Les miPEPs ont la capacité d'induire une surexpression spécifique du pri-miRNA dont ils sont issus et donc du miRNA associé ce qui amplifie son activité inhibitrice de la traduction de mRNAs cibles. L'expression de ces miPEPs a été étudiée avec précision pour quelques candidats et parmi 50 pri-miRNAs d'*Arabidopsis thaliana*, un ORF putatif d'une longueur de 3aa à 59aa a pu être mis en évidence pour chaque transcrit.

4. Les ARNs polycistroniques

Une grande majorité des gènes eucaryotes sont monocistroniques, un transcrit ne codant donc que pour une seule protéine, variants d'épissage compris. Les premiers transcrits polycistroniques ont été décrits chez les insectes. Par exemple les protéines pri/tal sont codées chez la drosophile par le gène *polished-rice/tarsal-less* qui est transcrit en un ARN initialement considéré comme non codant car ne comportant pas d'ORF de plus de 300 nucléotides. Au lieu de cela, la séquence de ce transcrit comporte de multiples ORFs courts qui peuvent être traduits pour plusieurs d'entre eux en petits peptides de taille comprise entre 11 et 32 acides aminés ayant des fonctions biologiques (Galindo et al., 2007; Kondo et al., 2007).

Chez les mammifères, de tels transcrits sont plus rares et la plupart des découvertes de transcrits bi- ou polycistroniques sont dues au hasard : des transcrits traduits en au moins deux protéines ayant chacune des fonctions cellulaires ont pu être mis en évidence y compris chez l'homme (Brubaker, Gauthier, Mills, Ingolia, & Kagan, 2014; Gray, Saitoh, & Nicholls, 1999; S.-J. Lee, 1991; Y. Lu et al., 2013; Tautz, 2009). De plus, comme décrit précédemment, une majorité de mRNAs possèdent des uORFs et ne sont donc pas composés au sens propre d'un ORF unique de taille supérieure à 100aa.

5. Les longs ARNs non codants (lncRNAs)

a) Description et classification

Les ARNs non codants sont grossièrement séparés en deux classes en fonction de leur taille et tous ceux de plus de 200 nucléotides sont regroupés sous le nom de longs ARNs non codants ou lncRNAs. Selon des études de séquençage de l'ARN récentes, plus de 19 000 lncRNA ont été identifiés dans le génome humain (Hon et al., 2017).

Les lncRNAs partagent de nombreuses caractéristiques avec les ARN messagers : ils sont généralement transcrits par l'ARN polymérase II (avec quelques exceptions transcrites par l'ARN polymérase III), peuvent être épissés et sont souvent coiffés en 5' et polyadénylés en 3' (Guttman et al., 2009; Khalil et al., 2009). Cependant, ils semblaient initialement avoir un potentiel codant limité avec l'absence d'ORFs de taille significative. Les lncRNAs sont impliqués dans des processus transcriptionnels, post-transcriptionnels et épigénétiques pour réguler l'expression de gènes cibles.

Dès lors que le rôle des lncRNAs a été envisagé, leur conservation inter-espèce a fait l'objet d'études car dans l'analyse du génome codant il s'agit d'un facteur important. Or plus de 80% des familles de lncRNA humains sont uniquement retrouvées chez les primates et l'observation d'orthologues diminue rapidement avec des espèces plus éloignées (figure 15A) (Necsulea et al., 2014). Ces observations se basent principalement sur la séquence primaire ce qui semble restrictif pour l'étude des lncRNAs car leurs fonctions sont également influencées par la structure et la localisation des régions transcrites par rapport à d'autres loci ou synténie (Diederichs, 2014). De fait, une étude récente a montré que certains lncRNAs portaient de courtes séquences conservées entourées de larges zones aux contraintes de conservation plus lâches (Hezroni et al., 2015). De plus, les motifs d'expression des lncRNAs dans les tissus, particulièrement spécifiques, sont également retrouvés dans des espèces divergentes (figure 15B) (Washietl, Kellis, & Garber, 2014). La conservation des lncRNAs dont l'apparition est plus récente dans la phylogénie ne semble donc pas régie par les mêmes règles que celle plus rigide des gènes codant pour des protéines. Dans une hypothèse proposée par Guttman et Rinn il est envisagé que l'évolution rapide des lncRNAs par l'interaction avec les gènes codants soit en fait la base de leur modulation et de l'adaptation rapide à de nouvelles fonctions (Guttman & Rinn, 2012).

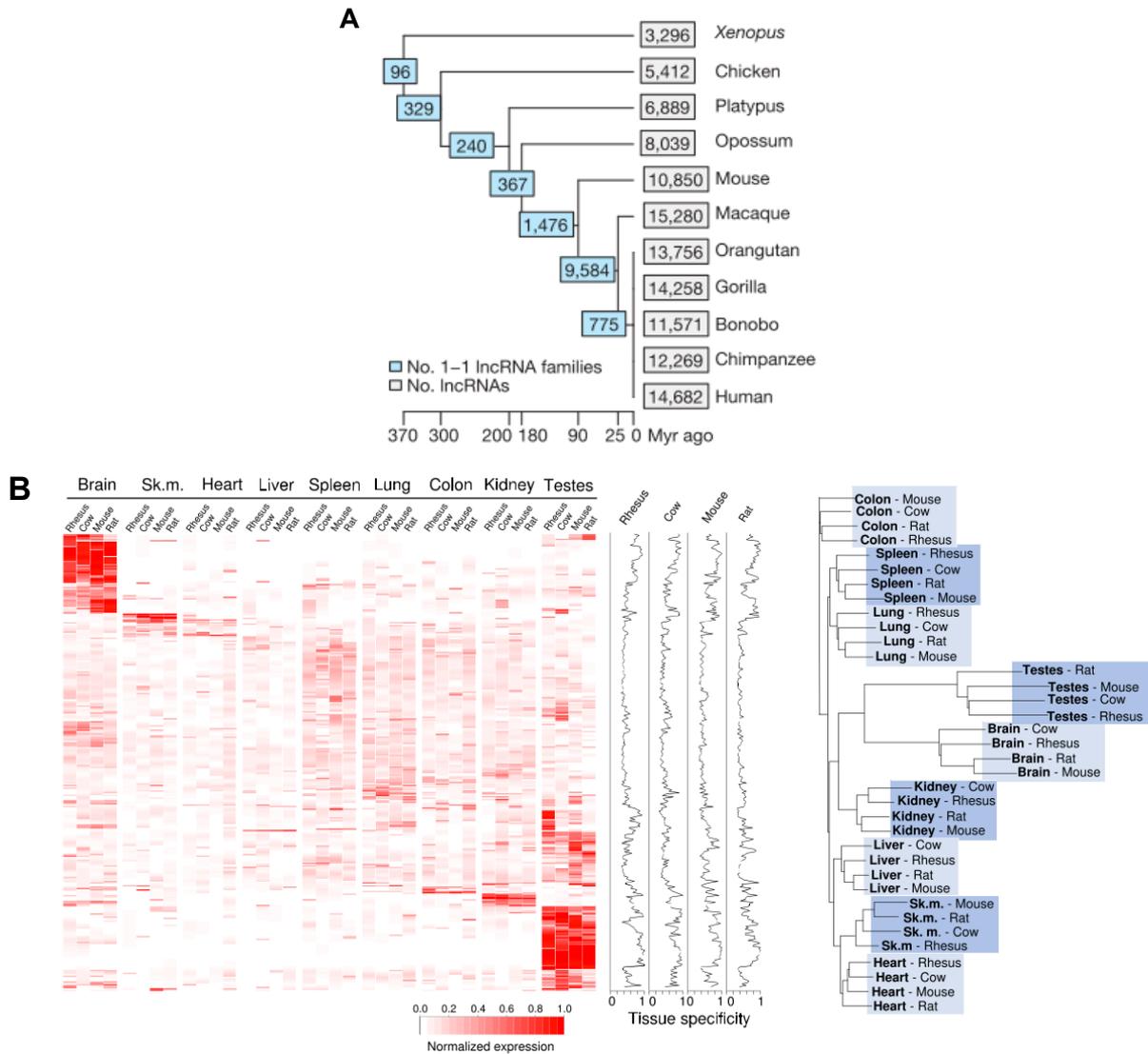


Figure 15: Conservation de la spécificité tissulaire des lncRNAs entre différentes espèces (A) Arbre phylogénétique simplifié de l'évolution des lncRNAs dans 11 espèces. Les cadres blancs indiquent le nombre de lncRNAs pour chaque espèce, les cadres bleus le nombre d'orthologues non ambigus. Issu de (Necsulea et al., 2014). (B) Les profils d'expression tissulaires des lncRNAs en fonction des tissus d'espèces différentes sont conservés entre différentes espèces comme indiqué sur la heat-map (à gauche) et l'arbre phylogénétique représentant l'évolution (à droite). Issu de (Washietl et al., 2014).

Les progrès dans la technologie de séquençage haut débit ont mis en évidence une profusion de lncRNAs et la mise en place d'une classification est nécessaire.

Cette classification n'en est qu'à ses débuts et différentes classifications ont été proposées, en se basant sur différentes caractéristiques des lncRNAs détaillées ci-dessous (St.Laurent, Wahlestedt, & Kapranov, 2015).

- leur taille
- leur association avec des gènes codant pour des gènes connus (chevauchant des introns ou des exons en sens ou en anti-sens)
- leur association avec des éléments ARN comme les séquences promotrices les enhancer ou des éléments répétés.
- des caractéristiques communes avec les ARNs messagers
- la conservation de la séquence ou de la structure du transcrit
- l'association avec des événements biologiques
- leur localisation sub-cellulaire
- leur fonction

La multiplicité des classifications et des classes de lncRNAs rend difficile une revue complète du répertoire humain. Les lncRNAs peuvent être transcrits à partir d'une grande majorité de régions géniques comme illustré sur la figure 16.

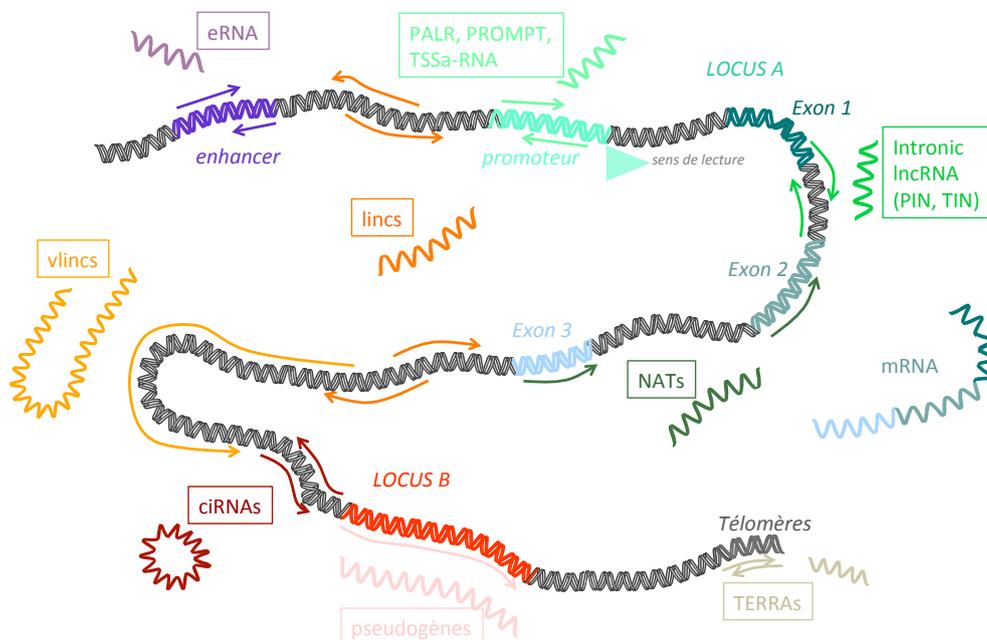


Figure 16: Origine génomique des lncRNAs. eRNA : enhancer RNA ; PALR : promoter associated lncRNA; PROMPT : promoter upstream transcript ; TSSa-RNA : Transcription start site associated RNA ; PIN/TIN : partially/totally intronic RNA ; NAT : naturally antisense transcript ; lincns : long intergenic ncRNAs ; vlncls : very long intergenic ncRNAs ; ciRNAs : circular ; RNA TERRA : telomeric repeat containing RNA.

b) Les fonctions des lncRNAs

Malgré la récente annotation de nombreux lncRNAs, leurs mécanismes d'action moléculaires restent assez peu compris et sont en général spécifiques d'un transcrit donné. Des études ont malgré tout révélé l'importance de ces transcrits dans la régulation de l'expression des gènes à différents niveaux. Deux modes d'actions généraux peuvent être distingués :

- La régulation en *-cis* : l'action du lncRNA est restreinte à son site de synthèse sur un ou plusieurs gènes voisins du même chromosome. L'activité des lncRNAs en *-cis* peut parfois s'étendre à un chromosome entier comme c'est le cas pour le lncRNA Xist (« X-inactive specific transcript ») qui inactive l'expression de l'un des chromosomes X chez les individus femelles (Pontier & Gribnau, 2011).

- La régulation en *-trans* est diffuse par rapport au site de synthèse du lncRNA et l'activité régulatrice peut se faire sur un grand nombre de gènes situés sur des chromosomes différents.

La fonction des lncRNA repose sur deux caractéristiques primordiales, la capacité de liaison à d'autres ARNs par complémentarité de Watson-Crick d'une part et à des protéines d'autre part grâce à la présence de sites de fixation dans la séquence ARN ou de structures secondaires reconnues par les protéines. Grâce à la formation de complexes ribo-nucléo-protéiques les lncRNAs peuvent influencer de multiples processus cellulaires et notamment l'expression des gènes à différents niveaux (pour revue (de Andres-Pablo, Morillon, & Wery, 2017; Joseph R. Evans, Feng, & Chinnaiyan, 2016; L. Ma, Bajic, & Zhang, 2013; Melissari & Grote, 2016; Zhang et al., 2014).

Tout d'abord la transcription des lncRNAs par l'ARN polymérase elle-même peut interférer avec la transcription d'autres gènes, un processus appelé interférence transcriptionnelle (Kornienko, Guenzl, Barlow, & Pauler, 2013) (figure 17A). Sous sa forme ARN et au sein du noyau un lncRNA est capable de modifier l'expression de gènes cibles par l'association avec des complexes enzymatiques modifiant la structure de la chromatine (figure 17B) (Khalil et al., 2009) ou par l'association avec des facteurs de transcription (figure 17C). Enfin les lncRNAs possèdent un rôle structural et peuvent former des sous-structures nucléaires appelées « paraspeckles » en s'associant avec des partenaires protéiques et en particulier des facteurs d'épissage et de transcription (figure 17D) (Fox et al. 2002; Dettwiler et al. 2004; Fox et al. 2005).

Les fonctions des lncRNAs ne se limitent pas aux noyaux car ils sont également retrouvés dans le cytoplasme des cellules où ils forment également des complexes ribonucléo-protéiques qui influencent la stabilité des mRNAs, leur épissage, leur traduction (figure 17E/F) (Carrieri et al., 2012; Tripathi et al., 2010). Les lncRNAs jouent également un rôle important dans l'ARN interférence par les miRNAs, soit en tant que précurseurs de miRNAs, soit en tant qu'éponges à miRNAs ou en masquant les sites de fixation des petits ARNs sur les mRNAs (figure 17G) (Cesana et al., 2011; Faghihi et al., 2010). Enfin, par leur association avec des protéines cytoplasmiques les lncRNAs sont capables de les activer, les inhiber, influencer leur localisation sub-cellulaire ou leur stabilité (figure 17H).

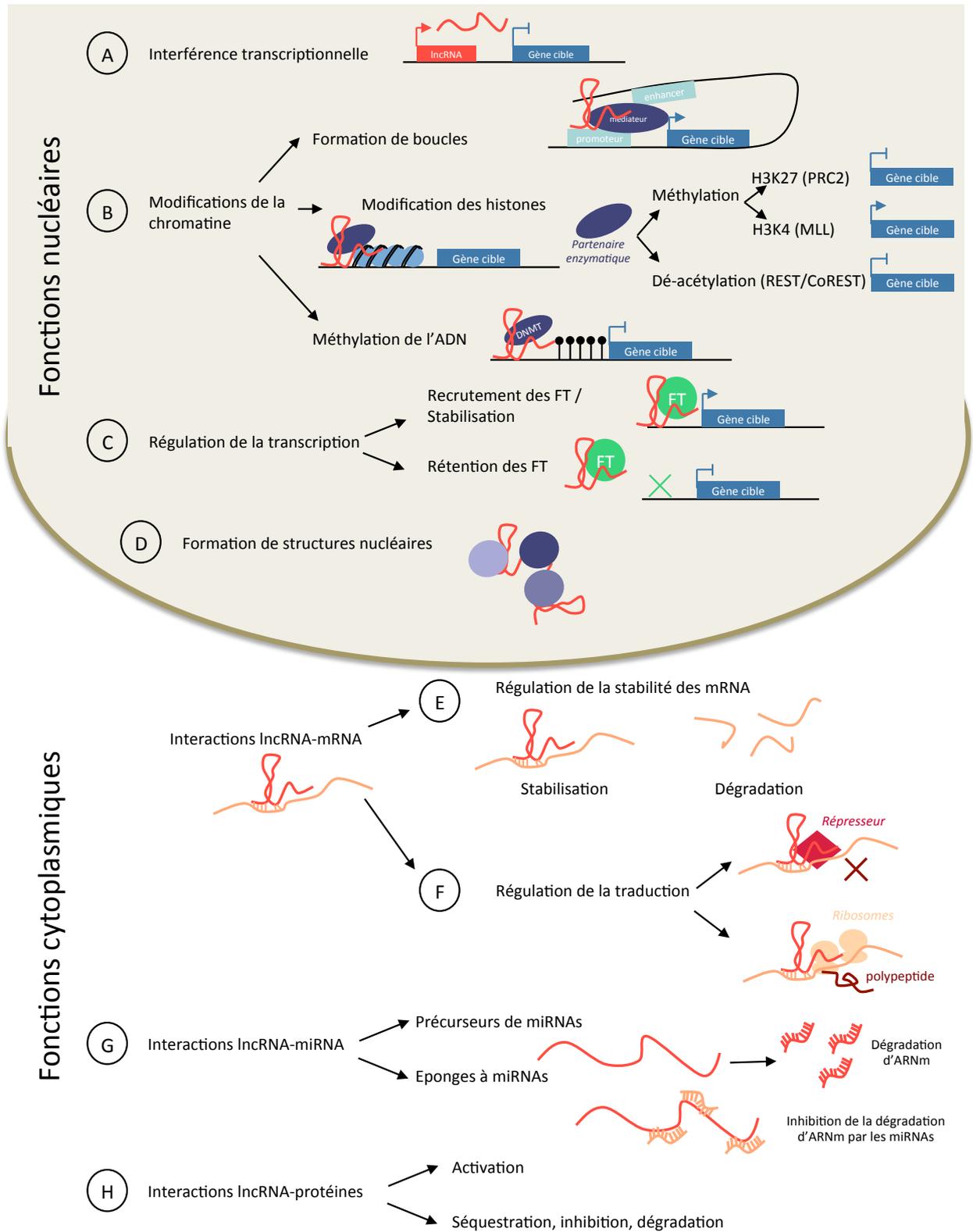


Figure 17: résumé des fonctions nucléaires et cytoplasmiques principales des lncRNAs

c) L'implication des lncRNA dans les cancers

Au cours des 10 dernières années, le rôle des lncRNAs dans diverses fonctions cellulaires a été mis en évidence et leurs implications dans différentes pathologies telles que désordres neurodégénératifs ou psychiatriques, diabète de type 2 ou maladies cardiovasculaires ont été rapportées (Sánchez & Huarte, 2013). Dans le cas du cancer, pathologie aux fondements génétiques et épigénétiques, des modifications de l'expression ou de la fonction de lncRNAs connus ont été observées dans la plupart des tumeurs (pour revue (Bhan, Soleimani, & Mandal, 2017). Les altérations subies par les voies physiologiques associées aux lncRNAs peuvent être dues à une sur- ou sous-expression des transcrits dans certaines conditions pathologiques ou bien à des altérations génétiques des gènes qui les codent. Les modifications de l'expression des lncRNAs dans les tumeurs participent à l'acquisition du phénotype tumoral en agissant en complément des altérations des voies de signalisation altérées (Bhan et al., 2017; Clark, Choudhary, Smith, Taft, & Mattick, 2013; Serviss, Johnsson, & Grandér, 2014). Il a été montré qu'à chaque caractéristique acquise par les cellules tumorales ou « Hallmarks of cancer » telles que décrites par Hanahan et Weinberg pouvaient être associées des variations de la régulation de lncRNAs (Gutschner & Diederichs, 2012; Hanahan & Weinberg, 2000; Schmitt & Chang, 2016). L'association des lncRNAs à de nombreux cancers a notamment ouvert la voie au développement de thérapies ciblant l'expression de ces transcrits et de leur utilisation à des fins diagnostiques (Grimaldi et al., 2017; Lavorgna et al., 2016).

d) Les lncRNA dans le mélanome

Les données disponibles quant à l'implication des lncRNAs dans la tumorigenèse, la progression et/ou la métastase du mélanome ont longtemps été limitées. Ces dernières années le nombre d'analyses comparatives de l'expression de lncRNAs entre des mélanomes primaires, métastatiques ou des tissus sains a considérablement augmenté et elles ont permis d'identifier des candidats d'expression aberrante. Parmi ces transcrits on retrouve d'une part des lncRNAs décrits dans d'autres contextes tumoraux, et d'autre part des lncRNAs dont l'expression est associée à l'évolution du mélanome qui semblent plus spécifiques de cette pathologie (tableau 4).

| Nom | Expression dans les mélanomes | Fonction | Pertinence clinique | Références |
|----------------|---|---|--|--|
| HOTAIR | ↑ | Favorise la motilité, l'invasion et la formation de métastases par les cellules de mélanome (favorise la dégradation de la matrice extracellulaire) | Associé à l'évolution du mélanome – lncRNA le plus fréquent dans les métastases lymphatiques | (Tang, Zhang, Su, & Yu, 2013) |
| MALAT1 | ↑ | Régulateur critique de la capacité de dissémination et de métastase. | Surexpression corrélée à un mauvais pronostic | (Tian, Zhang, Hao, Fang, & He, 2014) |
| BANCR | ↑ associé à BRAFV600E | Favorise l'expression de gènes impliqués dans la migration des cellules de mélanome | Taux élevés de BANCR associés à des taux de survie plus faibles | (Flockhart et al., 2012; Li et al., 2014) |
| SAMMSON | ↑ | Participe à la survie des cellules de mélanome. | Biomarqueur spécifique – cible thérapeutique pertinente | (Goding, 2016; Leucci, Vendramin, et al., 2016) |
| SLNCR (SLNCR1) | ↑ | Impliqué dans le processus métastatique (remodelage de la matrice extracellulaire) | Expression corrélée à la sévérité du mélanome | (K. Schmidt et al., 2016) |
| SPRY4-IT1 | ↑ cytoplasmique | Facteur anti apoptotique Promoteur d'invasion et de prolifération cellulaire | Inversement corrélé avec la survie globale | (Khaitan et al., 2011; Liu et al., 2016; Mazar et al., 2014) |
| ANRIL | Sujet aux polymorphismes génétiques | Régulation épigénétique de l'expression de CDKN2A/B et de miRNAs inhibiteurs de la prolifération cellulaire | Association entre des SNPs et le risque de développer un mélanome ou avec les mélanomes familiaux. | (Sarkar, Leung, Baguley, Finlay, & Askarian-Amiri, 2015) |
| Llme23 | Spécifique des cellules de mélanome | Impliqué dans le maintien des propriétés malignes (dé-répression de proto-oncogènes) | n.d. | (Wu, Tan, Ma, & Li, 2013) |
| UCA1 | ↑ | Régulateur de la prolifération cellulaire et promoteur de la formation de métastases. | Surexpression corrélée à un mauvais pronostic | (Tian et al., 2014) |
| GAS5 | variable | Inhibiteur de la croissance tumorale, de la migration des cellules de mélanome et de la formation de métastases | n.d. | (Chen et al., 2016) |
| CASC15 | ↑ dans les mélanomes métastatiques | Participe à la reprogrammation épigénétique qui permet l'acquisition du phénotype invasif. | Augmentation de l'expression au cours de la progression tumorale – prédicteur de récurrence de la pathologie | (Lessard et al., 2015) |
| PTENP1 | ↓ | Pseudogène régulateur (+) de l'activité PTEN (leurre de miRNAs) - Activité suppresseur de tumeur | | (Poliseno et al., 2010, 2011) |
| MIR31HG | Anti-corrélé à p16INK4A – associé à BRAFV600E | Répresseur de la senescence induite par p16INK4A | La répression de p16INK4A induite favorise le développement tumoral | (Montes et al., 2015) |
| RMEL3 | ↑ | Associé à la mutation BRAFV600E Impliqué dans les voies de signalisation MAPK et PI3K – survie et prolifération des cellules de mélanome | n.d. | (Goedert et al., 2016) |

Tableau 4: lncRNAs les plus fréquemment impliqués dans l'initiation ou la progression du mélanome adapté de (L. Guo, Yao, & Jiang, 2016; Leucci, Coe, Marine, & Vance, 2016; Sarkar et al., 2015)

En 2012, Flockhart et collaborateurs ont étudié le remodelage transcriptomique dans les mélanomes porteurs de la mutation oncogénique BRAF^{V600E} retrouvée chez plus de 50% des patients et ont pu mettre en évidence 39 lncRNAs connus et 70 transcrits non annotés dont l'expression est associée à la mutation (H. Davies et al., 2002; Flockhart et al., 2012). Le lncRNA BANCR (« BRAF-regulated lncRNA »), surexprimé de façon récurrente dans les tumeurs porteuses de la mutation BRAF^{V600E} a ainsi pu être identifié et semble être impliqué dans la migration des cellules de mélanome.

Une étude du Pr. J-C Marine a décrit récemment un lncRNA clé dans la survie des cellules de mélanome : SAMMSON (« survival associated mitochondrial melanoma specific oncogenic non-coding RNA », anciennement nommé LINC01212) (Goding, 2016; Leucci, Vendramin, et al., 2016). Ce transcrit est sujet à une amplification focale spécifique dans 10% des mélanomes et associé à un mauvais pronostic. Le locus codant pour ce lncRNA contient aussi le gène *MITF*, on observe donc dans les cellules de mélanome une co-amplification de *MITF* et de SAMMSON bien qu'ils soient exprimés de façon indépendante. L'expression de SAMMSON est régulé par le facteur de transcription SOX10, spécifique de la lignée mélanocytaire ce qui lui confère sa spécificité (Garraway et al., 2005a; Harris, Baxter, Loftus, & Pavan, 2010). De plus, alors qu'il est détecté dans plus de 90% des mélanomes primaires ou métastatiques, SAMMSON est peu détecté voire absent dans les mélanocytes sains ou les lésions non invasives. Son apparition semble donc induite par le processus de transformation abouti des mélanocytes et confère aux cellules un avantage de croissance en interférant avec le métabolisme mitochondrial (V. Fogal et al., 2010; Valentina Fogal, Zhang, Krajewski, & Ruoslahti, 2008). Enfin, par des expériences de xénogreffe de lignées de mélanome humaines, Leucci et collaborateurs ont montré que le traitement intraveineux avec les LNA-GapemeRs bloquant l'expression de SAMMSON permettait d'arrêter la croissance tumorale, de diminuer la prolifération cellulaire et d'induire l'apoptose des cellules de mélanome (Braasch & Corey, 2001; Leucci, Vendramin, et al., 2016). Ces inhibiteurs utilisés en combinaison avec des inhibiteurs de BRAF muté (dabrafenib) dans le mélanome permettent la régression de la tumeur lorsqu'une simple inhibition de la croissance tumorale était induite par la thérapie ciblée.

Une étude comparative du répertoire de lncRNAs d'expression aberrante entre des tumeurs de mélanome primaire, métastatique ou des mélanocytes sains a mis en évidence des signatures spécifiques d'un stade tumoral et définies selon l'expression de lncRNAs (S.

Wang et al., 2017). Cette observation en plus de la compréhension des mécanismes impliqués dans l'initiation et la progression du mélanome permet d'identifier des biomarqueurs potentiels de la pathologie et de son stade. Leur utilisation dans des protocoles thérapeutiques permet de compléter les examens diagnostics.

e) La traduction des lncRNAs

Le potentiel de traduction des lncRNA a été en première intention évalué par leurs taux d'occupation par des ribosomes. Ingolia et collaborateurs ont montré qu'en terme d'occupation du transcrite par les ribosomes, les lncRNAs étaient plus proches des régions codantes que des régions 3'UTR qui sont relativement dépourvues de marques d'occupation par les ribosomes (Ingolia et al., 2014). Cependant bien que les marques d'occupation de ribosomes soient proches, le potentiel codant des lncRNAs demeure inférieur à celui des mRNAs (Guttman, Russell, Ingolia, Weissman, & Lander, 2013). En effet, les lncRNAs comportant de multiples petits ORFs, l'empreinte ribosomale différente de celle observée pour les mRNAs est cohérente avec leur séquence (Andrews & Rothnagel, 2014; Chew et al., 2013; Ingolia et al., 2014; Ruiz-Orera, Messeguer, Subirana, & Alba, 2014). Même si la présence d'une empreinte ribosomale ne signifie pas nécessairement la traduction des ARNs, l'existence de polypeptides fonctionnels traduits à partir des lncRNAs a été formellement documentée et suggère l'existence d'une régulation fine de la traduction de certains lncRNA (Guttman et al., 2013; Matsumoto et al., 2016; Prabakaran et al., 2014; Slavoff et al., 2013).

Ainsi, dès le début des années 2000 les premiers polypeptides issus de lncRNAs ont été identifiés. La protéine SRAP (« Steroid receptor RNA activator protein ») de 30kDa est issue de la traduction de SRA, un ARN non codant conservé chez les vertébrés (Chooniedass-Kothari et al., 2004; Kawashima et al., 2003). Cet ARN est bifonctionnel car il permet de moduler l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux stéroïdes indépendamment de sa capacité codante. De plus des fonctions de SRAP ont récemment été mises en évidence notamment dans les processus de migration de cellules tumorales (Yan et al., 2015). Les protéines DWORF (« dwarf opening reading frame ») et myoréguline (MLN) de respectivement 34 et 46 acides aminés traduites à partir de lncRNAs spécifiques du tissu musculaire sont quant à elles impliquées dans le fonctionnement des pompes à calcium

SERCA du réticulum sarcoplasmique (Anderson et al., 2015; Nelson et al., 2016). Enfin, le polypeptide SPAR (« small regulatory polypeptide of amino acids response ») est traduit par un ORF du LINC00961 qui contient un domaine trans-membranaire conservé. Elle permet une régulation spécifique de l'activation de mTORC1 dans la réponse aux lésions (Matsumoto et al., 2016).

De plus, la traduction de certains ORFs de lncRNAs régule la traduction des ORFs en aval, de façon similaire au mode de fonctionnement principal des uORFs (Calvo et al., 2009; Ulitsky, 2016).

B. Les antigènes traduits à partir d'ARNs « non-codants »

Le répertoire peptidique associé au CMH de classe I est représentatif du pool intracellulaire de protéines et comme ni les molécules du CMH I ni les TCR des lymphocytes T CD8+ qui reconnaissent les complexes ne font de discrimination quant à l'origine des peptides présentés, ceux-ci peuvent être issus de processus de traduction alternatifs (Shelley R Starck et al., 2008, 2016; Shelley R Starck & Shastri, 2011). L'observation des antigènes issus de sources alternatives a été faite pour la première fois par T. Boon et collaborateurs qui en 1989 ont détecté des réponses immunitaires dirigées contre des régions génomiques dépourvues d'ORFs dans leur forme classique (Boon & Pel, 1989). Ces produits de traduction inhabituels sont appelés peptides cryptiques et parmi les peptides associés aux molécules HLA I on retrouve jusqu'à 10% d'épitopes cryptiques issus de transcrits initialement considérés non codants (Laumont et al., 2016). Les fonctions de ces produits de traduction étant présumément limitées à leur potentiel antigénique on se réfère également à ces peptides en tant que DRIPs (« Defective Ribosome Products ») (J W Yewdell, Anton, & Bennink, 1996; Jonathan W Yewdell & Nicchitta, 2006). Ces peptides sont d'une part issus de la traduction d'ORFs non classiques et de la mise en œuvre de mécanismes de traduction particuliers sur les mRNAs : initiation à des codons non-AUG, utilisation de cadres de lecture alternatifs, réinitiation et d'autre part proviennent de régions non codantes du génome (Cardinaud, Starck, Chandra, & Shastri, 2010; Shelley R Starck & Shastri, 2011). Par rapport aux protéines dites classiques la faible taille de ces protéines alternatives leur apporte un avantage dans la compétition pour le chargement sur les molécules du CMH de classe I car elles ont besoin de moins d'étapes de protéolyse afin de pénétrer dans le réticulum endoplasmique et de pouvoir être présentées à la surface des cellules (Shelley R Starck &

Shastri, 2011). Au cours des processus de transformation tumorale ou d'infection virale, le peptidome des cellules est soumis à des changements et en particulier l'apparition d'épitopes cryptiques dont la reconnaissance par les cellules tumorales joue un rôle dans la réaction immunitaire associée à ces pathologies (Fortier et al., 2008; Ronsin et al., 1999; Weinzierl et al., 2008). La présentation de peptides cryptiques ou de DRIPs est un moyen efficace d'alerter le système immunitaire de l'infection ou de la transformation d'une cellule.

Le concept de la traduction dans les cellules eucaryotes semble donc incomplet et les mécanismes qui y sont impliqués, étant capables de gérer la traduction de transcrits divers, sont plus complexes qu'initialement proposé.

3- La réaction immunitaire anti-tumorale

L'expression par les cellules tumorales de tous les antigènes présentés précédemment les transforme du point de vue du système immunitaire de cellules du soi en cellules du non-soi. Si elles présentent certains de ces antigènes à leur membrane extracellulaire ils peuvent être reconnues par le système immunitaire et initier une réaction anti-tumorale.

I. La théorie de l'immunosurveillance

Dans les années 1950, Lewis Thomas puis Frank MacFarlane Burnet ont émis puis validé la théorie de l'immunosurveillance. Elle repose sur la capacité des cellules du système immunitaire et en particulier des lymphocytes T à discriminer les cellules saines des cellules tumorales grâce à l'expression dans ces dernières d'antigènes absents dans les cellules saines. Une fois activées ces cellules sont capables de détruire les cellules tumorales et donc de contrôler l'établissement de tumeurs primaires.

Les preuves de l'activation du système immunitaire dans les tumeurs et en particulier dans le mélanome sont multiples.

Depuis de nombreuses années, l'équipe du Pr Rosenberg travaille sur des populations de TILs isolés à partir de métastases y compris les de métastases ganglionnaires qui contiennent des lymphocytes et des cellules tumorales. Parmi ces TILs un grand nombre exerçaient une activité cytolytique sur des cellules tumorales *in vitro* (Rosenberg *et al.* 1988). De plus, la fréquence de certains lymphocytes spécifiques d'antigènes tumoraux est augmentée d'un facteur 10 dans les tumeurs métastatiques par rapport à leur fréquence circulante (Mazzocchi *et al.*, 1994).

Dans certains cas, la réponse immunitaire anti-tumorale spontanée peut aboutir au rejet des tumeurs primaires. On estime que 14 à 50% des tumeurs primaires disparaissent partiellement ou complètement en absence de traitement ayant une influence sur la progression néoplasique, une fréquence légèrement plus élevée que celle observée dans d'autres types tumoraux (Kalialis, Drzewiecki, Mohammadi, Mehlsen, & Klyver, 2008).

Enfin, le risque de survenue d'un mélanome est plus élevé chez les individus immunodéprimés (Chapman, Sheil, & Disney, 2001; Grulich, van Leeuwen, Falster, & Vajdic, 2007).

L'initiation d'une réponse immunitaire anti-tumorale spontanée et en particulier la présence d'un infiltrat lymphocytaire au sein de la tumeur est un facteur de bon pronostic chez les patients porteurs de mélanome. Tout d'abord décrite en termes quantitatifs par la présence ou non de TILs dans des mélanomes primaires ce concept a été complété par la définition de l'immunoscore qui ajoute à la densité d'infiltration des tumeurs une étude de la localisation et de la qualité de l'infiltrat (Clemente et al., 1996; Galon et al., 2006). Dans le mélanome 3 immunotypes ont pu être définis : l'absence d'infiltrat immunitaire, un infiltrat faible et plutôt périphérique et un infiltrat intratumoral dense et diffus. Ce dernier immunotype est corrélé avec le meilleur pronostic pour les patients (Erdag et al., 2012).

II. De l'immunosurveillance à l'immunoediting des tumeurs

Au cours d'une étude visant à démontrer le concept d'immunosurveillance il a été observé des disparités de pénétrance des tumeurs formées dans des animaux immunocompétents ou non. En effet des tumeurs provenant de souris ne possédant pas de lymphocytes matures ($RAG2^{-/-}$) étaient capables de progresser lorsque greffées dans des hôtes également immunodéficients mais étaient rejetées dans plus de la moitié des cas chez un hôte immunocompétent (Shankaran et al., 2001). Les tumeurs qui se développent en présence d'un système immunitaire intact seraient donc moins immunogènes.

Ces observations ont remis en cause la vision simpliste de l'immunosurveillance pour poser les bases de l'immunoédition. Parallèlement à son action protectrice, le système immunitaire favorise l'émergence de cellules tumorales capables de résister à son attaque et ce de façon continue au cours de la croissance tumorale. Le développement des tumeurs sous la pression du système immunitaire a été résumé par Dunn, Old et Schreiber qui en 2004 ont formulé la théorie des 3E. Les tumeurs se développent dans un organisme immunocompétent en suivant trois phases : l'élimination, l'équilibre puis l'échappement (Dunn, Old, & Schreiber, 2004).

La phase d'élimination correspond à l'initiation de la réponse immunitaire anti-tumorale, de la détection par les cellules de l'immunité innée (NK, NKT, gd, macrophages) à l'établissement du contexte inflammatoire et à l'activation d'une réponse adaptative spécifique. C'est un processus continu qui doit se répéter à chaque fois qu'un nouveau clone néoplasique apparaît. L'élimination correspond à l'ancien concept d'immunosurveillance et si elle est efficace elle permet de détruire la totalité des cellules tumorales.

Dans les cas où la phase d'élimination n'est pas complètement efficace, les cellules immunitaires et les variants tumoraux qui ont survécu entrent dans la phase d'équilibre. Les lymphocytes et l'environnement inflammatoire (notamment l'IFN γ) tumoraux exercent une pression de sélection constante sur les cellules tumorales qui ne permet la survie et la sélection clonale que de celles qui sont capables d'échapper au système immunitaire. La réaction anti-tumorale permet d'endiguer la prolifération tumorale sans l'arrêter complètement du fait de l'existence de multiples variants tumoraux. Cette phase est certainement la plus longue des trois, pouvant durer jusqu'à plusieurs années. A son issue, la tumeur est composée de nouveaux clones tumoraux d'immunogénicité réduite.

Si ces variants arrivent à croître de façon suffisante pour former des tumeurs détectables, on atteint la dernière phase, l'échappement tumoral. Elle repose sur l'acquisition par les cellules tumorales de changements génétiques ou épigénétiques leur conférant une résistance à la détection ou à l'élimination par le système immunitaire. Ces variations comprennent à la fois le conditionnement de la réponse immunitaire par le microenvironnement tumoral (présence de cytokines immunosuppressives : TGF- β , IL-10 et différenciation de lymphocytes T régulateurs) et des altérations au niveau tumoral qui permettent d'éviter la reconnaissance et/ou la destruction (perte d'expression des antigènes ou des molécules CMH, perte de sensibilité à l'IFN γ).

La réponse immunitaire anti-tumorale développée spontanément dans un organisme vivant est un acteur important de l'établissement et de la progression tumorale mais peut également être un outil de choix pour en contenir la progression. Les différentes approches thérapeutiques permettent selon les stratégies employées, soit de stimuler l'ensemble du système immunitaire soit de privilégier la fraction spécifique de l'activité anti-tumorale. Elles

peuvent initier une réponse immunitaire spontanément inexistante dans le cas par exemple où la tumeur n'est pas détectée ou bien amplifier la réponse spontanée afin de la rendre plus efficace. Dans cette dernière catégorie, les 15 dernières années ont vu l'essor des thérapies visant à lever les inhibitions physiologiques des lymphocytes T par engagement de récepteurs inhibiteurs comme CTLA-4 ou PD-1. L'utilisation d'anticorps monoclonaux anti checkpoint inhibiteurs potentialisent la réponse anti-tumorale existante et permettent une augmentation considérable de la survie d'une fraction non négligeable de patients notamment dans des pathologies dont le pronostic est habituellement pauvre comme le mélanome métastatique (Brahmer et al., 2012; Topalian et al., 2012).

4- Les antigènes de la famille MELOE

I. Mise en évidence

Au sein de notre équipe de recherche, l'étude rétrospective de populations de TILs administrées à des patients porteurs de mélanome dans le cadre d'un traitement adjuvant après exérèse de métastases ganglionnaires a permis la mise en évidence de MELOE-1, un nouvel antigène de mélanome (Godet et al., 2008).

Sur les 30 patients HLA-A2 inclus dans l'étude, 9 n'ont pas rechuté et parmi ces derniers des lymphocytes spécifiques de MELOE-1 ont été détectés à des fréquences variables dans les TIL injectés (0,07 à 3,8% des TILs CD8⁺) chez 5 patients. De façon intéressante aucun des patients de cette étude ayant rechuté (n=21) n'avait été injecté avec des TILs spécifiques de MELOE-1. Il existe donc une corrélation entre la survie sans rechute et le transfert adoptif de lymphocytes T MELOE-1-spécifiques.

L'établissement de clones lymphocytaires T spécifiques de MELOE-1 a permis de décrire l'épitope (MELOE-1₃₆₋₄₄) reconnu au sein de l'antigène et sa restriction au HLA-A*0201. L'ensemble des lignées de mélanome HLA-A*0201 positives testées sont reconnues par ces clones, contrairement aux lignées tumorales d'autres origines histologiques. Une réactivité faible à nulle face à des mélanocytes sains a également été observée (figure 18) (Godet et al., 2008).

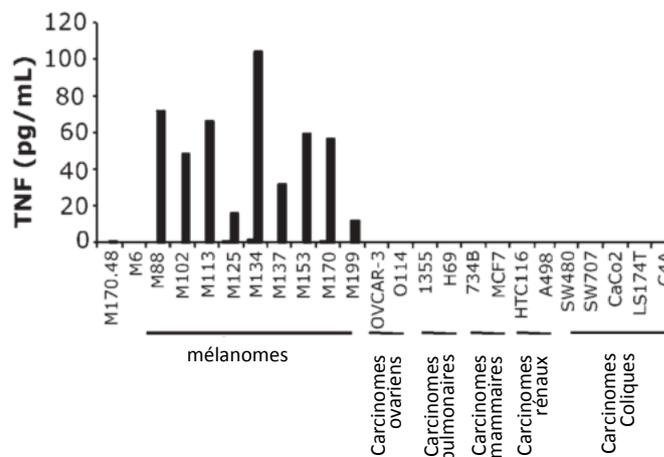


Figure 18: Sécrétion de TNF par le clone MELOE-1 spécifique M170.48 en réponse à des lignées tumorales d'origines diverses HLA-A*0201 positives. La lignée de mélanome M6 (HLA-A2 négative) est utilisée en contrôle négatif. (Godet et al., 2008)

Ces observations sont cohérentes avec les profils d'expression d'antigènes de différenciation mélanocytaire, sauf en ce qui concerne l'absence de reconnaissance des mélanocytes HLA-A2 par des lymphocytes T spécifiques. L'étude de l'origine de cet antigène de 46 acides aminés a révélé qu'il était issu de la surexpression de l'ARN *meloe* dans les cellules de la lignée mélanocytaire (mélanocytes et mélanomes) ce qui lui vaut son nom de « melanoma overexpressed » antigen. Parmi les autres tissus testés, l'ARN *meloe* est largement sous-exprimé dans les tissus sains et les autres types de tumeurs (Figure 19).

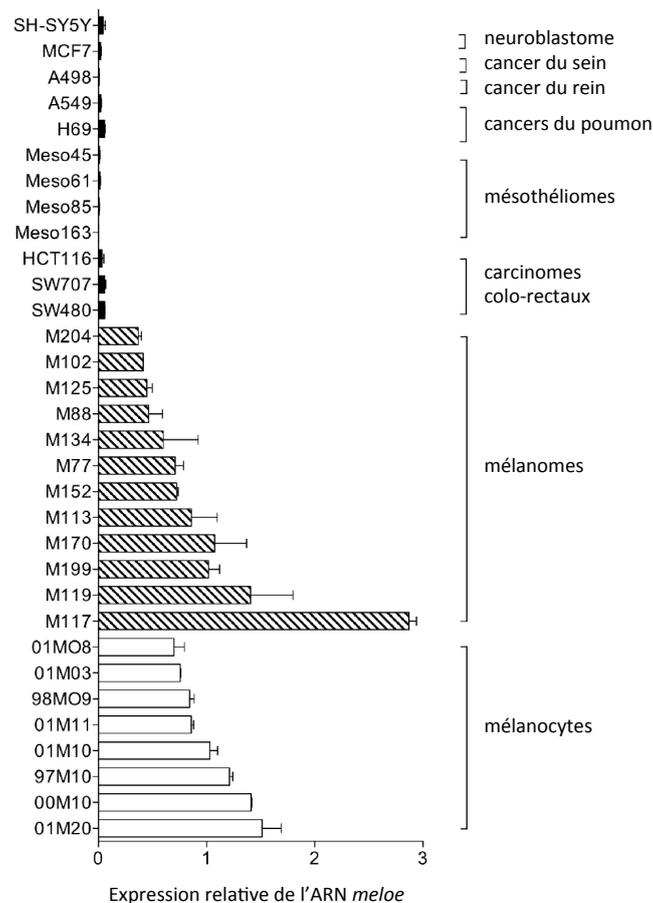


Figure 19 : Expression relative de l'ARN *meloe* dans des échantillons de tissus sains ou tumoraux d'origines différentes. Issu de (Bobinet et al., 2013).

Cet antigène impliqué dans l'immunosurveillance du mélanome posséderait donc une double spécificité : mélanocytaire, de part le profil d'expression de son ARN messager et tumorale de part son profil de reconnaissance par des lymphocytes T spécifiques.

Quelques années plus tard, un second antigène également, MELOE-2, issu de *meloe* et impliqué dans la réaction immunitaire spécifique de mélanome a été décrit (Godet, Moreau-Aubry, et al., 2010).

II. Réponse immunitaire spécifique des antigènes MELOE-1 et MELOE-2

Chez les patients atteints de mélanome ainsi que chez les donneurs sains HLA-A*0201 la fréquence des lymphocytes T CD8⁺ MELOE-1₃₆₋₄₄ spécifique est comprise entre 1.8 pour 1x10⁶ à 1,7 pour 1x10⁵ cellules CD8⁺ chez les donneurs sains et les patients porteurs de mélanome HLA-A2 (Godet, Desfrancois, et al., 2010). Ces fréquences sont relativement élevées par rapport à celles observées pour d'autres antigènes de tumeur. Pour comparaison on retrouve chez les donneurs sains des fréquences classiques pour les antigènes de tumeur de 1 pour 10⁷ (Chaux et al., 1999) et pour l'épitope immunodominant MelanA₂₆₋₃₅ extrêmement représenté de 1,8 pour 1x10⁵ à 2,5 pour 1x10⁴ (Pittet et al., 2002; Zippelius et al., 2002). Le répertoire T CD8⁺ spécifique de MELOE-1 possède un phénotype divers, de naïf à effecteur mémoire, selon les patients et avec une récurrence du segment TRAV α 12-1. Enfin les clones isolés affichent une large gamme d'avidités pour le complexe HLA-peptide avec cependant une avidité significativement plus faible pour les clones issus de donneurs sains comparés au clones issus de patients (Godet, Desfrancois, et al., 2010).

De plus, la réaction immunitaire dirigée contre l'antigène MELOE-1 est complétée par l'activation de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de différents épitopes dispersés sur l'ensemble de la séquence protéique et présentés dans des contextes HLA divers (Bobinet et al., 2012; Rogel, Vignard, Bobinet, Labarriere, & Lang, 2011). Ces lymphocytes T CD4⁺ spécifiques présentent majoritairement un phénotype Th1 dont l'implication dans la réponse immunitaire anti-tumorale a été décrite (Kennedy & Celis, 2008).

L'antigène MELOE-2 est également reconnu par des lymphocytes T CD8⁺ oligoclonaux dans le contexte HLA-A*0201 (Godet, Moreau-Aubry, et al., 2010).

Les antigènes issus de la traduction de l'ARN *meloe* sont donc fortement immunogènes et semblent être des cibles intéressantes pour l'immunothérapie dans le traitement du mélanome.

III. Structure de l'ARN *meloe*

Le gène codant pour ces antigènes de mélanome a été identifié à partir d'une librairie d'ADNc issue d'une lignée de mélanome (Godefroy et al., 2005). *meloe* est un gène de 2415 paires de bases situé sur le chromosome 2, en anti-sens du troisième intron de l'histone déacétylase 4 (HDAC-4). L'absence d'homologie pour cette séquence dans le génome d'autres espèces de mammifères indiquent que ce gène n'est pas conservé.

Le cDNA *meloe* identifié dans la banque issue d'une lignée de mélanome présente une correspondance linéaire parfaite avec la séquence génomique (issue de (Venter et al., 2001)) indiquant une absence d'épissage de l'ARN *meloe*. L'absence d'épissage a été validée par la mise en évidence d'un transcrit unique correspondant à la taille du gène dans son ensemble dans chacune des lignées de mélanome ou mélanocytes testés (Carbonnelle et al., 2013). L'ARN *meloe* est coiffé et poly-adénylé et est exprimé dans l'ensemble des cellules de la lignée mélanocytaire. Il est en revanche peu ou non détecté dans les autres types tumoraux ou tissus sains d'origines différentes testés ce qui suggère une régulation de la transcription qui est spécifique des cellules mélanocytaires.

Cependant, la reconnaissance des mélanocytes par des clones T spécifiques de MELOE-1 ou de MELOE-2 est très faible comparée à celles des cellules de mélanome (Godet et al., 2008; Godet, Moreau-Aubry, et al., 2010). L'expression de ces deux antigènes semble donc sujette à une régulation supplémentaire au niveau de la traduction, qui elle est tumeur spécifique.

La structure de l'ARN *meloe* ne correspond pas à celle de la majorité des ARN eucaryotes. Il ne comporte pas de cadre de lecture unique et de taille importante mais de multiples ORFs courts. La structure de l'ADN et de l'ARN *meloe* sont illustrés sur la figure 20.

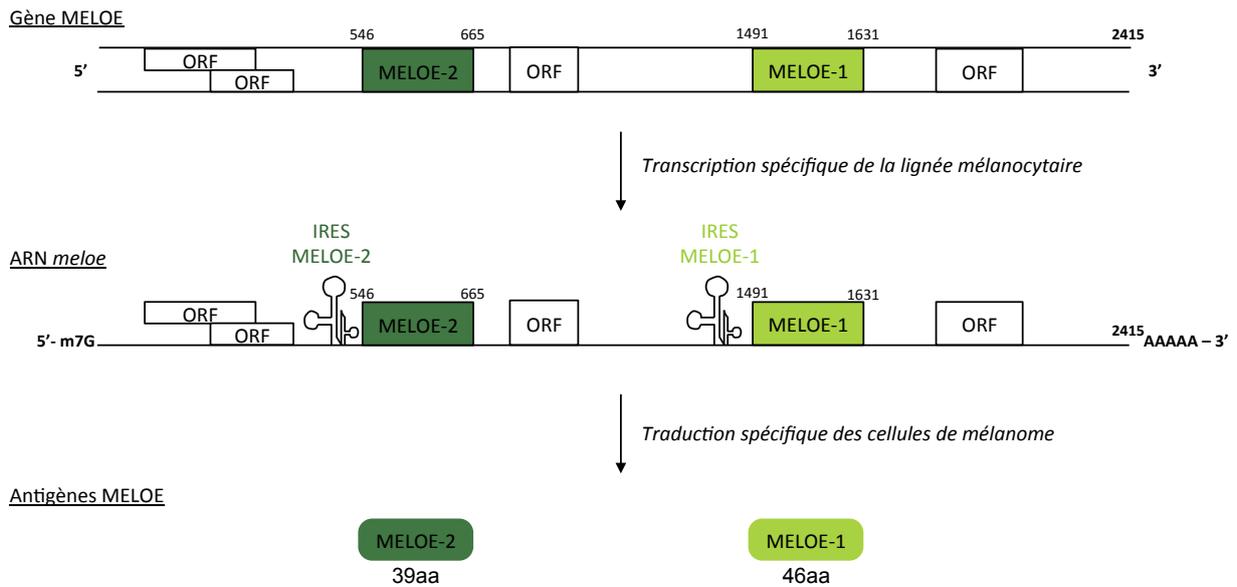


Figure 20 : Structure de l'ADN et de l'ARN *meloe*.

MELOE-1 et MELOE-2 sont codés par deux ORFs situés au centre de l'ARN, respectivement ORF₍₁₄₉₁₋₁₆₃₁₎ et ORF₍₅₄₆₋₆₆₅₎. Aussi il est souvent fait référence à l'ARN *meloe* comme à un long ARN non codant (lncRNA) plutôt qu'à un ARN messager (mRNA).

IV. Régulation de l'expression de MELOE-1 et MELOE-2

Le profil d'expression des antigènes de mélanome MELOE-1 et MELOE-2 ne semble donc trouver de place dans aucune des classes définies précédemment. Ils sont spécifiques d'une lignée tissulaire sans que la réaction immunitaire qu'ils déclenchent ne risque d'être toxique pour les mélanocytes car ils ne sont pas reconnus par les cellules immunitaires spécifiques. Les mécanismes de régulation qui sous-tendent cette spécificité ont été étudiés par notre équipe.

A. Régulation transcriptionnelle

L'étude de la régulation de la transcription de *meloe* repose sur deux mécanismes distincts : un mécanisme épigénétique de contrôle de la méthylation et l'implication de facteurs de transcription (Bobinet et al., 2013; Chalopin, Florenceau, Fradin, Labarrière, & Moreau-Aubry, 2015).

La définition d'un promoteur minimal de *meloe* et l'identification dans cette région de sites de fixation pour différents facteurs de transcription a permis de déterminer ceux dont l'activité est nécessaire à l'expression de MELOE-1 en particulier. Les facteurs de transcription SOX-9 et SOX-10, appartenant au sous-groupe SOX-E de facteurs impliqués dans la mélanogenèse sont impliqués dans l'activation du promoteur *meloe* (Bobinet et al., 2013; Harris et al., 2010). Ils sont fortement exprimés dans les mélanocytes et les mélanomes et peu ou pas dans les autres lignées tumorales ou tissus sains testés. De plus le facteur de transcription CREB sous sa forme activée phosphorylée (P-CREB) est également impliqué dans la transcription de *meloe*. Contrairement à SOX-9 et SOX-10 il s'agit d'un facteur ubiquitaire impliqué dans la transcription de nombreux gènes (Mayr & Montminy, 2001). La forme P-CREB est détectée non seulement dans la lignée mélanocytaire mais aussi dans des tissus d'origines histologiques différentes. L'absence de fixation au site de liaison au sein du promoteur de *meloe* implique un niveau de régulation supplémentaire.

Afin de valider la disponibilité de la région codante *meloe* sa méthylation a été documentée. On observe dans les lignées de mélanome une hypo-méthylation spécifique des régions promotrice et codante *meloe* (Bobinet et al., 2013; Chalopin et al., 2015). A l'inverse, ces mêmes régions dans des tumeurs ou tissus sains d'origine différente sont hyper-méthylées, la transcription de ces zones est donc impossible, comme la fixation de P-CREB sur son site de liaison. A l'inverse des dé-méthylations larges observées dans les cellules tumorales par comparaison avec les tissus sains correspondants le motif observé dans le cas de *meloe* est circonscrit au locus du gène et partagé par les cellules normales et tumorales. Il s'agit donc d'un motif épigénétique spécifique.

B. Régulation traductionnelle

La traduction de deux courtes protéines à partir d'un même ARN soulève la question des mécanismes mis en jeu. Dans le cas de MELOE-1 et MELOE-2, l'élimination de la présence d'un promoteur alternatif, d'un épisode d'épissage de l'ARN et l'utilisation de constructions bicistroniques ont permis de mettre en évidence la présence de séquences d'entrée du ribosome internes ou IRES (Internal Ribosome entry Site) responsables de l'initiation de la traduction des deux antigènes (Carbonnelle et al., 2013). Les séquences IRES peuvent être reconnues directement ou indirectement par les sous unités ribosomales et initier la traduction de l'ORF directement en aval en s'affranchissant de la voie classique de

reconnaissance de la coiffe 5', de lecture de l'ARN puis d'initiation de la traduction. Une séquence IRES a pu être mise en évidence devant chacun des antigènes MELOE.

La spécificité de reconnaissance des clones spécifiques de MELOE-1 et MELOE-2 pour les cellules de mélanome pourrait donc reposer sur une activation des séquences IRES uniquement dans les cellules tumorales et donc l'absence des protéines cibles dans les mélanocytes.

La publication intitulée « The Melanoma Antigens MELOE-1 and MELOE-2 Are Translated from a Bona Fide Polycistronic mRNA Containing Functional IRES Sequences » (Carbonnelle et al., 2013) concernant l'étude des mécanismes de traduction de MELOE-1 et MELOE-2 est présentée en annexe.

V. Utilisation des antigènes MELOE en immunothérapie.

L'immunogénicité des antigènes MELOE, la fréquence et la qualité de leur répertoire spécifique ainsi que la sécurité de leur emploi grâce à leur double niveau de régulation en font des cibles de choix pour les protocoles d'immunothérapie du mélanome.

Au sein de notre équipe cet intérêt a été exploité par la mise en place du protocole clinique MelSort : « Adoptive Transfer of Specific Melanoma Antigens CD8+ T Cells in Metastatic Melanoma Patients » (NCT02424916). Il s'agit d'un essai thérapeutique de phase I/II de transfert adoptif de lymphocytes T CD8+ autologues non génétiquement modifiés spécifiques des antigènes de mélanome Melan-A/MART-1 et MELOE-1. Grâce à une technique de tri magnétique originale les lymphocytes spécifiques des épitopes immunodominants Melan-A_{A27L} et MELOE-1₃₆₋₄₄ sont isolés, amplifiés puis réinjectés en grand nombre au patient (Labarriere et al., 2013). Les phases générales du protocole sont détaillées sur la figure 21.

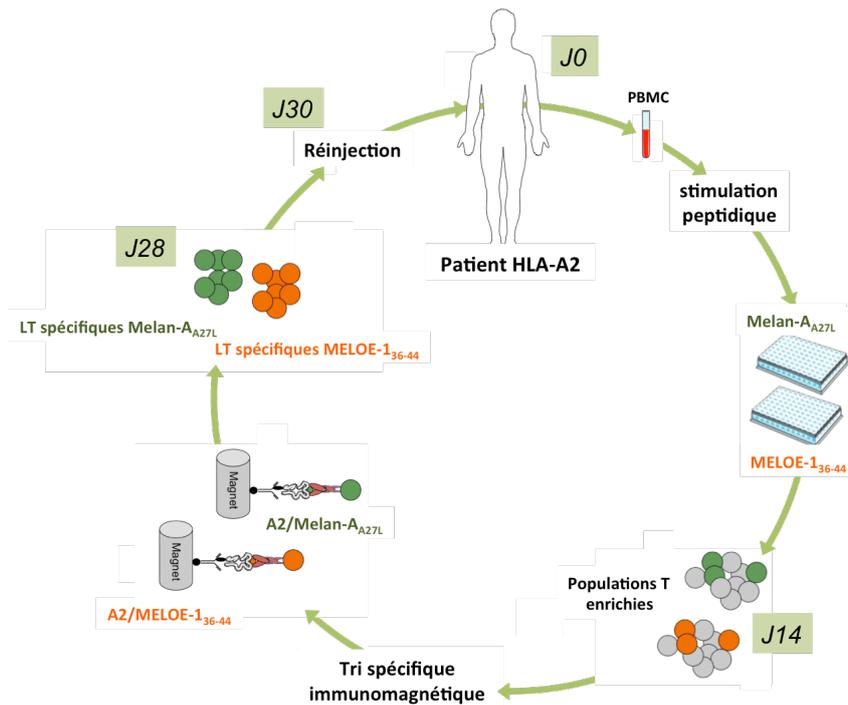


Figure 21 : Protocole de production de lymphocytes spécifiques des antigènes MELOE-1 et Melan-A à des fins de transfert adoptif – protocole MelSort (Labarriere et al., 2013).

L'objectif principal de cette étude est l'étude de la faisabilité et de la sécurité de ce protocole innovant. Les objectifs secondaires sont l'efficacité thérapeutique et le suivi immunologique des patients inclus.

Résultats

Objectifs

Les antigènes de la famille MELOE sont des cibles de choix pour une utilisation dans des protocoles d'immunothérapie. L'objectif de mes travaux de thèse a été de poursuivre l'étude de leur expression et des mécanismes qui la régulent et qui leur confèrent leur spécificité aux cellules de mélanome. Ce travail est divisé en deux parties

- Tout d'abord, parmi les nombreux ORFs putatifs de *meloe* nous avons souhaité vérifier si d'autres que MELOE-1 et MELOE-2 pouvaient être traduits et si oui, quels étaient les mécanismes moléculaires impliqués dans leur traduction. Dans cette première étude nous avons également évalué si les modes de traduction pouvaient conditionner l'immunogénicité des polypeptides produits.

Cette étude a fait l'objet d'une publication intitulée « IRES-dependent translation of the long non coding RNA meloe in melanoma cells produces the most immunogenic MELOE antigens » dans le journal *Oncotarget*.

- Puis nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'activation de la séquence IRES qui contrôle la traduction de MELOE-1 dans les cellules de mélanome. L'activation de nombreuses IRES a été décrite dans des contextes tumoraux afin de maintenir l'expression de protéines nécessaires à la survie cellulaire. Cependant la mise en évidence de la présence d'une activité IRES sur environ 10% des transcrits ouvre de nouvelles possibilités quant à l'activation de l'expression IRES-dépendante de protéines non impliquées dans les voies de réponse au stress cellulaire. Elucider les mécanismes d'activation de la séquence IRES responsable de la traduction de MELOE-1 permettrait de rechercher d'autres antigènes régulés par ces mêmes mécanismes et donc de définir une nouvelle catégorie de cibles potentielles, immunogènes et tumeur-spécifiques, pour l'immunothérapie anti-tumorale.

Etude N°1 : Mécanismes de traduction et immunogénicité des protéines issues de la traduction de *meloe*.

Dans une première étude nous avons cherché à mettre en évidence l'expression de nouvelles protéines issues de l'ARN *meloe* et utilisant éventuellement des modes de traduction autres que les IRES comme c'est le cas pour MELOE-1 et MELOE-2. Pour cela nous avons ciblé notre travail sur MELOE-3 (ORF₁₃₂₋₂₉₆) situé en position 5' sur l'ARN. . En effet cet ORF est le premier ORF de plus de 100pb de l'ARNm *meloe*, et de par sa position, il était susceptible d'être activé par un mécanisme de traduction plus classique. Son expression a été validée dans des cellules de mélanome par transfection transitoire de plasmides codant pour une protéine eGFP-MELOE-3 et détection de la fluorescence en microscopie. De plus des protocoles de transfection de protéines de fusion semblables appliqués aux 3 antigènes MELOE suivis de la détection de l'expression par Western Blot en utilisant un anticorps anti-eGFP a permis de comparer dans les cellules le taux d'expression des différents polypeptides dans les cellules de mélanome. Nous avons ainsi mis en évidence une forte surexpression de MELOE-3 en comparaison avec MELOE-1 et MELOE-2.

Nous avons ensuite montré qu'aucune activité IRES n'est détectée dans la région en amont de MELOE-3 en transfectant dans les cellules de mélanome une construction bi-cistronique dans laquelle la séquence 5'UTR de MELOE-3 (580pb) a été placée entre deux gènes rapporteurs luminescents. Puis par des expériences de traduction *in vitro* de constructions mono-cistroniques dans lesquelles une coiffe 5' était ajoutée ou non à l'extrémité de la région 5'UTR nous avons montré que l'expression de MELOE-3 est strictement coiffe-dépendante. Ce mode de traduction étant actif dans toutes les cellules saines, nous avons émis l'hypothèse de l'expression de MELOE-3 à la fois dans les cellules tumorales et dans les mélanocytes sains. Pour la vérifier, nous avons mis en place une collaboration avec le Pr M. Krempf et le Dr M. Croyal de la plateforme de spectrométrie de masse du CNRH (Centre de Recherche en Nutrition Humaine Ouest). Nous avons mis au

point un protocole de spectrométrie de masse en tandem permettant de détecter un fragment signature de MELOE-3 dans des lysats cellulaires. Comme nous l'avions suspecté, MELOE-3 a pu être détecté dans les cellules de mélanome et dans les mélanocytes normaux. Les quantités de protéines détectées étaient faibles et non significativement différentes entre les cellules tumorales et saines.

Enfin, nous avons souhaité comparer l'immunogénicité de MELOE-1 (IRES-dépendant) et de MELOE-3 (coiffe-dépendant) en stimulant des PBMCs de 6 donneurs sains HLA-A*0201 avec des peptides chevauchants de MELOE-1 et MELOE-3. Alors que tous les patients présentent des réponses CD4⁺ et CD8⁺ contre MELOE-1 les réponses à la stimulation par des polypeptides issus de MELOE-3 sont rares voire inexistantes chez certains patients.

Cette observation associée à l'expression de MELOE-3 dans les mélanocytes sains est en faveur d'un mécanisme de tolérance vis à vis de MELOE-3 considéré comme un antigène du soi par le système immunitaire, tandis que MELOE-1 et MELOE-2 dont l'expression n'est activée que dans les cellules tumorales peuvent être décrits comme des "néo-antigènes". Ainsi notre conclusion est que parmi les protéines traduites à partir de l'ARN polycistronique *meloe*, seules celles dont la traduction dépend de séquences IRES induisent une réponse immunitaire spécifique des cellules de mélanome.

IRES-dependent translation of the long non coding RNA *meloe* in melanoma cells produces the most immunogenic MELOE antigens

Maud Charpentier¹, Mikael Croyal^{2,3}, Delphine Carbonnelle¹, Agnès Fortun¹, Laetitia Florenceau^{1,4}, Catherine Rabu¹, Michel Krempf^{2,3,4}, Nathalie Labarrière^{1,4}, François Lang¹

¹CRCNA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

²UMR INRA 1280, CHU, Nantes, France

³West Human Nutrition Research Center, CHU, Nantes, France

⁴CHU, Nantes, France

Correspondence to: François Lang, **email:** francois.lang@univ-nantes.fr

Keywords: melanoma, IRES, long non coding RNA, tumor antigens, immunotherapy

Received: June 07, 2016

Accepted: July 20, 2016

Published: July 29, 2016

ABSTRACT

MELOE-1 and MELOE-2, two highly specific melanoma antigens involved in T cell immunosurveillance are produced by IRES-dependent translation of the long « non coding » and polycistronic RNA, *meloe*. In the present study, we document the expression of an additional ORF, MELOE-3, located in the 5' region of *meloe*. Data from *in vitro* translation experiments and transfection of melanoma cells with bicistronic vectors documented that MELOE-3 is exclusively translated by the classical cap-dependent pathway. Using a sensitive tandem mass spectrometry technique, we detected the presence of MELOE-3 in total lysates of both melanoma cells and normal melanocytes. This contrasts with our previous observation of the melanoma-restricted expression of MELOE-1 and MELOE-2. Furthermore, *in vitro* stimulation of PBMC from 6 healthy donors with overlapping peptides from MELOE-1 or MELOE-3 revealed a very scarce MELOE-3 specific T cell repertoire as compared to the abundant repertoire observed against MELOE-1. The poor immunogenicity of MELOE-3 and its expression in melanocytes is consistent with an immune tolerance towards a physiologically expressed protein. In contrast, melanoma-restricted expression of IRES-dependent MELOE-1 may explain its high immunogenicity. In conclusion, within the MELOE family, IRES-dependent antigens represent the best T cell targets for immunotherapy of melanoma.

INTRODUCTION

In the field of cancer immunotherapy, the recently described effectiveness of checkpoint inhibitors such as anti-PD1 blocking antibodies to boost anti-tumor T cell responses is very encouraging [1]. However, a significant number of patients are non responders to these therapies and thus, there is still room for improvement using antigen-specific immunotherapy, whether through vaccination or through T cell transfer. In this respect, the choice of the targeted antigens remains a critical issue [2] and the ideal antigen(s) should have the following characteristics : be as tumor specific as possible and stimulate a broad T cell

repertoire in the majority of patients (i.e. generate many epitopes in various HLA contexts). In this respect, we have previously identified two melanoma antigens, namely MELOE-1 and MELOE-2, that were recognized by tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) from HLA-A0201+ patients who remained relapse-free following TIL transfer in an adjuvant setting [3].

Unexpectedly, these two antigens were translated from a single unspliced RNA that we named *meloe* since this RNA was overexpressed in the melanocytic lineage. This RNA probably belongs to the family of long intronic non coding RNA (lncRNA) [4] since it shares many of their features: it is located in the intron of HDAC4 in

antisense direction, it is capped and polyadenylated and contains no long ORF but multiple short ORFs (< 100 aa) and is transcribed in a tissue specific manner i.e. the melanocytic lineage [5, 6]. Despite their denomination as « non coding » RNAs, it was shown that many lncRNAs can in fact be translated into short polypeptides [7, 8, 9].

In the case of *meloe*, we demonstrated that the translation of the MELOE-1 and 2 polypeptides (39 aa and 46 aa long respectively) in melanoma cell lines was achieved by an IRES-dependent mechanism [10]. In contrast, although normal melanocytes expressed *meloe* RNA, they were not recognized by MELOE-1 or MELOE-2 specific T cell clones suggesting that MELOE-1 and 2 were not translated in these cells.

We also provided evidence that a broad T cell repertoire against the MELOE-1/HLA-A2 epitope was present in both melanoma patients and healthy individuals [11] and that processing of MELOE-1 could also generate several class II epitopes in various HLA contexts [12, 13].

Since *meloe* RNA contains many other ORFs close to the 5' end, we wondered whether this RNA could also generate polypeptide(s) through cap-dependent translation and whether this new MELOE polypeptide(s) would be immunogenic. In the present report, we identify a new polypeptide of the MELOE family, MELOE-3, and describe its expression and its immunogenicity in comparison with that of MELOE-1 to evaluate its potential value as a T cell target for melanoma immunotherapy.

RESULTS

A new ORF from *meloe* RNA is efficiently translated in melanoma cells

In the course of precisely defining the +1 transcription start of the *meloe* RNA, we have previously shown that the transcript is in fact 259 bp longer at the 5' end than the public sequence reported in the NCBI data bank [NR-026664] [5]. Within this added sequence, three putative ORFs are present and we focused our attention on ORF₁₃₂₋₂₉₆ (Supplementary Figure S1) because it contained the best initiation sequence (AUGG) and would code for a 54 aa long polypeptide, coined MELOE-3. To check whether this ORF could be translated from *meloe* RNA in melanoma cells, we transfected the melanoma cell line M113 with a construct composed of the full length *meloe* RNA in which this ORF was replaced by a sequence coding for eGFP-MELOE-3 (Supplementary Figure S2) and compared it to M113 transfected with the previously described eGFP-MELOE-1 construct or with the native *meloe* cDNA as a negative control [10].

As shown on Figure 1A in a typical experiment, the percentage of fluorescent melanoma cells detected with an HCS array scan reader was much higher following transfection with the eGFP-MELOE-3 construct than with

the eGFP-MELOE-1 construct (29.5% for MELOE-3 vs 4.8% for MELOE-1). Similar percentages were obtained in two other experiments that were also confirmed by flow cytometry (data not shown). Moreover, the higher intensity of fluorescence of positive cells with eGFP-MELOE-3 suggested a more efficient translation than that of the eGFP-MELOE-1 construct.

To confirm that these observed differences in fluorescence reflected differences in amounts of translated protein, we performed a Western blot analysis of lysates of M113 cells transfected with the two constructs using an anti-eGFP monoclonal antibody. Untransfected cells and eGFP-transfected cells were used as negative and positive control respectively. As shown on Figure 1B, the expression of eGFP-MELOE-3 was much higher than that of eGFP-MELOE-1, all the more as only 10 µg of protein lysate of eGFP-MELOE-3-transfected cells were loaded as compared to 200 µg of lysate of eGFP-MELOE-1 transfected cells. These data strongly suggested that MELOE-3 could be very efficiently translated from *meloe* RNA in melanoma cells. Considering its location close to the 5' end of the transcript, we were prompted to test whether the translation of this ORF would be cap-dependent.

MELOE-3 is translated by a classical cap-dependent mechanism

To assess whether MELOE-3 translation was cap-dependent or not, we used an *in vitro* transcription and translation assay. We designed RNA constructs comprising either the 5' end of *meloe* upstream of MELOE-3 (1–132 bp) or the 5'UTR of Melan-A (54 bp) coupled to the Firefly luciferase coding sequence. Each construct was either capped or uncapped and used as translation templates in the rabbit reticulocyte lysate system. As shown on Figure 2A, the capped Melan-A construct, used as positive control, was very efficiently translated resulting in high firefly luminescence while this translation was absent with the uncapped construct. Likewise, only the capped MELOE-3 construct was translated demonstrating that the cap was compulsory for efficient translation in this system.

In addition, to confirm that no other translation mechanism could be involved in the expression of MELOE-3, we checked for the presence of IRES activity in the same upstream region of MELOE-3 in a cellular assay. We used bicistronic Renilla/Firefly expression vectors in which we cloned either the sequence of the EMCV IRES sequence as positive control or the 5' end of *meloe* and transfected M113 melanoma cells with them as previously described [10]. In 3 distinct experiments, we could not detect any IRES activity within the upstream region of MELOE-3 while the EMCV IRES sequence allowed efficient translation of firefly luciferase as

expected (Figure 2B). These data further supported the hypothesis that MELOE-3 is exclusively translated by a classical cap-dependent mechanism in melanoma cells.

MELOE-3 is expressed in both melanoma cells and normal melanocytes

A few years ago, after we had identified MELOE-1 as a source of T cell epitopes in melanoma cells, we had a monoclonal antibody made against MELOE-1, whose specificity and affinity was confirmed by ELISA on synthetic MELOE-1. However, despite our efforts, we could not detect the whole MELOE-1 polypeptide in melanoma cell lines by Western blot or by flow cytometry with this antibody (data not shown). We reasoned that this may be due to too low levels of MELOE-1 translation and/or the short half-life of the polypeptide that may be quickly degraded by the proteasome to generate T cell epitopes. In contrast, MELOE-3 seemed to be translated in much greater amounts according to the transfection experiments mentioned above and we figured that it may

be possible to detect it in untransfected melanoma cells with a specific antibody. Moreover, we reasoned that since the *meloe* transcript is present in normal melanocytes, cap-dependent translation of MELOE-3 should also occur in normal melanocytes.

We thus had a monoclonal antibody made against MELOE-3 and used it to screen melanoma cell lines, normal melanocytes and the colon carcinoma cell line SW707 as negative control by flow cytometry on fixed and permeabilized cells. As shown on Figure 3, both normal melanocytes and melanoma cell lines were stained with the antibody while only a weak staining was observed on the SW707 cell line. However, our attempts to visualize MELOE-3 by Western blot with or without previous immuno-precipitation were unsuccessful, possibly in part because our mAb had a low affinity (10^{-6} M) for MELOE-3.

We thus decided to use LC-MS/MS to formally document the presence of MELOE-3 in melanocytes and melanoma cell lines. Digestion of MELOE-3 synthetic peptide by trypsin produced three peptide fragments

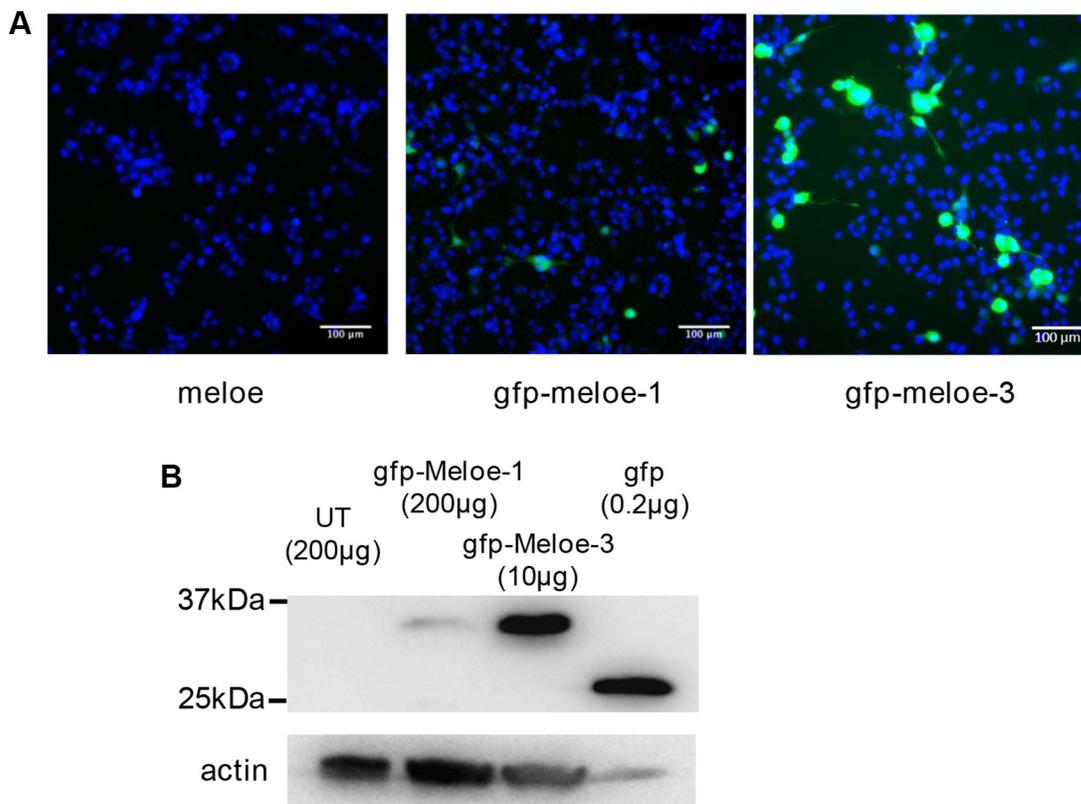


Figure 1: Expression of MELOE-1 and MELOE-3 in melanoma cells. (A) M113 melanoma cells were transfected with *meloe*-eGFP constructs: the native *meloe* cDNA (left panel), eGFP-MELOE-1 (middle panel) and eGFP-MELOE-3 (right panel). Analysis of fluorescent cells 48 h post-transfection was made using an automated fluorescence High Content Screening (HCS) microscopic device. Representative images out of 49 scanned fields per condition are shown. Nuclei were Hoescht stained prior to analysis. (B) Fluorescent eGFP-MELOE-1 (lane 2) or eGFP-MELOE-3 (lane 3) proteins were detected by western blot using an anti-eGFP mAb. Untransfected (UT) cells (lane 1) or cells transfected with the peGFP-N3 plasmid (lane 4) were used as controls. Amounts of total proteins loaded in each lane are indicated. A typical experiment is presented out of 4 performed.

among which the VFDTEIAQVTSDTAVGAR peptide had an appropriate size for subsequent LC-MS/MS analysis. The MS/MS fragmentation patterns of this peptide gave 29 transitions allowing us to fully sequence and thus unambiguously identify it (Figure 4A). We chose two major and specific MS/MS transitions for MRM detection, $940.5 \rightarrow 877.7$ (y_9^+ ; TSDTAVGAR) and $940.5 \rightarrow 1175.5$ (y_{12}^+ ; AQVTSDTAVGAR) as MELOE-3 signatures to assess its presence in different cell types. Since both transitions gave peaks of comparable intensities, instead of choosing one or the other, both transitions were summed for quantification. Total cell lysates from 6 different melanoma cell-lines and 4 melanocytes cultures were subjected to trypsin digestion and injected into the LC-MS/MS analyzer. Lysates from 2 mesothelioma cell lines and 1 colon carcinoma cell line in which *meloe* transcription is respectively absent or very low [5] were used as negative controls. Using this very sensitive and specific technique, MELOE-3 was detected in total lysates from all melanocytes cultures and melanoma cell lines but not in mesothelioma or colon carcinoma cell lines (Figure 4B). Quantification in cell lysates revealed that

some normal melanocytes could express similar amounts of MELOE-3 than some melanoma cell lines (Figure 4B). As a whole, melanoma cell-lines expressed higher levels of MELOE-3 than melanocytes (13.9 ± 5.0 pg/mg of protein vs 8.1 ± 3.9 pg/mg, $p = 0.02$).

MELOE-3 is a poor immunogen as compared to MELOE-1

We have previously shown that a broad and frequent T cell repertoire against MELOE-1 epitopes is present in melanoma patients and also in healthy individuals [11] and we wondered whether this would be the case for MELOE-3. To evaluate its immunogenicity in comparison with that of MELOE-1, we performed *in vitro* peptide stimulations of PBMC from 6 HLA-A*0201 healthy donors using 15–20 mers overlapping peptides covering the entire sequence of either MELOE-1 or MELOE-3 (Supplementary Figure S4). We used a mix of cytokines previously described to favor fast DC differentiation and maturation within total PBMC [15] and after 25 days of culture, we rechallenged the 96 initial microcultures with

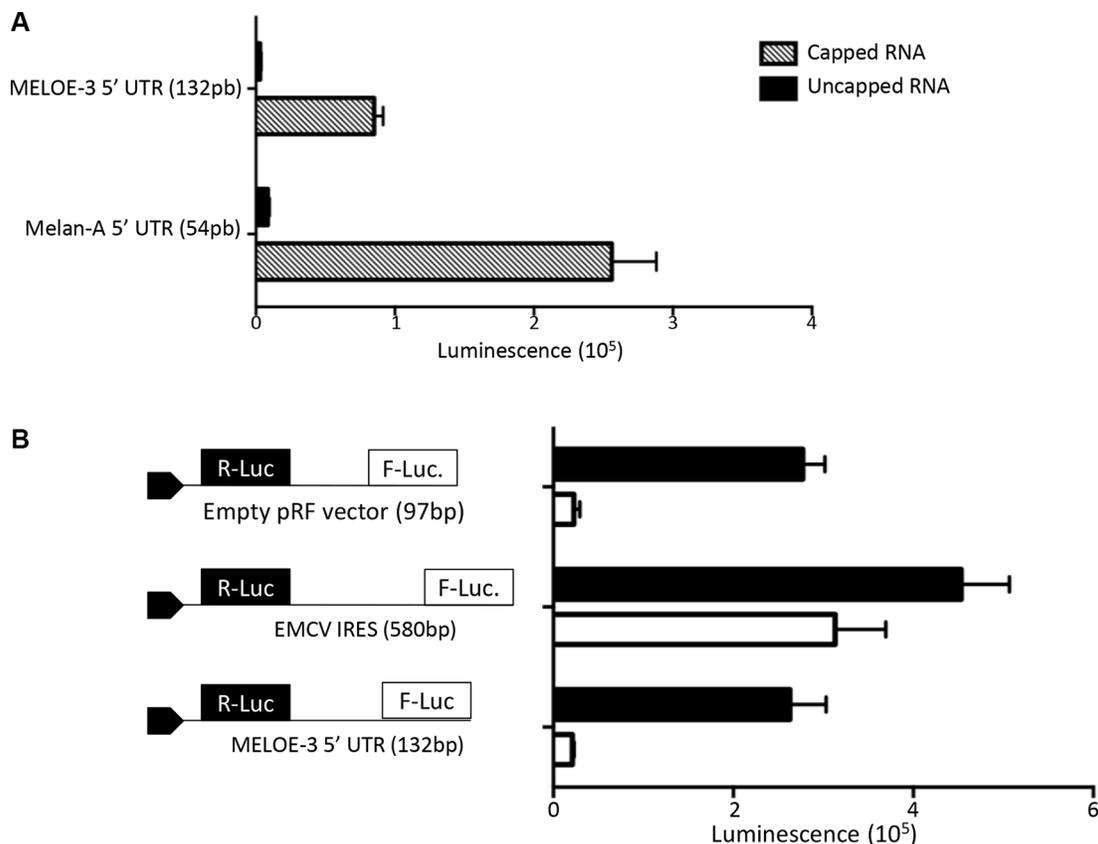


Figure 2: MELOE-3 translation mechanism. (A) *In vitro* transcribed RNA containing the Melan-A 5'UTR (positive control) or the MELOE-3 5'UTR upstream of Firefly luciferase with or without addition of a 5'MeG were *in vitro* translated using the Rabbit reticulocyte system. Luminescence is expressed in arbitrary units. (B) pRF bicistronic vectors containing the 5'UTR of MELOE-3, the viral IRES EMCV (positive control) or empty (control plasmid) were transfected into M113 melanoma cell line. Renilla (black bars) and Firefly (white bars) luciferase activities were measured after 48 h and expressed in arbitrary units. Data are expressed as mean \pm SD from three different experiments.

autologous monocytes-derived DC loaded or not with the same overlapping peptides. The presence of specific T cell responses was evaluated by $\text{INF}\gamma$ intracellular staining coupled to CD4 or CD8 T cell staining from each microculture. The threshold of positivity for a microculture was set at 0.5% $\text{INF}\gamma^+$ producing T cells

after subtraction of the background production against unloaded DC (Figure 5).

The reason for selecting HLA-A*0201 individuals was that it allowed us to check in parallel the CD8 response towards the HLA-A*0201 epitope from MELOE-1 by tetramer staining as an internal control. This selection of

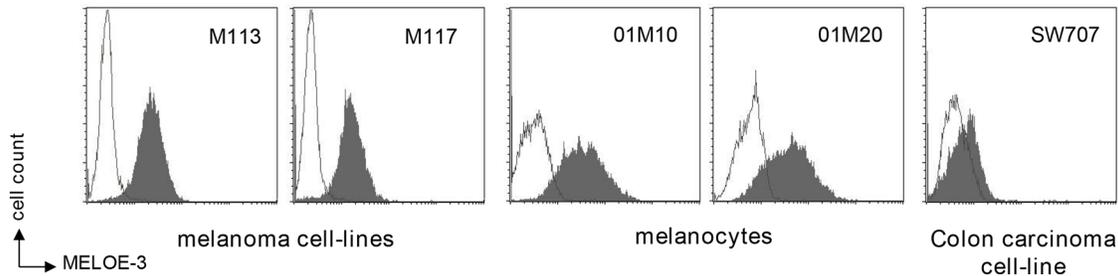


Figure 3: MELOE-3 staining. Melanocytes (01M10, 01M20), melanoma cell lines (M113, M117) and one colon carcinoma cell-line (SW707) were stained with a custom-made MELOE-3 monoclonal antibody (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and a PE-coupled anti-mouse $\text{F}(\text{ab}')_2$ (dark histograms) and analyzed by flow cytometry. A mouse control isotype was used as negative control (clear histograms).

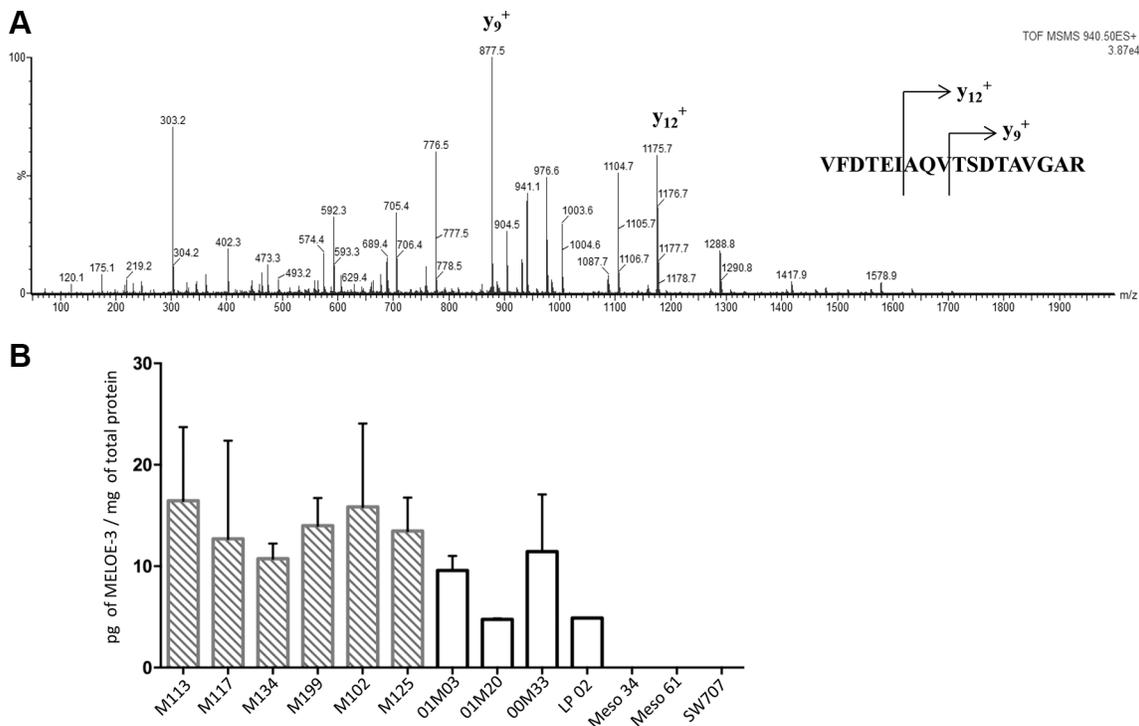


Figure 4: Detection and quantification of MELOE-3 by mass spectrometry. (A) The full length MELOE-3 synthetic peptide was trypsin digested and the VFDTEIAQVTSDDTAVGAR (m/z 940.5) sub peptide signature was isolated and fractionated into 29 product ions by tandem mass spectrometry. The major MS/MS transitions $940.5 \rightarrow 877.7$ (y_9^+ ; TSDTAVGAR) and $940.5 \rightarrow 1175.5$ (y_{12}^+ ; AQVTSDDTAVGAR) transitions were selected as MELOE-3 signatures. (B) Cell lysates from 6 melanoma cell lines (hatched bars) and 4 melanocytes cell lines (white bars) were trypsin digested and MELOE-3 transitions $940.5 \rightarrow 877.7$ and $940.5 \rightarrow 1175.5$ were detected by LC-MS/MS. A standard curve with a range of concentrations of synthetic peptides was used for quantification (see M&M and Supplementary Figure S3). Mesothelioma cell lines (Meso 4, Meso 61) and a colon carcinoma cell line (SW707) were used as negative controls. Data are mean \pm SD from 3 distinct experiments.

HLA-A*0201 donors did not bias *a priori* the stimulation in favor of MELOE-1 responses since MELOE-3 also contains putative HLA-A*0201 epitopes (www.bimas.cit.nih.gov) (in red in Supplementary Figure S4).

On Figure 5 is shown the percentage of microcultures containing CD4 specific T cells (panel A) and CD8 specific T cells (panel B) against MELOE-1 and MELOE-3 for each of the 6 donors. In agreement with our previous observations, all 6 healthy donors displayed a high percentages of CD4 T cell responses against MELOE-1 (range 16/96 to 96/96 positive microcultures). In marked contrast, CD4 responses against MELOE-3 were very scarce: 3 donors had only 1/96 positive culture and the other 3 donors had 2/96, 3/96 and 4/96 positive cultures respectively ($p = 0.02$ for MELOE-1 vs MELOE-3 responses). Likewise, a marked difference in CD8 T cell reactivity against MELOE-1 and MELOE-3 was observed: all 6 donors displayed significant CD8 T cell responses against MELOE-1 (range 4/96 to 29/96 positive cultures)

that were confirmed by tetramer staining (data not shown) while CD8 reactivity against MELOE-3 was absent in 4 donors and detectable in only 1/96 culture in the 2 other donors ($p = 0.009$ for MELOE-1 vs MELOE-3 responses).

DISCUSSION

A number of publications have suggested an important role of long non coding (lnc) RNAs in regulating gene expression through various mechanisms including epigenetic modifications (for review, [4]). In addition, over-expression of some lncRNA evidenced by RNAseq has been implicated in cancer progression in many different cancer types while other lncRNA act as tumor suppressors [18]. Aside from their role as gene expression regulators, lnc RNA have ribosome profiling signatures consistent with translation [8, 9] and we hypothesize that they may represent a good source of new immunogenic peptides to target in cancer immunotherapy. In fact, the

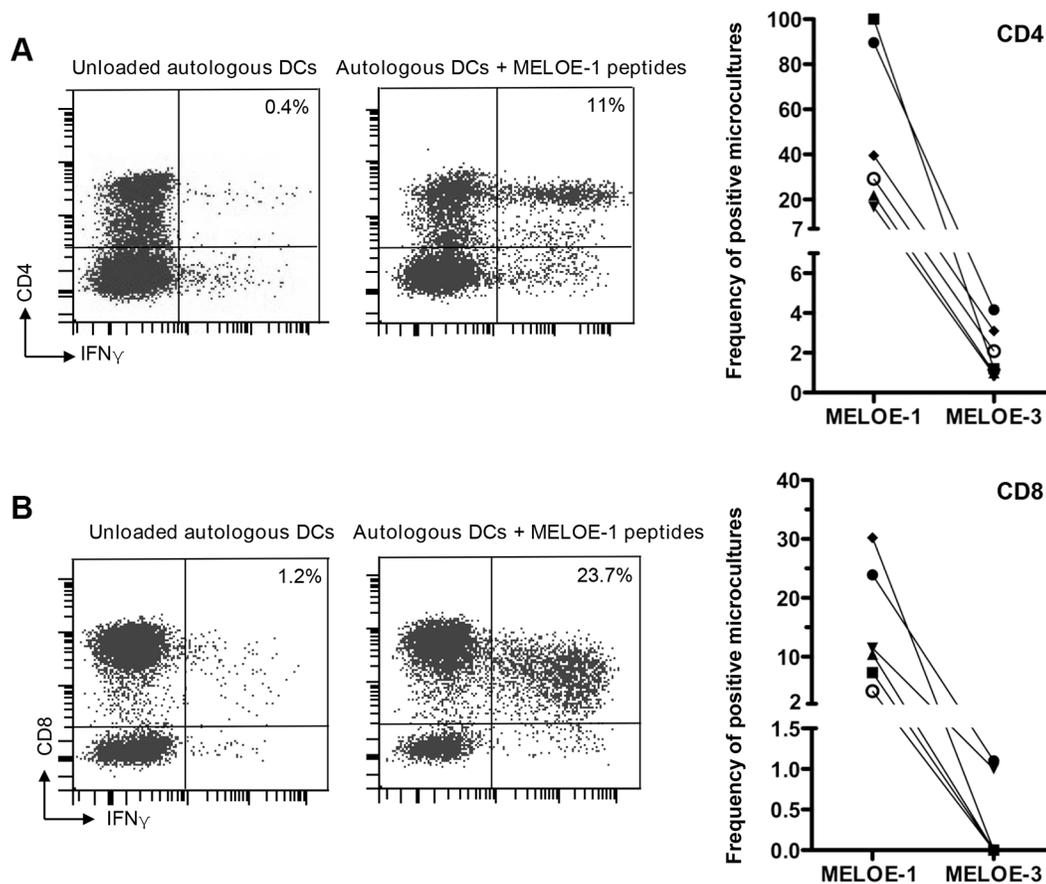


Figure 5: MELOE-1 and MELOE-3 immunogenicity. PBMCs from 6 healthy donors were primed for 25 days with overlapping 15 or 20 aa peptides from MELOE-1 or MELOE-3 in the presence of a cytokines mix designed to accelerate DC differentiation and maturation (acDCs) (see M&M). After restimulation with autologous acDCs loaded with MELOE-1 or MELOE-3 peptides, microcultures were screened for CD4⁺ IFN γ ⁺ (panel A) and CD8⁺ IFN γ ⁺ (panel B). Unloaded acDCs were used as negative control. Examples of positive CD4 or CD8 responses are shown on the left panels and summary of responses detected in the 6 donors is shown on the right. The threshold of positivity for a microculture was set at 0.5% IFN γ ⁺ producing T cells after subtraction of background.

Inc RNA *meloe* was identified by screening a melanoma cDNA library in search for the antigens recognized by tumor infiltrating T lymphocytes from a melanoma patient [3]. Following the identification of MELOE-1 and MELOE-2 antigens translated from two distinct ORFs of *meloe* in an IRES-dependent manner and considering their relatively low levels of expression even after transfection of *meloe* into melanoma cells [10], we wondered whether other ORFs closer to the 5' end of the RNA may be more efficiently translated. We selected the ORF₁₃₂₋₂₉₆ since it codes for a putative 54 aa long peptide that would be long enough to contain potential class I and class II epitopes. Data obtained with melanoma cell lines transfected with the eGFP-MELOE-3 construct demonstrated that this ORF could be very efficiently translated, with amounts of translated chimeric protein that were much higher than that obtained after transfection with the IRES-dependent eGFP-MELOE-1 construct. Our *in vitro* translation experiments documented the cap dependency of MELOE-3 expression and transfection experiments with bicistronic constructs demonstrated the absence of IRES activity upstream of this ORF. We reasoned that this higher level of expression as compared to MELOE-1 should also occur in untransfected cells and may allow us to detect the native MELOE-3 protein in melanoma cell lines by monoclonal antibody staining. We had a MELOE-3 mAb made and indeed we detected a specific staining in melanoma cell-lines and in melanocytes but not in the colon carcinoma cell-line SW707. However with this MELOE-3 mAb, we were unable to visualize native MELOE-3 in cell lysates by immunoprecipitation and Western blot. Therefore, to formally document the presence of native MELOE-3 in melanocytes and melanoma cells, we used the very sensitive and specific LC-MS/MS technique [16, 17] that allowed unambiguous identification and quantification of MELOE-3 within a complex mixture of proteins in the lysates. Since melanocytes and melanoma cell-lines expressed variable but comparable levels of *meloe* RNA [5] it was not unexpected that levels of the cap-dependent MELOE-3 protein would also be comparable in the two types of cells. Nevertheless, this feature is in marked contrast with the IRES-dependent expression of MELOE-1 and MELOE-2 which was restricted to melanoma cell lines as assessed by specific T cell clone recognition [3, 19]. In the case of MELOE-1 and MELOE-2, we strongly suspect that their translation is restricted to melanoma cells because their IRES-transactivating factors (ITAF) are exclusively activated during the transformation process. In fact, a number of publications have reported activation of IRES-dependent translation of proteins that may contribute to tumorigenesis, metastasis or survival in various cancer cells [20–22, 23]. Moreover, it was previously reported that IRES translation could lead to the expression of a novel protein, MPD6, in cancer cells (prostate cancer,

chronic myelogenous leukemia) distinct from that coded by the main ORF (myotrophin) and generate a strong immune response [24]. We hypothesize that, likewise, the strong immunogenicity of MELOE-1 and 2 results from their IRES-dependent melanoma specific expression and thus their avoidance of immune tolerance.

To challenge this hypothesis, we explored whether MELOE-3, the new member of the MELOE family translated from the same *meloe* RNA but through a classical cap-dependent process would be immunogenic. In the six healthy individuals tested, both CD4 and CD8 responses against MELOE-3 were very significantly reduced as compared to responses against MELOE-1. Those results are in agreement with our previous unsuccessful attempts to generate MELOE-3 specific CD4 or CD8 T cell clones by repeated *in vitro* stimulations of PBMC from 3 healthy donors and two melanoma patients with DC loaded with MELOE-3 full length or with overlapping peptides (unpublished results).

Considering the relative high level of expression of MELOE-3 compared to that of MELOE-1, these low frequencies of CD4 and CD8 reactive T cells against MELOE-3 suggest an immune tolerance against this protein that could result from its expression in normal melanocytes. These data thus support the hypothesis of a correlation between IRES-dependency, melanoma-restricted expression and immunogenicity.

In conclusion, our data strongly suggest that, within the family of MELOE antigens, IRES-dependent antigens are the most immunogenic and represent the best targets for immunotherapy in melanoma. Considering the wealth of recently identified cap-independent translated sequences [25], we are prompted to explore whether this concept may be extended to other IRES-dependent tumor antigens.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and PBMC

Melanoma cell lines were established from fragments of metastatic tumors and registered in the Biocollection PC-U892-NL (CHU Nantes). Human Mesothelioma cell lines, Meso34 and Meso61 belonging to the Biocollection PCU892-MG were gifts from Dr. Grégoire (INSERM U892, Nantes, France). The colon carcinoma cell line SW707 was purchased from ATCC (Manassas, USA). Cell lines were grown in RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum (FCS) (Sigma, Lyon, France), 2 nM L-glutamine, 100 UI/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin (Gibco). Human melanocytes (01M03, 01M20, 01M10 and 00M33) were gifts from M. Regnier (L'Oréal Laboratory, Paris, France) or purchased from Life Technologies (St-Aubin, France) (LP-02). Melanocytes were cultured in supplemented medium 254

HMGS (Life Technologies). PBMC were isolated from healthy HLA-A*0201 donors (Etablissement Français du Sang, Nantes, France).

Construction of plasmids

We constructed chimeric cDNAs comprising the eGFP cDNA fused to the *meloe* ORF coding for MELOE-1 or MELOE-3 and replaced the original ORF with these constructions within the full length *meloe* cDNA as previously described [10] (Supplementary Figure S2). These modified *meloe*-eGFP cDNAs were cloned into the pCDNA3 expression vector (Invitrogen, Life Technologies) and transiently transfected into melanoma cells. For bicistronic constructs the 5'UTR region of MELOE-3 or the EMCV viral IRES used as positive control was cloned into the pRF vector between Renilla and Firefly luciferase ORFs as previously described [14]. Monocistronic plasmids harbouring either the 5'UTR region of MELOE-3 or the 5'UTR region of Melan-A upstream to the Firefly luciferase were constructed into the pGL4 vector (Promega, Charbonnières, France) to assess cap dependency of the translation.

Transient transfections

Melanoma cell lines grown at 50–70% confluency were transfected with 10 µg eGFP reporter plasmid/106 cells and LTX lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. eGFP fluorescence was analysed 48 h post-transfection using the Image Stream® Mark II Imaging flow cytometer (Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne) or an automated fluorescence High Content Screening (HCS) microscopic device (Array Scan VTI, thermo Scientific, Courtaboeuf, France). Acquisition of Hoechst stained nuclei and eGFP expressing cells was made using a 386/420 nm and 485/515 nm excitation/emission filters with a 10X objective. Forty-nine fields per well were analysed with Cellomics® View Software (Thermo Fisher Scientific). For luciferase reporter assays, cells were lysed 48 h post-transfection and luminescence was measured on a VICTOR X3 apparatus (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Luminescence is expressed in arbitrary units.

In vitro transcription and translation

Monocistronic constructs under a T7 promoter were linearized with XhoI and transcribed using mMessage mMachin[®] T7 kit (Ambion[®] Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) for capped RNAs and the T7 RiboMAX[™] Express kit (Promega, Fitchburg, USA) for uncapped RNAs. Poly-A tailing was performed afterwards using the poly-A tailing kit (Ambion[®]). *In vitro* translation was performed according to the guidelines of the manufacturer using Rabbit Reticulocyte

Lysate (RRL) (Promega, Madison, USA) on 100 ng of capped or uncapped RNA. Luminescence was measured with a VICTOR X3 and expressed in arbitrary units.

Western blots

Cells were lysed 48 h post-transfection with HEPES pH 7.3 30 mM, KCl 160 mM, MgCl₂ 2.5 mM, DTT 1 mM, NP-40 0.1%, Triton X100 0.5%, glycerol 10% with protease inhibitors (Roche, Boulogne-Billancourt, France). Protein content was quantified by a BC Assay (Interchim, Montluçon, France). Whole protein samples were run on a 12% SDS-PAGE gel and blotted onto Immobilon[®]-P PVDF membranes (Millipore, Molsheim, France). Membranes were stained overnight with an eGFP Ab (1 µg/mL) (Clontech, Mountain View, USA). After hybridization with a HRP-conjugated secondary antibody ECL detection (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) was performed. Staining was analysed with ChemiDoc[™] MP Imaging system (BioRad). Actin was used as a loading control (MAB1501, Millipore). Images were adjusted for contrast and brightness using the Image J software.

Flow cytometry

Cell lines were stained with a custom made MELOE-3 mAb (75 µg/mL ; Proteogenix, Schiltigheim, France) and a PE coupled Anti-Mouse IgG (Fcγ3) (500 ng/mL ; Beckman Coulter, Pasadena, USA) as secondary antibody. A mouse IgG1 isotype (75 µg/mL ; Abcam, Cambridge, UK) was used as negative control.

Stimulation of PBMC with MELOE-1 and MELOE-3 peptides

At day 0, PBMCs were plated in 96 well-plates at 2×10^5 cells/wells in RPMI 1640 medium containing 8% human serum, 50 UI/mL IL-2 (Proleukin, Novartis,) and stimulated with 10 µM of overlapping MELOE-1 or MELOE-3 peptides (Supplementary Figure S2) purchased from Proteogenix. DC differentiation and maturation was performed by addition of 1000 U/mL of GM-CSF (CellGenix, Freiburg, Germany) and 500 UI/mL of IL-4 (CellGenix). After 24 hours, TNFα (1000 UI/mL), IL-1β (10 ng/mL) and prostaglandin E₂ (1 µM) (R&D Systems, Minneapolis, USA) were added according to the « accelerated monocyte derived dendritic cells » (acDCs) protocol [15]. After 25 days, PBMCs were re-stimulated with acDCs loaded with overlapping MELOE-1 or MELOE-3 peptides for 5 h in presence of 10 µg/mL Brefeldin A (Sigma). The percentage of microcultures containing specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells was evaluated by surface staining with anti-CD8 mAb (clone RPA-T8, BioLegend, San Diego, USA) or anti-CD4 mAb (clone RPA-T4, BioLegend) and intracellular staining with an anti-INFγ mAb (clone 45–15, Miltenyi Biotec, Paris,

France) after 4% paraformaldehyde fixation and 0.1% saponin permeabilisation.

LC-MS/MS analysis of cell lysates

MELOE-3 was sought in cell lysates by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), a very sensitive method that we previously used to identify specific peptides within complex protein mixtures [16, 17].

All reagents were obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and synthetic VFDTEIAQVTSDTAVGAR and VFDTEIAQVTSDTAVGA-[¹³C₆, ¹⁵N₄]R peptides were purchased from Thermo Scientific Biopolymers (Einsteinstrasse, Germany). Cell lysates were mixed with 50 mM ammonium bicarbonate buffer (pH 8) containing 100 nM of VFDTEIAQVTSDTAVGA-[¹³C₆, ¹⁵N₄]R as internal standard, 10% aqueous sodium deoxycholate and 500 mM of aqueous dithiothreitol. The samples were reduced for 30 min at 60°C, then alkylated with fresh iodoacetamide solution (1 M in 1 M sodium hydroxide solution) for 60 min at room temperature, and protected from light. The samples were digested overnight with a 0.1 mg/mL trypsin solution in 1 mM hydrochloric acid. Formic acid (20%) was added to stop the reaction. Finally, samples were centrifuged at 15,000 × g and 4°C for 15 min, and the supernatants were transferred to vials for LC/MS/MS analyses.

Analyses were performed on a Xevo® Triple-Quadrupole mass spectrometer with an electrospray (ESI) interface equipped with an Acquity H-Class® UPLCTM device (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Labeled and unlabeled peptides were separated on an Acquity® BEH C₁₈ column (2.1 × 100 mm, 1.7 μm, Waters) at 60°C with a linear gradient of mobile phase B (acetonitrile containing 0.1% formic acid) in mobile phase A (5% acetonitrile in water containing 0.1% formic acid) and at a flow rate of 600 μL/min. Mobile phase B was linearly increased from 1% to 50% for 5 min, kept constant for 1 min, returned to the initial condition over 1 min, and kept constant for 1 min before the next injection. Ten microliters of each sample were injected into the LC column. Labeled and unlabeled peptides were then detected by the mass spectrometer with the ESI interface operating in the positive ion mode (capillary voltage, 3 kV; desolvation gas (N₂) flow and temperature, 1000 L/h and 400°C; source temperature, 120°C). The multiple reaction monitoring (MRM) mode was applied for MS/MS detection (VFDTEIAQVTSDTAVGAR: m/z 940.5 → 1175.5 + 877.7 ; VFDTEIAQVTSDTAVGA-[¹³C₆,¹⁵N₄]R: m/z 945.5 → 1185.5 + 887.7) with cone and collision set at 55 and 40 V, respectively. Chromatographic peak area ratios between unlabeled and labeled peptides constituted the detector responses. Standard solutions were used to plot calibration curves

and a linear regression model (1/× weighting) was used for quantification.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SD. Statistical analyses were performed to compare the percentage of MELOE-1 and MELOE-3 specific INFγ positive micro-cultures after sensitization with the corresponding peptides. Normal distribution was evaluated by a Kolmogorov-Smirnov normality test and a paired *t* test was used to compare the percentage of CD4+ or CD8+ INFγ positive microcultures in each donor. Statistical analyses were performed using PRISM software.

Abbreviations

aa: amino acid, bp: base pair, TIL: Tumor infiltrating lymphocytes, ORF: open reading frame, PBMC: peripheral blood mononuclear cells, IRES: internal ribosome entry site, DC: dendritic cell, ITAF: IRES trans-acting factor, LC-MS/MS: liquid chromatography, tandem mass spectrometry, lncRNA: long non coding RNA, MRM: multiple reaction monitoring.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the MicroPICell imaging facility, the Cytometry Facility “CytoCell” and the Mass Spectrometry facility of the SFR Santé for expert technical assistance.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

GRANT SUPPORT

This work was supported by fundings from the Ligue contre le Cancer and Association de Recherche contre le Cancer and performed in the context of the LabEX IGO program supported by the National Research Agency (ANR-11-LABX-0016-01).

M. Charpentier is supported by a grant from the French ministry of Research.

REFERENCES

1. Hoos A. Development of immuno-oncology drugs - from CTLA4 to PD1 to the next generations. *Nat rev drug discov.* 2016; 15:235–247.
2. Labarriere N, Khammari A, Lang F, Dreno B. Is antigen specificity the key to efficient adoptive T-cell therapy? *Immunotherapy.* 2011; 3:495–505.
3. Godet Y, Moreau-Aubry A, Guilloux Y, Vignard V, Khammari A, Dreno B, Jotereau F, Labarriere N. MELOE-1

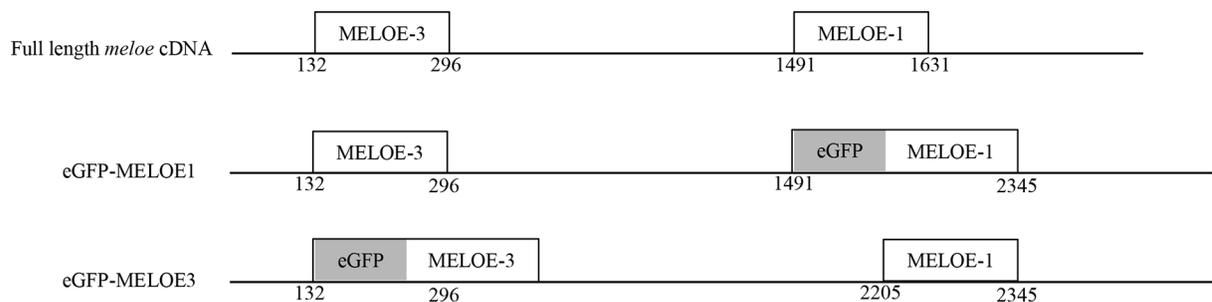
- is a new antigen overexpressed in melanomas and involved in adoptive T cell transfer efficiency. *J Exp Med.* 2008; 205: 2673–2682.
4. Kung JT, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics.* 2013; 193:651–669.
 5. Bobinet M, Vignard V, Florenceau L, Lang F, Labarriere N, Moreau-Aubry A. Overexpression of meloe gene in melanomas is controlled both by specific transcription factors and hypomethylation. *PloS one.* 2013; 8:e75421.
 6. Chalopin B, Florenceau L, Fradin D, Labarriere N, Moreau-Aubry A. A lineage-specific methylation pattern controls the transcription of the polycistronic mRNA coding MELOE melanoma antigens. *Melanoma res.* 2015; 25:279–283.
 7. Ingolia NT, Lareau LF, Weissman JS. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell.* 2011; 147:789–802.
 8. Ruiz-Orera J, Messeguer X, Subirana JA, Alba MM. Long non-coding RNAs as a source of new peptides. *eLife.* 2014; 3:e03523.
 9. Smith JE, Alvarez-Dominguez JR, Kline N, Huynh NJ, Geisler S, Hu W, Collier J, Baker KE. Translation of small open reading frames within unannotated RNA transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell rep.* 2014; 7:1858–1866.
 10. Carbonnelle D, Vignard V, Sehedic D, Moreau-Aubry A, Florenceau L, Charpentier M, Mikulits W, Labarriere N, Lang F. The Melanoma Antigens MELOE-1 and MELOE-2 Are Translated from a Bona Fide Polycistronic mRNA Containing Functional IRES Sequences. *Plos One.* 2013; 8.
 11. Godet Y, Desfrancois J, Vignard V, Schadendorf D, Khammari A, Dreno B, Jotereau F, Labarriere N. Frequent occurrence of high affinity T cells against MELOE-1 makes this antigen an attractive target for melanoma immunotherapy. *Eur j immunol.* 2010; 40:1786–1794.
 12. Bobinet M, Vignard V, Rogel A, Khammari A, Dreno B, Lang F, Labarriere N. MELOE-1 antigen contains multiple HLA class II T cell epitopes recognized by Th1 CD4+ T cells from melanoma patients. *PloS one.* 2012; 7: e51716.
 13. Rogel A, Vignard V, Bobinet M, Labarriere N, Lang F. A long peptide from MELOE-1 contains multiple HLA class II T cell epitopes in addition to the HLA-A*0201 epitope: an attractive candidate for melanoma vaccination. *Cancer immunol immunother.* 2011; 60:327–337.
 14. Petz M, Kozina D, Huber H, Siwiec T, Seipelt J, Sommergruber W, Mikulits W. The leader region of Laminin B1 mRNA confers cap-independent translation. *Nucleic acids res.* 2007; 35:2473–2482.
 15. Martinuzzi E, Afonso G, Gagnerault MC, Naselli G, Mittag D, Combadiere B, Boitard C, Chaput N, Zitvogel L, Harrison LC, Mallone R. acDCs enhance human antigen-specific T-cell responses. *Blood.* 2011; 118:2128–2137.
 16. Croyal M, Fall F, Ferchaud-Roucher V, Chetiveaux M, Zair Y, Ouguerram K, Krempf M, Nobecourt E. Multiplexed peptide analysis for kinetic measurements of major human apolipoproteins by LC/MS/MS. *J lipid res.* 2016; 57:509–515.
 17. Croyal M, Ouguerram K, Passard M, Ferchaud-Roucher V, Chetiveaux M, Billon-Crossouard S, de Gouville AC, Lambert G, Krempf M, Nobecourt E. Effects of Extended-Release Nicotinic Acid on Apolipoprotein (a) Kinetics in Hypertriglyceridemic Patients. *Arterioscler thromb vasc biol.* 2015; 35:2042–2047.
 18. Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer discov.* 2011; 1:391–407.
 19. Godet Y, Moreau-Aubry A, Mompelat D, Vignard V, Khammari A, Dreno B, Lang F, Jotereau F, Labarriere N. An additional ORF on meloe cDNA encodes a new melanoma antigen, MELOE-2, recognized by melanoma-specific T cells in the HLA-A2 context. *Cancer immunol immunother.* 2010; 59:431–439.
 20. Bisio A, Latorre E, Andreotti V, Bressac-de Paillerets B, Harland M, Scarra GB, Ghiorzo P, Spitale RC, Provenzani A, Inga A. The 5'-untranslated region of p16INK4a melanoma tumor suppressor acts as a cellular IRES, controlling mRNA translation under hypoxia through YBX1 binding. *Oncotarget.* 2015; 6:39980–39994. doi: 10.18632/oncotarget.5387.
 21. Dobson T, Chen J, Krushel LA. Dysregulating IRES-dependent translation contributes to overexpression of oncogenic Aurora A Kinase. *Mol cancer res.* 2013; 11:887–900.
 22. Faye MD, Holcik M. The role of IRES trans-acting factors in carcinogenesis. *Biochim biophys acta.* 2015; 1849:887–897.
 23. Petz M, Them N, Huber H, Beug H, Mikulits W. La enhances IRES-mediated translation of laminin B1 during malignant epithelial to mesenchymal transition. *Nucleic acids res.* 2012; 40:290–302.
 24. Xiong Z, Liu E, Yan Y, Silver RT, Yang F, Chen IH, Chen Y, Verstovsek S, Wang H, Prchal J, Yang XF. An unconventional antigen translated by a novel internal ribosome entry site elicits antitumor humoral immune reactions. *J immunol.* 2006; 177:4907–4916.
 25. Weingarten-Gabbay S, Elias-Kirma S, Nir R, Gritsenko AA, Stern-Ginossar N, Yakhini Z, Weinberger A, Segal E. Comparative genetics. Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science.* 2016; 351.

IRES-dependent translation of the long non coding RNA *meloe* in melanoma cells produces the most immunogenic MELOE antigens

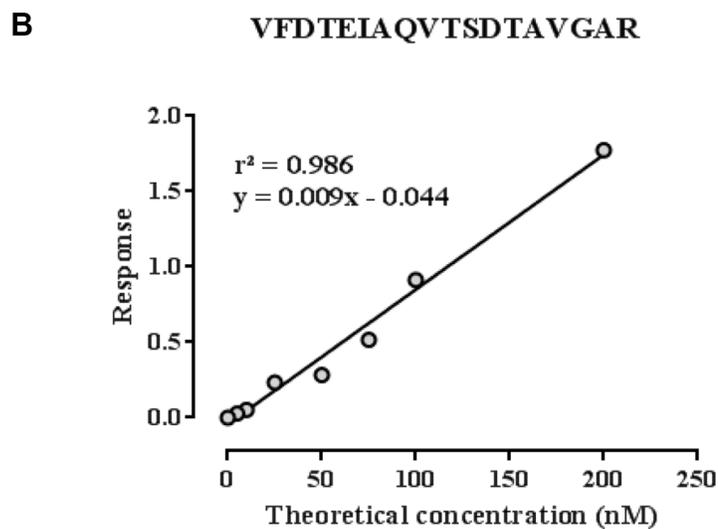
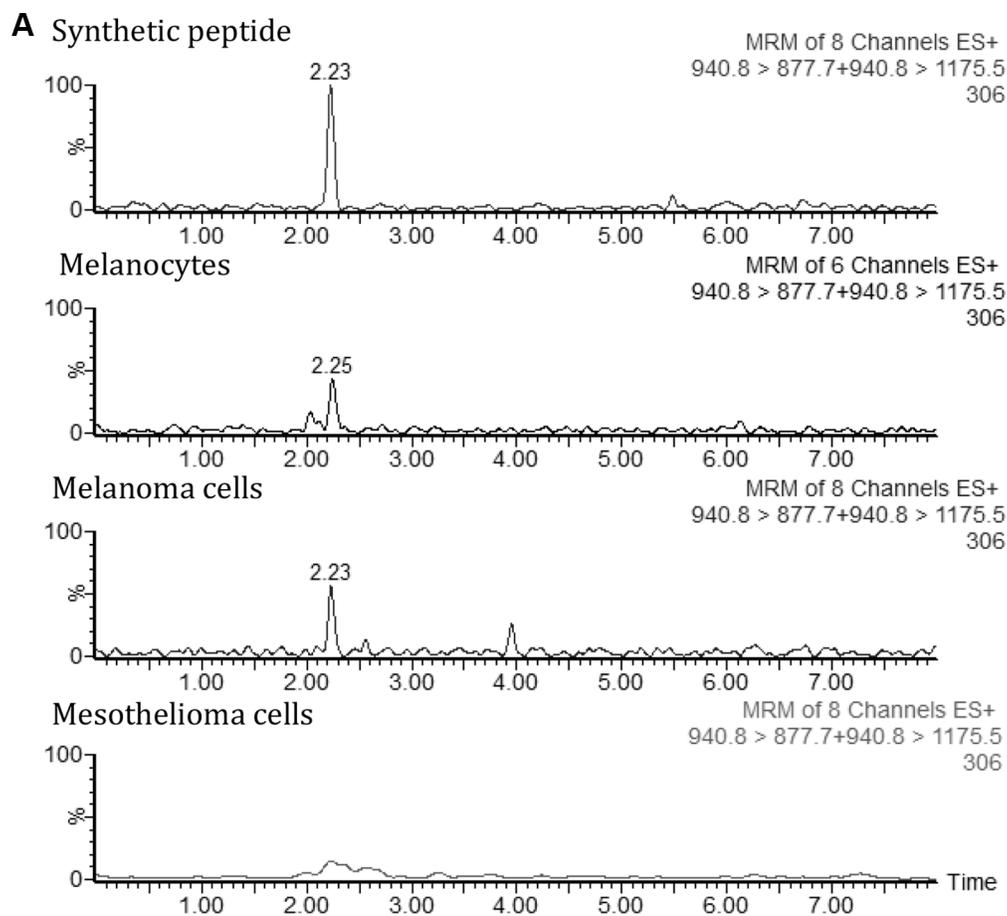
Supplementary Materials

Atattcatgagaatacagacttttttgttttgatgctgcattctttaaggagagaaggttttattgttttcttcagggt
gctttgggtcaaaagcactagcagcttctgttgggaactcgtggcattttgaATGGTTTTTGATACAGAAATAGCACAA
GTCACGTCTGACACAGCCGTAGGCGCACGAATGCGTGAATGCGATTGTGGTTCTCATCTCTGCAGCTGGTGTGTGGGGC
CGGGCCTGGGACAGCTTGGGCCATCCCCACCACCCGGCTCCAGGATCCTCATTAGgaagccctcaggagccctgg
ggtgggtctccttgcctgtgaacgctccatttgtgttattgaatccaacataaatgcagcattgtcttcagaggtgag
caatggccgtggccggaggtgcatgggatgcaggcggcgtgtgctgtgtgattttctctgctctgctcttagctt
acttttagcagatagtgagtttcacgtggcagtcggttaaaccaaggcagtggaacatccctcccacaATGAGTGA
AAATGCAGGAGGTGCCGTAGCGAGAACAGCGACAGATTCTGCGCATTGGTGAGCCCGACTCCCCAGCCTCGGTGCCCA
CCGAAGCCCCCTCTGGCTGCACTGTGCCAGTGAgtccaggctccttctcagcagaaggtggctgctctgcagggccct
cgctccctgctcctcaggggaccgcactcttccatgtccgtaggagacgcgcaccgagctggagacacagatctgc
gaggagtaacttgctcctcaccagcactgccagggcggatcagcgccagcaccttcagcatgagcgtaaactgctg
gagaagctggagtggtggaaggagccctgctgcctgcccctcctcctcctcagttgctggccttggcagctctaggt
gaccagcagggcctggagagtaggaagcagcttcccagctgcagctctgcatcatcctctctgtgctgtcacagaat
ggaaggttttagcagaaaaaggagtttgtaagcgacattcagaagatttgggcagcagtttcttccccatagggctct
gtcttttggagtggggagtgctggccagctgctcgtgctgtttcacagtggtggaatttaagagcagacttg
gtcagctgtgaccgttcaggtgatgcacgcacaggaggttcagctgtgtgctgtgaggcgggacaggagtgaccca
agcttcagaagagaattccccgcagcagcgtggcgtcagcatgttccgtgtctgactgttttgattgtctctcagtc
cagttgacaaattccttttaagatgaaatttgaattaatttgcagaacttgtacaaatcccaagaaaacagcttaagg
aacagattaaagaatgaatgccttaggaattaaagcattaatagctcttgagttagctggatggaagATGAGTTGTGT
AGGTTATCCAGATGAGGCTACATCCAGGGAGCAATTCTTACCTTCAGAGGGCGCTGCCTGTCTCTCTTGGCATCCAAGT
GAGCGCATCTCTCCACGCTCAATGATGAATGCTGGCCGGCATCCCTGTGAgaaccttgatgatctttccattttctg
aaaactcccaggtgggtggcccttggccacatcagcattgaccacccgggctcagatctggccaggtgcctgctg
tgtgatgggaatttcagtacactgaattttgctctgaccctgatgaaatagcttcgggtggcatttgcacaaatcat
gttagtgtcatctctatttagatgctttggagcaaacatgaacttgggtttccttttaagatgtcctgtgattccAGatt
caggggaatctgagaaaagttgaagaaagaaaattccactcggccagccaaccttgggtgtgcagagcctgccccgct
tccccactttgtcctgagaagctgggtcctcccagcaccagagttgctgctgcttcccctTgcgcCcttggctgctc
tccccggcccaagcctgagtgacactctaggattgcagatggcaggtggctctctgggtcccccgctccccatgacct
ccactgcaccagacctctgggtccttgcctcagcagccccctgccctcggtgagacgcagcccactgtgggcccctcc
cctgggctgccatcagctcctgtgctcctcggcgccccagcggctgccctgggcccgttcccacagcaactggcacac
agcaggagcctaatgttctttgggaactgaatgaggagtggaatgcgggcatgtcatgtttttgaagttaataaaa
aaaatcccttaaagttgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Supplementary Figure S1: *meloe* cDNA full length sequence. MELOE-1 (ORF 132–296) (blue), MELOE-2 (ORF 546–665) (green) and MELOE-3 (ORF 1491–1631) (red) are indicated.



Supplementary Figure S2: Design of *meloe* eGFP-constructs.



Supplementary Figure S3: LC-MS/MS detection of MELOE-3. (A) Representative chromatograms obtained by LC-MS/MS for the synthetic peptide (50 nM) or different cell lines. (B) Calibration curve obtained with the synthetic VFDTEIAQVTSDTAVGAR peptide by LC-MS/MS.

MELOE-1 MSCVGYPDEATSREQFLPSEGAACPPWHPSERISSTLNDECWPASL
SCVGYPDEATSREQFLPSEG
TSREQFLPSEGAACPPWH
PSEGAACPPWHPSERISSTL
PWHPSERISSTLNDECWPASL

MELOE-3 MVFDTEIAQVTSDTAVGARMRECDCGSHLCSWCVGPGLGQLGPHPHPPGSQDPH
VFDTEIAQVTSDTAV
SDTAVGARMRECDCG
RECDCGSHLCSWCVG
CSWCVGPGLGQLGPH

Supplementary Figure S4: Overlapping peptides from MELOE-1 and MELOE-3. The four peptides of 20aa (MELOE-1) and 15aa (MELOE-3) used to stimulate PBMCs from healthy donors are shown, with potential HLA-A0201 epitopes identified by HLA binding predictions in red.

Etude n°2 : Modes activation de l'IRES de MELOE-1 dans les cellules de mélanome – résultats préliminaires.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de la première étude montrent que dans le cas du lncRNA *meloe*, les antigènes traduits grâce à l'activation d'IRES sont les plus immunogènes et les plus pertinents en tant que cibles immunothérapeutiques.

Des expériences d'une précédente étude ont montré que dans la région intercistronique MELOE-2 – MELOE-1 totale (IR₆₆₆₋₁₄₉₀) de 824 paires de bases n'était pas nécessaire dans son ensemble à l'activité IRES. Des restrictions successives de cette région ont montré que l'activité IRES était contenue dans la région IR₁₂₆₈₋₁₄₉₀ (figure 22 A & B) (Carbonnelle et al., 2013).

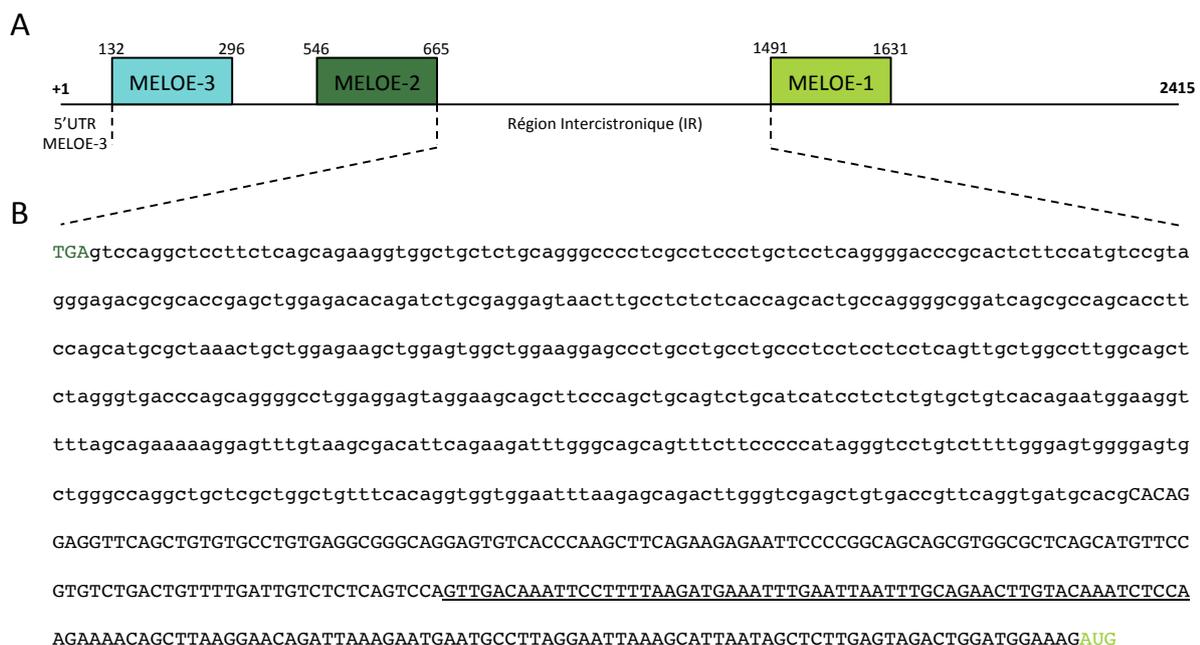


Figure 22 : Structure de la région intercistronique MELOE-2 – MELOE-1. A/ Structure générale de l'ARN *meloe* ; les ORFs traduits sont indiqués par les rectangles colorés. B/ Séquence de la région intercistronique MELOE-2 – MELOE-1 (IR₆₆₆₋₁₄₉₀). Le codon stop de MELOE-2 (vert foncé) et le codon d'initiation de MELOE-1 (vert clair) sont indiqués. La région e, majuscules correspond à la région IR₁₂₁₆₋₁₄₉₁ comportant l'activité IRES et la région soulignée à la séquence IR₁₃₄₆₋₁₄₈₈ dont la structure secondaire a été prédite par le programme VIPS (voir figure 23).

Nous avons développé deux stratégies pour comprendre le mécanisme d'activation de cette IRES: d'une part, une stratégie d'identification des facteurs ITAFs, et d'autre part, la recherche des stimuli extracellulaires qui activent l'IRES et induisent l'expression de MELOE-1 dans les cellules de mélanome.

I. La structure de la séquence IRES MELOE-1

Les structures secondaire et tertiaire de la séquence IRES MELOE-1 ne sont pas élucidées, cependant des modèles de prédiction nous permettent d'envisager les repliements les plus susceptibles de permettre sa conformation. Pour cela nous avons utilisé les programmes m-fold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>) et VIPS : « Viral IRES prédiction system (<http://140.135.61.250/vips/>) (Hong, Wu, Chang, & Chen, 2013)) disponibles en ligne. Le programme VIPS se base sur des motifs décrits dans des IRES virales et les compare avec les séquences à tester afin de déduire une structure à la séquence possédant une activité IRES. Sur la région inter-cistronique entière ou bien la région minimale décrite (IR₁₂₆₈₋₁₄₉₀) nous avons obtenu avec ce programme la structure secondaire présentée ci-dessous (figure 23B) qui correspond à la région IR₁₃₄₆₋₁₄₈₈ de 142pb. Concernant les similitudes avec des séquences IRES virales décrites, l'IRES MELOE-1 possède par cette prédiction des motifs communs avec des IRES de virus CrPV.

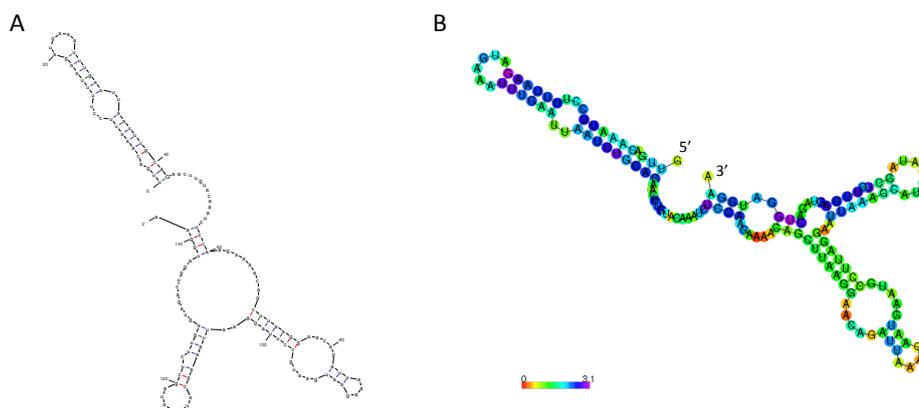


Figure 23 : Structure de la région IRES MELOE-1 (IR₁₃₄₆₋₁₄₈₈) prédite par les programmes m-fold (A) et VIPS (B).

Le programme m-fold prédit quant à lui l'ensemble des structures dans lesquelles la séquence primaire peut se replier. Le chargement dans ce programme de la région intercistronique permet la prédiction de nombreuses structures secondaires. Nous avons également chargé dans ce programme la région de 124pb dont la structure potentielle présente des similitudes avec les IRES CrPV et obtenu parmi différentes structures un modèle de repliement semblable entre les deux modes de prédiction (figure 23 A et B).

II. Identification des facteurs ITAFs associés à l'IRES MELOE-1

A. Caractérisation de protéines liées à l'IRES MELOE-1

Dans le but de déterminer les partenaires protéiques ayant un rôle putatif dans l'activation de l'IRES nous avons mis au point un protocole de caractérisation particulier qui utilise la technologie de résonance plasmonique de surface (BiAcore) au lieu des techniques de pull-down classique avec lesquelles nous n'avons pas obtenu de résultats. Dans ces techniques, l'incubation de l'ARN et des lysats protéiques à 4°C pendant leur étape de fixation peut être problématique car pour que les repliements de l'ARN se mettent en place il est nécessaire que la température soit plus élevée.

Dans notre protocole, de l'ARN synthétique correspondant à la séquence IRES MELOE-1 est biotinylé puis immobilisé sur une puce BiAcore - streptavidine et des lysats cytoplasmiques de cellules de mélanome sont passés en flux lent et continu à 37°C afin de permettre les interactions ARN-protéines. A la fin de chaque cycle, les protéines retenues sur l'ARN sont éluées, cette opération est renouvelée sur 50 cycles. Cette partie du protocole est réalisée en collaboration avec la plateforme Impact de la SFR Santé François Bonamy à Nantes. Les éluats protéiques récupérés sont ensuite analysés par spectrométrie de masse. Cette technique permet après digestion à la trypsine des protéines d'identifier des fragments spécifiques et de comparer les séquences de ces fragments à des bases de données de protéines connues. Cette seconde partie du protocole est réalisée en collaboration avec les Dr. Com et Pineau sur la plateforme de protéomique de Rennes (plateforme Protim). Elle permet à la fois d'obtenir des informations qualitatives sur la composition protéique des échantillons mais également des informations quantitatives grâce au dénombrement du nombre de fragments identifiés pour chaque protéine.

Afin de discriminer les protéines d'intérêt des protéines se liant de façon non spécifique à l'ARN nous avons réalisé l'expérience sur deux séquences ARN différentes (cf. figure 22):

- la région IR₁₂₁₆₋₁₄₉₁ qui comprend la région dans laquelle l'activité IRES est détectée
- la région IR₆₆₆₋₁₂₁₅ sans activité IRES

Ces expériences ont été réalisées avec des lysats cytoplasmiques de deux lignées de mélanome établies au laboratoire (M117 et M134) et nous ont permis d'identifier un grand nombre de protéines de rôles divers.

| Protéines retenues par la séquence IRES MELOE-1 | |
|--|--|
| Sous-unités ribosomales | 40S |
| | 60S |
| Facteurs d'initiation | eIF2S3 : facteur d'initiation eucaryote 2 sous-unité 3 (γ) |
| | eIF4A2 : facteur d'initiation eucaryote 4A-II |
| | eIF4A1 : facteur d'initiation eucaryote 4A-I |
| | eIF4B : facteur d'initiation eucaryote 4B |
| Facteurs d'élongation | eEF1A1 : facteur d'élongation eucaryote 1A1 |
| | eEF2 : facteur d'élongation eucaryote 2 |
| | eEF1D : facteur d'élongation eucaryote 1D |
| Facteurs d'épissage | SRSF1 : facteur d'épissage Serine/arginine-riche 1 |
| | SRSF2 : facteur d'épissage Serine/arginine-riche 2 |
| ITAFs putatifs | La : lupus autoantigen |
| | hnRNP-A1 |
| | hnRNP-D |
| | hnRNP-F |
| | hnRNP-H1 |
| | hnRNP-K |
| | hnRNP-M |
| | hnRNP-U |
| | PCBP1 : poly(rC) binding protein 1 ou hnRNPE1 |
| | PCBP2 : poly(rC) binding protein 2 |

heterogenous nuclear
Ribo Nucléo Proteins

Tableau 5: Protéines issues de lysats cytoplasmiques de mélanome retenues par la séquence IRES MELOE-1 IR₁₂₁₆₋₁₄₉₁ identifiées par spectrométrie de masse.

Les protéines identifiées dans le tableau 5 sont celles dont la fonction est liée à l'expression des gènes et dont les fragments identifiés sont plus fréquents dans la condition IR₁₂₁₆₋₁₄₉₁. On retrouve majoritairement les sous unités ribosomales 40S et 60S dans ces mélanges complexes pour les deux lignées de mélanome testées. On retrouve également

des facteurs d'initiation de la traduction en faible nombre, les protéines SRSF1 et SRSF2 impliquées dans l'épissage ainsi que les facteurs d'élongation (tableau 5).

Dans l'analyse de ces données nous nous sommes concentrés sur les protéines classées dans la catégorie ITAFs putatifs (tableau 5) pour lesquelles une activité dans la traduction IRES dépendante a été décrite dans le contexte d'une autre IRES. En effet, bien que les associations IRES-ITAFs soient propres à chaque séquence IRES les facteurs sont souvent partagés ou issus des mêmes familles de protéines.

En particulier nous avons identifié un grand nombre de protéines de la famille hnRNP auxquelles on associe fréquemment une activité IRES comme développé dans la Partie 2 II-B (Han et al., 2010; Jean-Philippe, Paz, & Caputi, 2013).

Parmi ces protéines, hnRNP-A1 représentait un candidat d'intérêt de par sa présence en quantités plus importantes dans les échantillons issus de la rétention sur la séquence IRES fonctionnelle et reproduite dans différents lysats cellulaires.

B. Le rôle de hnRNP-A1 dans l'activation de l'IRES MELOE-1

1. La protéine hnRNP-A1

hnRNP-A1, protéine de liaison à l'ARN ubiquitaire fait partie, avec les autres hnRNPs des classes A/B et C, des protéines les plus exprimées dans les cellules, avec des niveaux comparables à ceux des histones (Dreyfuss et al., 1993). Le rôle de hnRNP-A1 est primordial dans le processing des ARNs messagers et en particulier dans l'épissage (Jean-Philippe et al., 2013). L'association aux ARNm se fait grâce à la présence de deux domaines RRM (« RNA recognition motif ») et une séquence de type RGG box constituée de répétitions du trinuécléotide Arginine-Glycine-Glycine. De plus, la séquence de hnRNP-A1 comprend un domaine de translocation nucléo-cytoplasmique ou domaine M9 qui diffère des signaux de localisation nucléaires habituels (He & Smith, 2009). Comme la majorité des hnRNPs, hnRNP-A1 est donc capable de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme sous l'effet de signaux spécifiques tels que les conditions de stress cellulaire (Allemand et al., 2005; Piñol-Roma & Dreyfuss, 1992). La liaison spécifique de hnRNP-A1 avec des ARNs cibles se fait grâce à la présence récurrente de motifs de types UAGGGA(U) en particulier les structures de type boucle riches en A/U et comportant des motifs AGU (Han et al., 2010; Morgan et al., 2015).

Le rôle d'ITAF de hnRNP-A1 est décrit dans le contexte de nombreuses IRES cellulaires. Ce facteur peut être activateur de la traduction comme c'est le cas pour FGF2, c-myc et sST2 ou inhibiteur pour XIAP, Bcl-xL et Apaf 1 (Bonnal et al., 2005; Cammas et al., 2007; Kunze, Benz, Brau??, et al., 2016; Roy et al., 2014; Shi et al., 2016b). La protéine hnRNP-A1 subit de nombreuses modifications post-traductionnelles qui incluent des méthylations, des phosphorylations et des SUMOylations. Ces modifications sont des régulateurs importants de son activité IRES.

La phosphorylation de résidus sérine permet de moduler la liaison de hnRNP-A1 aux acides nucléiques ainsi que sa localisation cellulaire (Buxadé et al., 2005; Idriss et al., 1994). La phosphorylation de hnRNP-A1 à la suite de différents types de stress cellulaires tels qu'un choc osmotique, l'exposition aux UVC ou l'activation de l'UPR entraîne une accumulation cytoplasmique de hnRNP-A1, cependant dans ce cas l'affinité de la protéine pour les ARNs cibles est réduite (Allemand et al., 2005; Cammas et al., 2007; Guil, Long, & Cáceres, 2006; Shi et al., 2016c; Ungureanu et al., 2006; van der Houven van Oordt et al., 2000). La méthylation des arginines de la RGG box module également la capacité de hnRNP-A1 à s'associer avec des ARNs en général dans le sens d'une diminution de l'affinité des deux partenaires (Gao, Dhar, & Bedford, 2017; Jean-Philippe et al., 2013; Wall & Lewis, 2016).

L'identification de hnRNP-A1 dans nos échantillons associée à une activité ITAF largement décrite nous ont poussé à investiguer son rôle dans la traduction de MELOE-1.

2. Mise en évidence de l'interaction entre MELOE-1 et hnRNP-A1

Nous avons dans un premier temps confirmé l'interaction entre hnRNP-A1 et MELOE-1. Pour cela nous avons réalisé une immuno-précipitation de protéines cytoplasmiques de lignées de mélanome en utilisant un anticorps anti-hnRNP-A1. La stabilité de la liaison entre la séquence IRES et hnRNP-A1 n'étant pas connue nous nous sommes assurés de sa résistance au protocole de lyse en réalisant un cross-linking des interactions ARN-protéines par irradiation des cellules aux UV (254nm) à une dose de 150mJ/cm². Après immuno-précipitation les ARNs associés aux anticorps hnRNP-A1 ont été purifiés, rétro-transcrits et la présence de l'ARN *meloe* a été détectée en réalisant une PCR nichée (figure 24A). Un protocole similaire a été réalisé en contrôle négatif en absence d'anticorps anti-hnRNP-A1.

Grâce à ce protocole nous avons pu mettre en évidence la présence de l'ARN *meloe* parmi les ARNs associés à hnRNP-A1 de façon spécifique (figure 24B).

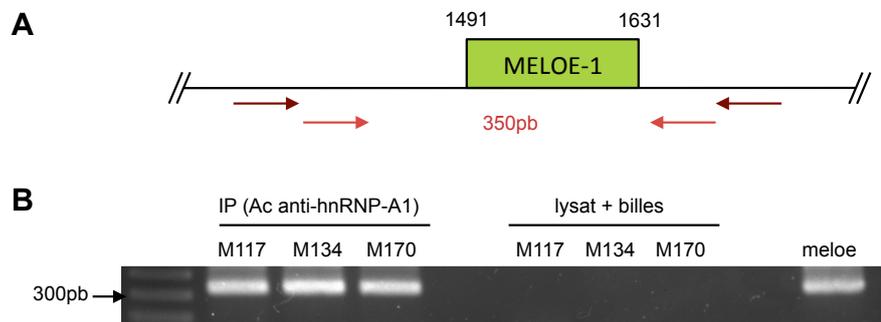


Figure 24 : Détection de l'ARN *meloe* après immunoprécipitation de protéines de mélanome par un anticorps anti-hnRNP-A1 par PCR nichée après rétro-transcription. (A) les amorces de PCR encadrent l'ORF de MELOE-1. (B) l'ARN *meloe* est détecté spécifiquement dans les échantillons d'immunoprécipitation des trois lignées de mélanome testées (M117, M134, M170). En absence d'anticorps anti-hnRNP-A1 aucun signal n'est détecté. L'ARN *meloe* est utilisé comme contrôle de taille de l'amplicon.

3. Validation du rôle ITAF de hnRNP-A1

Cette première observation valide l'existence de l'interaction entre hnRNP-A1 et *meloe* dans le cytoplasme des cellules de mélanome ; cependant elle ne présume pas de son rôle dans l'activation ou l'inhibition de la séquence IRES. La validation de l'activité ITAF de hnRNP-A1 fait l'objet d'investigations actuelles qui sont séparées en deux axes principaux.

a) Mise en évidence du site d'interaction hnRNP-A1 – IRES MELOE-1

Sur les modèles de repliement prédits de la séquence IRES MELOE-1 nous avons identifié une boucle proche de l'AUG, riche en résidus A et U et qui comporte des séquences AG représentant à un site de liaison éventuel avec un domaine de hnRNP-A1 (Morgan et al., 2015). Pour valider son implication nous avons muté cette séquence en un motif CCCCCC. En effet, la substitution des nucléotides de cette boucle par des cytosine a été décrite comme un élément déstabilisant l'interaction avec hnRNP-A1. Sur la séquence IR₁₂₁₆₋₁₄₉₁ portant cette mutation nous avons de nouveau réalisé des prédictions de structure secondaire, et alors que la structure initiale était retrouvée avec la prédiction m-fold, plus aucune ressemblance avec une séquence IRES n'était identifiée par le système VIPS. Cette construction sera prochainement utilisée dans un protocole de détermination de constante d'association par résonance de surface (BiAcore) en utilisant une protéine hnRNP-A1 recombinante.

b) Mise en évidence de l'implication de hnRNP-A1 dans l'activation de l'iRES

Parallèlement nous réalisons des expériences de validation de l'activité ITAF de hnRNP-A1 d'une part en sur-exprimant cette protéine par co-transfection dans des cellules de mélanome d'un plasmide codant pour hnRNP-A1 et d'une construction bicistronique contenant l'IRES MELOE-1. Et d'autre part, l'inhibition de l'expression de hnRNP-A1 sera induite par la transfection d'un siRNA spécifique son impact sera mesuré grâce à l'utilisation de lignées de mélanome dans lesquelles nous avons transfecté de façon stable une construction correspondant à l'ARN *meloe* dans lequel un gène rapporteur fluorescent a été substitué à l'ORF MELOE-1 (décrites dans le chapitre suivant).

III. Le rôle du stress du réticulum dans l'activation de l'IRES

MELOE-1

Au cours de notre précédente étude, lorsque nous avons transfecté dans les cellules de mélanome des constructions GFP-MELOE-1, la fluorescence n'a pu être observée que dans environ 5% des cellules (Carbonnelle et al., 2013). Paradoxalement, lors d'expériences de co-culture de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de MELOE-1 avec des lignées de mélanome environ 30-40% des cellules étaient lysées de façon spécifique. Ces observations semblent donc indiquer que l'expression de MELOE-1 est faible à l'état basal mais inductible par des modifications de l'environnement cellulaire.

L'activation des IRES cellulaires est souvent associée à des épisodes de stress cellulaire comme je l'ai détaillé précédemment. Les cellules de mélanome étant sujettes à l'hypoxie, la privation de nutriments et donc au stress du réticulum, l'une de nos hypothèses de travail est que l'activation spécifique de l'IRES MELOE-1 est liée à ce stress cellulaire.

A. **Obtention d'une lignée de mélanome MELOE-1-YFP**

Pour cette étude, nous avons besoin de mesurer la traduction de MELOE-1 dans des cellules de mélanome sous l'effet de différents traitements. Ne disposant pas d'anticorps anti-MELOE-1, nous avons généré une lignée de mélanome transfectée de façon stable avec une construction dans laquelle MELOE-1 a été remplacé par le gène rapporteur YFP. Pour cela l'ORF codant pour MELOE-1 a été remplacé par celui codant pour la YFP au sein de la

séquence *meloe* entière afin de conserver une régulation de la transcription et de la traduction identiques à celles du transcrit natif (figure 25). Les cellules de la lignée M117 transfectées ont ensuite été clonées afin d'obtenir une culture homogène.

B. L'expression de MELOE-1 est augmentée par un traitement à la rapamycine

Dans un premier temps, nous avons souhaité vérifier l'effet d'une inhibition de la traduction coiffe-dépendante sur la traduction de MELOE-1. Pour cela nous avons traité la lignée M117 MELOE-1-YFP avec la rapamycine qui en inhibant mTOR, empêche la phosphorylation de 4E-BP1, entraîne la séquestration d'eIF4E par 4E-BP1 et donc in fine l'inhibition de la traduction coiffe dépendante.

Après 24h de traitement avec des doses croissantes de rapamycine des lysats cytoplasmiques ont été réalisés et les échantillons ont été analysés par Western Blot en utilisant un anticorps anti-GFP. Le traitement à des doses de 25 et 50nM entraîne une augmentation de l'expression du gène rapporteur YFP (figure 26). En conditions d'inhibition des voies classiques de la traduction on observe donc un maintien et même une augmentation de la traduction de MELOE-1 pouvant être associé au contrôle IRES-dépendant de sa traduction.

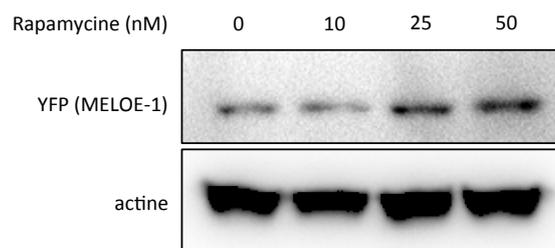


Figure 26 : Expression du gène rapporteur YFP après traitement des lignées à la rapamycine. Les cellules de la lignée M117 MELOE-1-YFP on été exposées à des doses croissantes de rapamycine pendant 24h avant de subir une lyse cytoplasmique. 20ng de protéines totales pour chaque condition ont été séparées sur un gel SDS-PAGE puis analysées par Western Blot en utilisant un anticorps anti-eGFP.

C. L'expression de MELOE-1 est sensible au stress du réticulum.

A la suite de cette première expérience nous nous sommes intéressés à l'impact du stress du réticulum sur l'expression de MELOE-1. La lignée M117 MELOE-1-YFP a été traitée avec deux inducteurs du stress du réticulum :

- la thapsigargine (TG) inhibiteur non compétitif de la pompe ATPase à calcium SERCA («Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase ») qui empêche la réabsorption du calcium dans la lumière du réticulum

- la tunicamycine (TU) qui empêche la glycosylation des protéines nouvellement synthétisées en inhibant l'enzyme N-acétylglucosamine phosphotransférase.

Le traitement des cellules par ces deux composés entraîne une diminution de la conformation des protéines dans la lumière du réticulum ce qui déclenche un stress du réticulum et donc l'UPR.

L'effet d'un traitement de la lignée de mélanome M117 MELOE-1-YFP par la thapsigargine et la tunicamycine pendant 24h a été analysé par deux techniques : la microscopie confocale et l'analyse biochimique par Western Blot.

1. Observation des M117 MELOE-1-YFP traitées TU/TG en microscopie confocale.

Grâce à la transfection dans la lignée M117 du gène rapporteur fluorescent YFP la réponse à l'induction du stress du réticulum a pu être mesurée par observation de la fluorescence.

Dans une expérience préliminaire, les cellules de mélanome ont été observées en microscopie confocale après 24h de traitement à différentes concentrations de thapsigargine et de tunicamycine.

Dans la condition non traitée, malgré le fait que les cellules utilisées soient issues d'un clone ayant intégré la construction MELOE-1-YFP, de nombreuses cellules sont très faiblement fluorescentes et donc indétectables (figure 27A). Dans nos expériences précédentes l'expression de MELOE-1 a toujours été très faible, ces observations sont donc cohérentes avec un faible niveau de traduction. En revanche, lorsque l'on induit dans ces cellules un stress du réticulum, l'expression de la YFP est induite dans une majorité d'entre elles (figure 27A).

Le pourcentage de cellules YFP positives après traitement à la thapsigargine passe de moins de 10% en conditions normales à 40% après induction du stress du réticulum (figure 27B). Les deux concentrations de thapsigargine testées : 0,5 et 2 μ M induisent toutes les deux une augmentation de la fraction de cellules positives semblable.

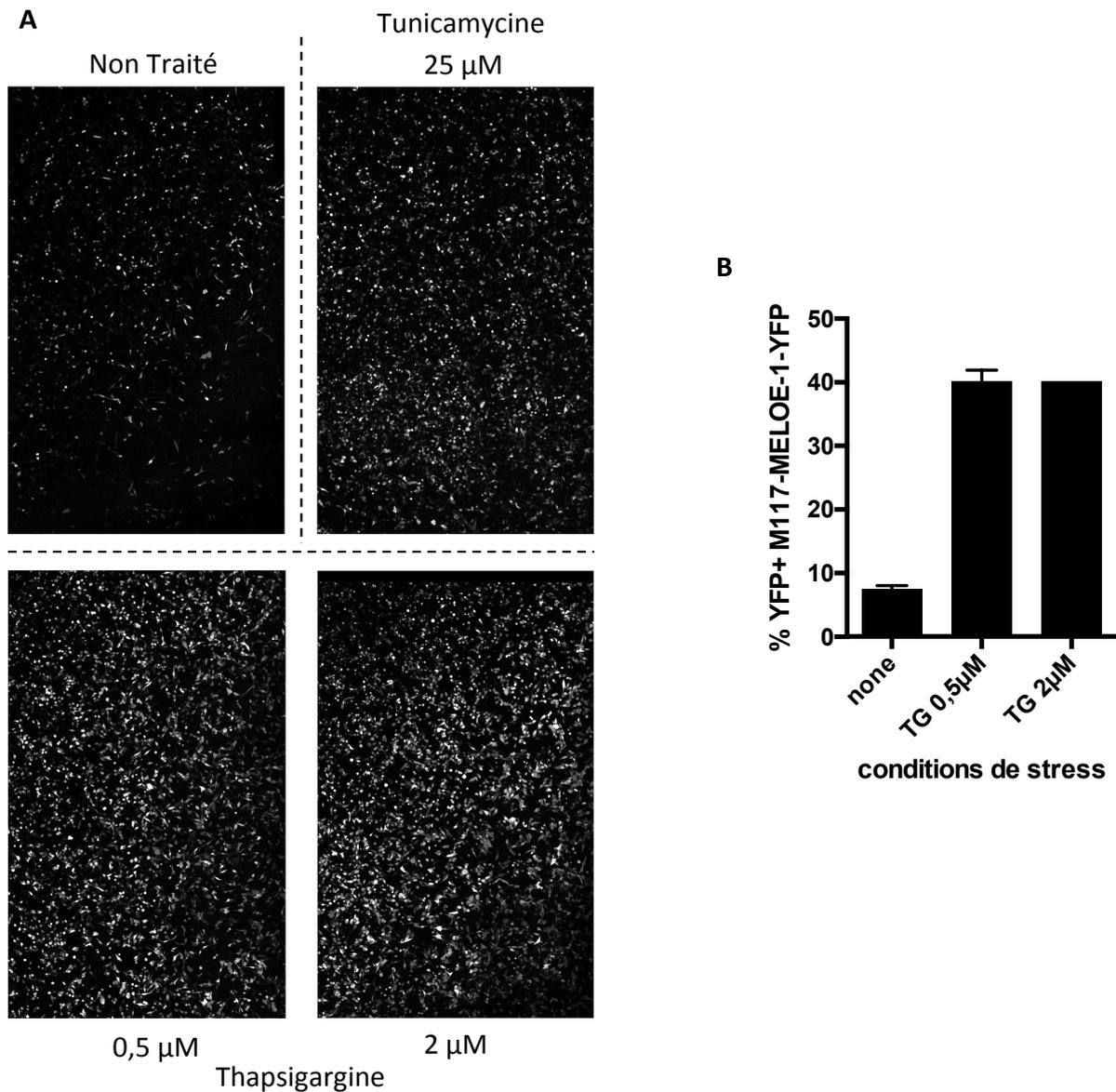


Figure 27 : Expression de YFP-MELOE-1 après induction d'un stress du réticulum sur la lignée de mélanome modifiée M117-YFP-MELOE-1. (A) Observation en microscopie confocale des lignées traitées avec la tunicamycine (25 μ M) ou la thapsigargine (TG) (0,5 et 2 μ M) pendant 24h. Les images présentées sont les composites de 30 champ. (B) Pourcentage de cellules YFP⁺ après 24h de traitement TG de la lignée M117-YFP-MELOE-1 par rapport au nombre de noyaux (marqués au colorant de Hoescht). L'histogramme est représentatif d'une expérience en duplicats.

2. Détection de la traduction de YFP (MELOE-1) cytoplasmique par Western Blot.

Nous avons également validé la surexpression de la YFP en conditions de stress du réticulum induite par la thapsigargine par détection en Western Blot. Sur des cellules traitées par des doses croissantes de thapsigargine on observe une augmentation de la quantité de YFP dans le lysat cytoplasmique des cellules (figure 28). A l'inverse, l'expression de l'antigène de mélanome Melan-A est très diminuée dans les cellules stressées comme cela est attendu pour une protéine dont la traduction est coiffe-dépendante et donc inhibée en conditions de stress du réticulum et d'UPR.

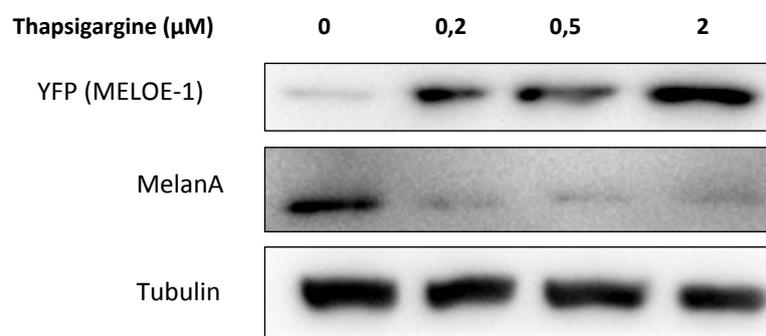


Figure 28: Expression du gène rapporteur YFP après traitement des lignées à la des doses croissantes de thapsigargine. Après 24h de traitement, 20 μg de lysat cytoplasmique des cellules M117 MELOE-1-YFP traitées ont été chargées sur un gel SDS-PAGE. L'expression des protéines YFP (MELOE-1) et Melan-A a été détectées par western blot en utilisant des anticorps spécifiques (anti-eGFP ; anti Melan-A).

Pour les protéines dont la traduction est IRES dépendante, comme c'est le cas pour YFP dans le contexte de l'ORF MELOE-1, l'expression n'est pas affectée par une inhibition de la traduction coiffe dépendante et la quantité de protéine produite dans ces conditions est même augmentée de façon importante. Dans les cellules tumorales le stress du réticulum est une condition récurrente et comme c'est le cas pour d'autres IRES associées aux tumeurs, la régulation de l'activation de l'IRES MELOE-1 y semble associée.

D. L'induction du stress du réticulum augmente la reconnaissance de cellules de mélanome par un clone spécifique de MELOE-1

Enfin, sur la lignée de mélanome M117 non transformée les variations de l'expression de MELOE-1 ont été mesurées de façon indirecte par l'activation d'un clone lymphocytaire CD8⁺ spécifique de MELOE-1 face aux lignées traitées ou non.

Pour cela les lignées ont été traitées avec les inducteurs de stress du réticulum pendant 24h, puis co-cultivées avec le clone spécifique de MELOE-1 pendant 5h. L'activation du clone a été mesurée par la production de TNF α et d'INF γ . En conditions non traitées, la co-culture avec les cellules de la lignée M117 entraîne la sécrétion de TNF α et d'INF γ par environ 20-30% des clones (figure 29A, panel gauche). Après un traitement de 24h à la thapsigargine on observe une augmentation très significative de l'activation des clones, jusqu'à plus de 90% (figure 29A). Cet effet du stress du réticulum TG-induit sur l'activation du clone par la lignée est dose dépendant (figure 29B) et on observe un retour à l'état d'activation basale aux plus faibles doses.

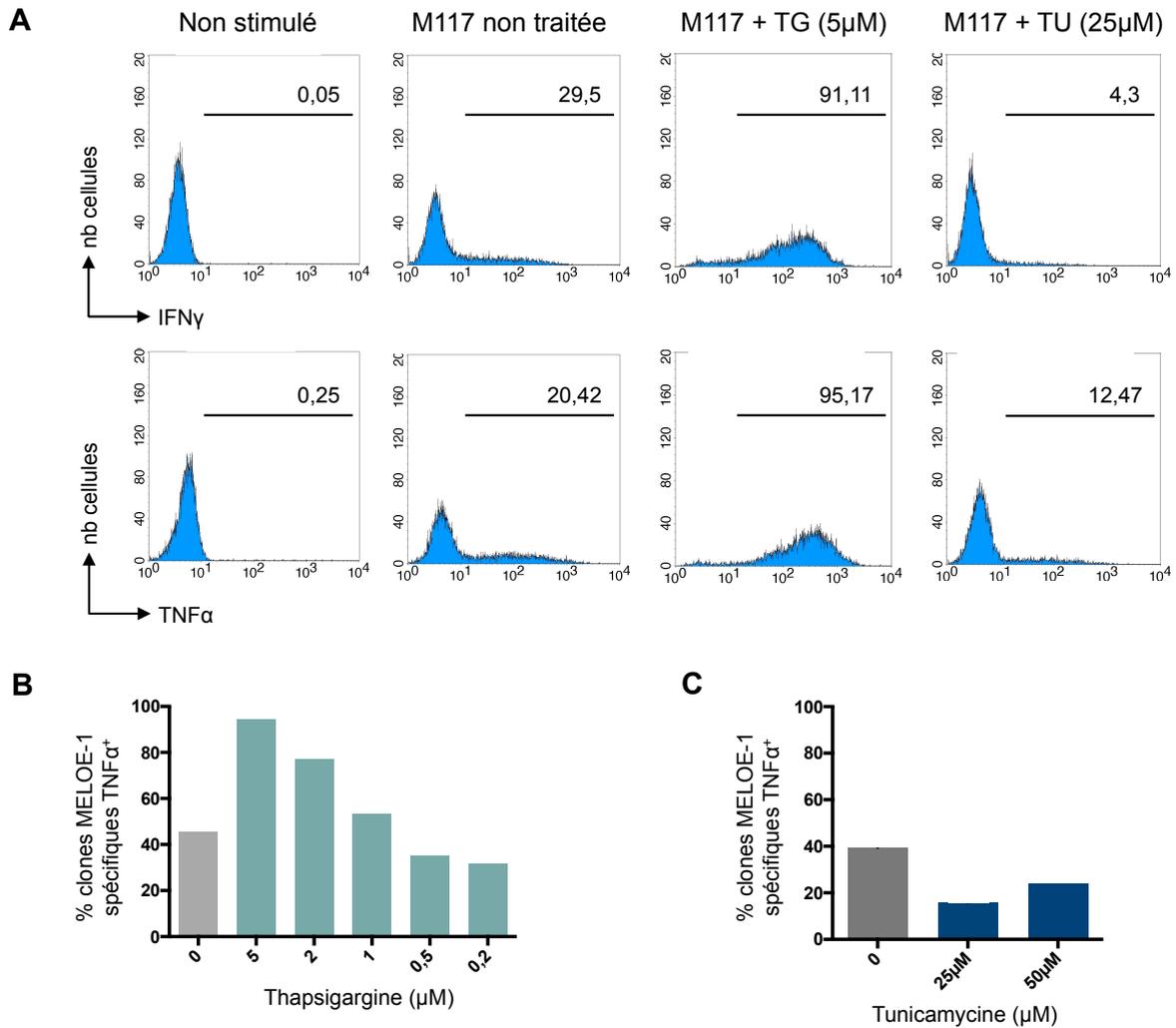


Figure 29: Reconnaissance des la lignée de mélanome M117 par un clone spécifique de MELOE-1 (M170.48) après induction d'un stress du réticulum. (A) Sécrétion d'interféron γ (panel du haut) et de TNF α (panel du bas) par les clones après co-culture de 5h avec la lignée de mélanome M117 non traité, traitée à la thapsigargine (TG) ou à tunicamycine (TU) en présence de brefeldine A. - Pourcentage de clones MELOE-1 spécifiques TNF α + après co-culture avec la lignée M117 traitée avec des doses croissantes de thapsigargine (B) ou de tunicamycine (C).

Le traitement à la tunicamycine n'a pas permis quant à lui d'augmenter la reconnaissance des lignées par le clone MELOE-1 spécifique et on observe même une légère diminution de la sécrétion de cytokines (figure 29 A et C). Nos observations précédentes sur la lignée M117 MELOE-1-YFP ayant montré que le stress du réticulum TU-induit induit une augmentation de l'expression de YFP, nous avons émis l'hypothèse que cette diminution de la reconnaissance de la lignée par le clone pouvait être due à une défaut de présentation de l'antigène MELOE-1 dans ces cellules. Nous avons vérifié la présence en surface de molécules HLA de classe I après traitement à la thapsigargine ou à la tunicamycine. Tandis

que le traitement à la thapsigargine n'induit pas de variation de la présence des molécules du CMH I en surface, on observe une diminution de moitié de la moyenne de fluorescence après traitement à la tunicamycine (figure 30).

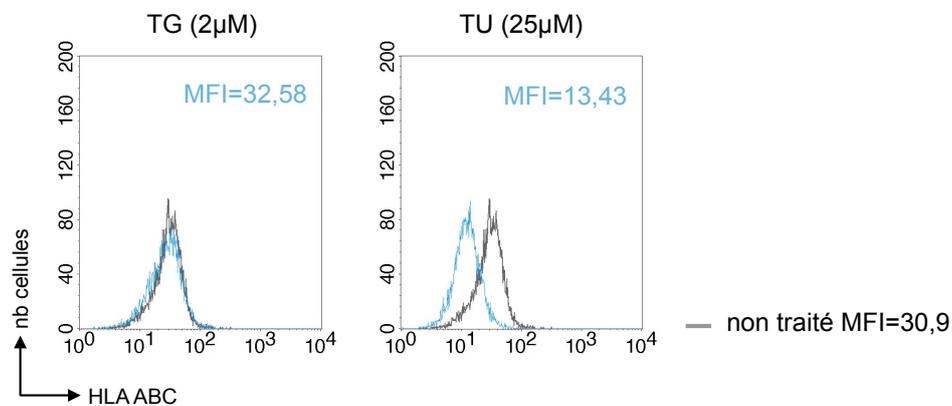


Figure 30: Expression des molécules HLA classe I (ABC) par les cellules de mélanome M117 traitées à la thapsigargine (TG 2µM) ou à la tunicamycine (TU 25µM). La courbe grise correspond à la condition non traitée, les moyennes de fluorescence sont indiquées pour chaque condition.

Cette différence est imputable au mode d'action de la tunicamycine qui inhibe la glycosylation des protéines, étape nécessaire à la maturation des molécules du CMH (Bagriacik, Kirkpatrick, & Miller, 1996). Même en cas d'augmentation des peptides spécifiques de MELOE-1, les cellules traitées à la tunicamycine sont donc moins capables de les présenter en surface pour la reconnaissance par le système immunitaire.

IV. Conclusion

Les résultats préliminaires obtenus dans cette étude sont en faveur de l'implication du stress cellulaire dans l'activation de l'IRES MELOE-1. Nous avons en effet montré que le stress du réticulum induit par différents composés pharmacologiques induisait une augmentation de l'expression du gène rapporteur YFP placé dans le contexte de l'ORF MELOE-1 ainsi qu'une augmentation de la reconnaissance des lignées traitées par un clone spécifique de MELOE-1 dans le cas où la présentation des antigènes n'était pas altérée. Des conditions de stress telles que l'hypoxie ou la privation de glucose qui peuvent également induire le stress du réticulum sont actuellement en cours d'investigation.

Les mécanismes moléculaires sous-jacents n'ont pour le moment pas été élucidés. Différentes pistes sont suivies, dans un premier temps nous continuons la description du facteur ITAF putatif hnRNP-A1. Nous devons compléter les preuves de son association avec l'IRES MELOE-1 par une validation de son implication dans l'initiation de la traduction IRES dépendante. Pour cela nous souhaitons augmenter (par transfection de sa séquence codante) ou inhiber (par siRNA) l'expression de hnRNP-A1 afin d'en évaluer l'impact sur l'activation de l'IRES. Ce dernier sera mesuré grâce à l'utilisation d'un vecteur bicistronique comportant la séquence IRES MELOE-1 flanquée de deux gènes rapporteurs luminescents.

De plus, nous souhaitons identifier le ou les facteurs permettant de surmonter l'inhibition de la formation du complexe ternaire par la phosphorylation de eIF2 α en conditions de stress cellulaire. Un certain nombre d'études montrent l'implication du facteur eIF2A capable de recruter l'ARN de transfert Met-tRNA_i^{Met} au site d'initiation de la traduction en conditions IRES dépendantes. Nous souhaitons donc vérifier l'implication de ce facteur dans la traduction de MELOE-1.

Discussion et perspectives

I. Rôle et origine des ARNs polycistroniques eucaryotes.

Les travaux que j'ai réalisés au cours de la première étude de ma thèse ont mis en évidence la traduction d'un ORF supplémentaire codé par l'ARN polycistronique *meloe*. Contrairement à MELOE-1 et MELOE-2 et du fait de sa position proche de l'extrémité 5' du transcrit, MELOE-3 (ORF₁₃₂₋₂₉₆) est traduit de façon strictement coiffe-dépendante. L'utilisation de modes de traduction distincts pour ces trois polypeptides permet leur traduction différentielle dans les cellules de la lignée mélanocytaire. En effet, alors que MELOE-3 est exprimé dans les mélanocytes normaux et dans les cellules de mélanome ; MELOE-1 et MELOE-2 ne sont traduits que dans les cellules tumorales. En raison de leur position centrale sur l'ARN, les ORFs codants MELOE-1 et MELOE-2 sont difficilement accessibles pour la traduction coiffe dépendante. Des mécanismes de traduction alternatifs, dépendants de séquences cis-régulatrices de type IRES qui favorisent le recrutement des ribosomes aux sites d'initiation de la traduction en s'affranchissant de l'étape de scanning sont donc mis en place.

Chez les eucaryotes, les ARNs polycistroniques sont assez rares et les transcrits qui sont traduits correspondent plutôt au modèle « un ARN, un ORF, une protéine ». Cependant pour certains, la traduction de deux protéines fonctionnelles à partir du même transcrit a été décrite (Bahar Halpern, Veprik, Rubins, Naaman, & Walker, 2012; X. Du et al., 2013; Gray et al., 1999). Deux configurations générales sont observées : les deux ORFs sont chevauchants ou il s'agit d'ORFs séparés sur l'ARN, comme dans le cas de *meloe* et on parle alors d'ORFs en tandem.

Selon les fonctions qui sont attribuées aux différentes protéines traduites plusieurs catégories d'ARNs polycistroniques sont recensés : les ARNs dont les deux cistrons (ORFs) codent pour des sous unités d'un même complexe (Hui et al., 2009) ; ceux dont les deux ORFs codent pour des protéines de fonctions similaires mais dont la traduction diffère (Covington, Briscoe, Brown, & Jayawickreme, 2006; Edfalk, Steneberg, & Edlund, 2008) ; des protéines de fonctions différentes (Ul-Hussain et al., 2014; Xiong et al., 2006). La fonction de la majorité des protéines ou polypeptides issus d'ARN polycistroniques reste encore non élucidée à ce jour.

Dans cette classification fonctionnelle proposée par l'équipe de C. Gomez, *meloe* est classé dans la catégorie II, celle des ARNs dont les protéines traduites sont indépendantes mais ont des fonctions similaires (Karginov, Pastor, Semler, & Gomez, 2017). Cette classification peut être remise en cause car bien que MELOE-1 et MELOE-2 soient tous les deux des antigènes spécifiques de mélanome aucun rôle ne leur a pour le moment été attribué, en dehors d'être une source d'épitopes tumoraux immunogènes. Cela est d'autant plus vrai pour MELOE-3 dont la traduction dans les cellules saines suggère qu'il possède un rôle physiologique et qu'en dehors des conditions tumorales il s'agit du produit principal de *meloe*.

Avec l'objectif d'identifier le rôle de *meloe* dans les cellules tumorales et les mélanocytes normaux nous avons décidé d'éteindre son expression par un shRNA. Le design de ce dernier s'est alors basé sur celui du siRNA utilisé dans une précédente étude et qui se situe en amont de MELOE-2 sur la séquence ARN. Ce siRNA transfecté de façon transitoire dans des lignées de mélanome entraînait une diminution de l'expression de *meloe* ainsi que de la reconnaissance des lignées transfectées par des clones T spécifiques de MELOE-1 ou de MELOE-2 (Carbonnelle et al., 2013).

Le transfert des shRNAs dans les lignées de mélanome par transduction virale a permis l'intégration dans le génome des cellules de la séquence codant pour le shRNA ; cependant nous n'avons pas observé de diminution de l'expression de *meloe* dans ces cellules. Cette absence d'interférence du shRNA avec l'ARN *meloe* peut-être due à une expression trop faible dans les cellules de mélanome du fait de l'intégration dans une région du génome peu active d'un point de vue transcriptionnel ou de l'efficacité moyenne du promoteur qui contrôle l'expression du shRNA. Quoi qu'il en soit ; cette approche a été abandonnée au profit de la technique d'édition de CRISPR-Cas9. Outre sa grande efficacité, cette approche permettra également d'étudier le rôle individuel des polypeptides de la famille MELOE alors que les siRNA et shRNA ne nous permettaient que de supprimer l'ARN *meloe* entier.

L'élargissement des données concernant l'implication des ARNs non-codants et en particulier des lncRNAs a posé le problème de leur origine évolutive et de leur dynamique qui reste encore assez peu connue. L'évolution des lncRNAs dans la phylogénie est rapide, la

plupart des lncRNAs mis en évidence chez les eucaryotes n'ont pas d'homologues dans les espèces séparées par plus de 50 millions d'années (Hezroni et al., 2015). Il semble donc que dans l'évolution récente de chaque espèce un grand nombre de lncRNAs émergent. Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer les mécanismes de leur apparition : la duplication de lncRNAs existants, la perte du potentiel codant de certains loci, la stabilisation de transcrits cryptiques par des mutations touchant les sites d'épissage, l'exaptation ou modifications stochastiques de régions à l'origine non transcrites du génome et qui en acquièrent la capacité ou enfin les effets de l'intégration dans le génome d'éléments transposables (Ulitsky, 2016).

Cette dernière hypothèse est étayée par de nombreuses études qui montrent notamment qu'entre 70 et 80% des lncRNAs humains contiennent au moins un élément transposable et que ces derniers couvrent environ 40% des séquences primaires (Kapusta et al., 2013; Kelley & Rinn, 2012). Ces éléments transposables sont des séquences d'acides nucléiques mobiles capables de s'intégrer dans l'ADN génomique et qui participent à son évolution (Cordaux & Batzer, 2009) ; chez les vertébrés on en retrouve quatre types, les SINE (« short interspersed elements »), les LINE (« long interspersed elements »), les LTR/ERV (« long terminal repeat » issus de rétrovirus endogènes) et les transposons chacun contribuant à la composition des lncRNAs (Kapusta et al., 2013). Les éléments transposables contribuent à la biogenèse de nombreux lncRNAs à différentes étapes : définition du site d'initiation de la transcription, épissage, poly-adénylation ou formation de structures secondaires (R. Johnson & Guigo, 2014; Kapusta et al., 2013; Kelley & Rinn, 2012). Il est donc proposé que les éléments transposables influencent le transcriptome « non-codant » par des intégrations stochastiques dans le génome qui peuvent modifier les lncRNAs existants ou former de nouveaux loci de lncRNAs. L'étude de Kelley et Rinn a notamment montré que l'expression de lncRNAs spécifiques de cellules pluripotentes était sous le contrôle de promoteurs dérivés de rétrovirus endogènes humains. Dans une étude de 2014, Ferreira et ses collaborateurs ont montré qu'une dérégulation globale de l'expression des éléments transposables était observée dans des cas de leucémie lymphocytaire chronique (Ferreira et al., 2014). La dérégulation de l'expression des éléments transposables dans les cancers pourrait ainsi être l'un des facteurs responsables de l'association entre l'expression des lncRNAs et les cancers (Anwar, Wulaningsih, & Lehmann, 2017).

De tels motifs ne sont pas retrouvés au locus du lncRNA *meloe*, son apparition dans le génome des primates ne semble donc pas liée aux éléments mobiles du génome. On peut alors envisager d'autres explications et notamment la théorie de l'exaptation qui correspond à la survenue d'une série de mutations créant des combinaisons de promoteurs, signaux de polyadénylations favorables à la transformation de régions non traduites du génome en lncRNAs.

II. La traduction IRES dépendante et la synthèse d'antigènes

Parmi les ARNs polycistroniques décrits chez les mammifères, certains sont traduits par des mécanismes ressemblant à ceux que nous avons décrits pour *meloe* ; c'est à dire la traduction des ORFs les plus proches de l'extrémité 5' de façon classique alors que l'ORF en aval est traduit grâce à la présence d'IRES (Bahar Halpern et al., 2012; X. Du et al., 2013). Dans le cas de *meloe*, cette différence de régulation de la traduction est la base de l'expression restreinte de MELOE-1 et MELOE-2 dans les cellules de mélanome et également de l'immunogénicité de ces protéines. En effet, en comparant l'immunogénicité de MELOE-1 et de MELOE-3 nous avons observé un répertoire CD4⁺ et CD8⁺ spécifique de MELOE-3 très rare dans le sang de donneurs sains. A l'inverse, le répertoire spécifique de MELOE-1 est fréquent chez les donneurs sains et les patients atteints de mélanome (Bobinet et al., 2012; Godet, Desfrancois, et al., 2010; Rogel et al., 2011).

Cette dichotomie dans l'expression des ORFs d'un même ARN selon leur mode de traduction n'est pas vérifiée dans tous les cas d'ARNs polycistroniques. Quand les fonctions des deux protéines traduites sont liées, la traduction simultanée du couple est nécessaire. C'est notamment le cas pour les protéines de rat PRO1 et PRO2 qui s'associent avec d'autres protéines pour former un complexe de liaison au glutamate et dont l'expression concomitante dans les cellules a été montrée (Hui et al., 2009). Les mécanismes d'activation de l'IRES qui permettent la traduction de PRO2 n'ont pas encore été décrits.

L'exemple le plus proche de *meloe* en termes de régulation de la traduction et de fonction est l'ARN de la myotrophine (protéine de structure) qui comporte dans sa partie 3' un ORF codant pour MPD6 (« myeloproliferative disease 6 »). Cette protéine de 6,4kDa est traduite de façon IRES dépendante et induit une réponse humorale dans certaines tumeurs dans lesquelles l'expression du transcrit est augmentée (Xiong et al., 2006). De plus, le

traitement par l'interféron α augmente l'activation de l'IRES de MPD6 dans ces cellules et donc l'expression de l'antigène.

Alors que les rôles des ARNs non codants et de la traduction IRES dépendante dans les cellules tumorales font l'objet de plus en plus d'études, les exemples d'antigènes appelés « cryptiques » sont encore rares. Leurs caractéristiques sont pourtant particulièrement intéressantes dans le contexte tumoral où la traduction classique est dérégulée et où les réexpressions de régions habituellement silencieuses du génome sont observées.

Nos travaux préliminaires sur l'activation de la séquence IRES qui contrôle la traduction de MELOE-1 ont validé l'impact du stress cellulaire et notamment du stress du réticulum. Des expériences sont actuellement en cours pour tester l'impact de stress plus semblables à ceux subis par les cellules tumorales dans le microenvironnement tels que les privations de glucose ou l'hypoxie. Nous souhaitons identifier quelles conditions peuvent entraîner, seules ou en combinaison, la surexpression de MELOE-1. Comme cela a été développé précédemment, les effets du stress cellulaire sur la traduction coiffe-indépendante sont principalement associés au recrutement ou à l'activation de facteurs impliqués dans la traduction. Deux de ces facteurs sont actuellement étudiés pour leur implication dans la traduction de MELOE-1 : hnRNP-A1 dont le rôle ITAF a été montré pour différentes IRES cellulaires, et eIF2A capable de former un complexe avec l'ARN de transfert initiateur et la sous unité 40S du ribosome lorsqu'eIF2 α est phosphorylé.

En identifiant les mécanismes d'activation de l'IRES MELOE-1, nous pourrions comprendre quelles sont les voies de transduction qui modifient le programme de traduction dans les cellules de mélanome conduisant à l'expression spécifique de MELOE-1. De plus, l'identification de ces voies de transduction, nous permettra d'envisager ensuite d'augmenter l'expression de l'antigène MELOE-1 par les cellules tumorales à l'aide de petites molécules pharmacologiques. Dans les cancers, les IRES impliquées dans la survie et la prolifération telles que celles qui contrôlent l'expression de c-myc ou de p53 des cellules tumorales sont des cibles thérapeutiques à l'étude (Holcik, 2004; Ji et al., 2017; Shi et al., 2016d). Dans le cas de maladies neurodégénératives associées à l'expression de protéines IRES-dépendantes telles que l'ataxie spinocérébelleuse de type 6 (SCA6) le bénéfice clinique de la modification de l'activité IRES par des miRNAs a été montré chez la souris (Miyazaki, Du, Muramatsu, & Gomez, 2016).

Malgré leur toxicité importante et leur action sur l'ensemble des cellules, des composés chimiques inducteurs de stress du réticulum (thapsigargine, tunicamycine) pourraient être utilisés en clinique sous forme de prodrogues. De fait, des essais cliniques récents dans le traitement de tumeurs solides ont montré que l'utilisation d'une pro-drogue, la mipsagargine, dont le clivage survient préférentiellement dans les cellules tumorales pour libérer la thapsigargine, était possible chez les patients (Denmeade et al., 2012; Mahalingam et al., 2016). Dans ce protocole, la thapsigargine était utilisée pour son potentiel cytotoxique en modifiant l'homéostasie calcique des cellules ; cependant son rôle inhibiteur de la traduction coiffe dépendante et l'activation de modes de traduction alternatifs n'ont pas été explorés mais pourraient contribuer à l'effet thérapeutique.

La lignée M117-MELOE-1-YFP que j'ai générée au cours de ma thèse sera un bon outil pour réaliser le criblage de composés pharmacologiques capables de moduler l'expression de MELOE-1 et pouvant être utilisés en thérapie.

III. Définition de la classe des « néoantigènes »

Dans le champ d'étude des antigènes de tumeur, les antigènes mutés connaissent un succès considérable du fait de leur forte spécificité tumorale. La survenue des mutations qui permettent l'émergence de ces antigènes ayant lieu au cours du processus tumoral, ils ont donc été classés dans la catégorie des « néoantigènes ». Parmi les différentes classes d'antigènes décrites jusqu'à présent, ce sont les seuls qui présentent ce profil d'apparition de novo et c'est pourquoi, au sein de la communauté scientifique, l'amalgame entre néoantigènes et antigènes mutés est souvent fait. Cependant, si l'on définit les néoantigènes au sens strict comme tous les antigènes non exprimés par les cellules saines, ne faisant donc pas l'objet d'une tolérance thymique, et exprimés spécifiquement sur les cellules tumorales, alors la famille des "néoantigènes" nous semble beaucoup plus large que la famille des seuls antigènes mutés.

Les études génomiques des tumeurs ont dans un premier temps été réalisées à partir des données de séquençage d'exomes et ont donc permis d'identifier des mutations dans les gènes codant pour des protéines connues (Kandoth et al., 2013). De même, les analyses protéomiques de peptides élués des CMH de cellules tumorales par spectrométrie de masse

sont réalisées en comparant avec les bases de données de séquences protéiques de référence et ne permettent donc d'identifier que les peptides issus de ces protéines. Or les gènes codant pour des protéines ne correspondant qu'à moins de 2% du génome humain, il est vraisemblable que les techniques conventionnelles de protéo-génomique ne soient capables de détecter qu'une petite fraction des néoantigènes et des néoépitopes existants.

En effet, grâce aux données issues du « ribosome profiling » et de la détection de peptides correspondants, nous savons désormais que le protéome des cellules contient également des protéines ou peptides issus d'ARNs non codants traduits par des mécanismes aléatoires (Branca et al., 2013; Ingolia et al., 2014; M. Kim et al., 2014; Slavoff et al., 2013; Wilhelm et al., 2014). Par des techniques protéo-génomique de détection de peptides traduits dans les 6 cadres de lecture potentiels du génome, l'équipe du Pr Perreault a récemment montré que parmi les peptides élués des HLA de classe I de lymphocytes B, 6 à 13% étaient dérivés de régions considérées non-codantes du génome ou traduites hors du cadre de lecture classique (Laumont et al., 2016). Parmi ces peptides cryptiques, la majorité provient de séquences codantes sans pour autant correspondre aux ORFs classiques décrits pour ces gènes (Malarkannan, 1995; S. R. Starck et al., 2012a). L'autre partie des peptides sont issus de régions non codantes d'ARNm (5' ou 3' UTR, introniques, intergéniques ou de jonction exon-intron) ou de lncRNAs, de pseudogènes ou de régions non classifiées. Les polypeptides dont sont issus ces peptides sont courts, en moyenne 39aa, en comparaison aux protéines conventionnelles (environ 400aa) et les auteurs émettent l'hypothèse que du fait de cette différence de taille, les mécanismes de dégradation permettant leur présentation sur les CMH I sont différents de ceux des protéines classiques. Enfin dans des expériences *in vitro*, l'immunogénicité de ces peptides cryptiques a été démontrée.

La participation de peptides issus de régions non codantes du génome à la composition des complexes CMH-peptides ou immunopeptidome incite à repenser l'étendue des antigènes spécifiques de tumeur (TSA). Dans les cellules tumorales, seul 1% des mutations somatiques non-synonymes ont lieu dans les régions du génome qui codent pour des protéines, les 99% restants correspondant à des régions non codantes (Khurana et al., 2016). La famille des antigènes mutés est donc potentiellement beaucoup plus importante et ne se résume pas aux séquences exoniques mutées au sein desquelles la majorité des recherches de nouveaux TSA est effectuée actuellement (Verdegaal et al.,

2016b; Vitiello & Zanetti, 2017; Yadav et al., 2014) et est potentiellement beaucoup plus importante.

De plus, il n'est pas nécessaire que des mutations surviennent dans la séquence des peptides issus du génome pour qu'ils fournissent des épitopes spécifiques de tumeur. Les variants structuraux tels que les insertions, délétions, fusions peuvent créer ou modifier des ORFs, sources éventuelles d'épitopes spécifiques. Les modifications des mécanismes de traduction telles que l'initiation à des codons non-AUG, l'utilisation de cadres de lecture alternatifs ou les modes de traduction coiffe indépendants ont également été associées à la synthèse de TSA (Laumont & Perreault, 2017; S. R. Starck et al., 2012b; Shelley R Starck & Shastri, 2011).

Dans le cas de l'expression IRES-dépendante d'antigènes de tumeur comme MELOE-1 et MELOE-2, la résistance de la traduction aux phénomènes de stress cellulaire qui inhibent de façon globale la traduction coiffe-dépendante pourrait être un avantage. En effet, des études semblent montrer que les peptides les plus favorablement chargés sur les molécules du CMH de classe I sont ceux nouvellement synthétisés et ayant une demi-vie très courte (S.-B. Qian et al., 2006; Rammensee, Falk, & Rötzschke, 1993). Cette observation a conduit certains auteurs à faire l'hypothèse que la majorité des peptides présentés par le CMH I proviennent de produits ribosomiaux défectueux ou DRIPs (« defective ribosome products ») (Rock, Farfán-Arribas, Colbert, & Goldberg, 2014; J W Yewdell et al., 1996; Jonathan W Yewdell & Nicchitta, 2006). Malgré les controverses sur la part relative de ces peptides dans l'immunopeptidome, il semble vraisemblable que les peptides issus de protéines courtes ou de traduction incomplète se charge préférentiellement sur les complexes CMH I du fait de leur dégradation plus simple et donc plus rapide (Antón & Yewdell, 2014).

Dans les situations de stress cellulaire où la traduction coiffe dépendante est inhibée de façon globale, les antigènes traduits de façon IRES-dépendante sont susceptibles de prendre une part plus importante dans le protéome de la cellule. Une étude de Granados et ses collaborateurs a montré que le stress du réticulum induisait une diminution de la présentation sur les molécules du CMH I d'un épitope issu d'un antigène traduit de façon coiffe dépendante (Granados et al., 2009). Cette diminution n'était pas due à une diminution de la disponibilité des molécules du CMH de classe I ni de la $\beta 2$ microglobuline à laquelle elle s'associe mais à une stabilisation des protéines formées et à l'inhibition de la traduction coiffe-dépendante. Le pool de peptides capables de se fixer dans le sillon du CMH I est donc

diminué. Dans ces circonstances, il est possible que les protéines traduites de façon coiffe-indépendante, qui elles continuent à être synthétisées fournissent un grand nombre de peptides qui seront ensuite présentés dans le CMH I en surface.

Ces différentes études sont cohérentes avec nos travaux sur l'antigène MELOE-1 dont l'expression est augmentée en conditions de stress du réticulum ainsi que la reconnaissance des lignées de mélanome par des clones T CD8⁺ spécifiques.

L'expression de ce type d'antigènes spécifiques de tumeur, qu'elle dépende de mécanismes de traduction classiques ou non, sur des régions codantes ou non du génome est acquise *de novo* au cours du processus tumoral. Ils peuvent donc, au même titre que les antigènes mutés sur des régions exoniques être classés dans la catégorie des néoantigènes (figure 31). De plus, ils présentent quelques caractéristiques intéressantes pour leur utilisation en immunothérapie en comparaison des antigènes mutés.

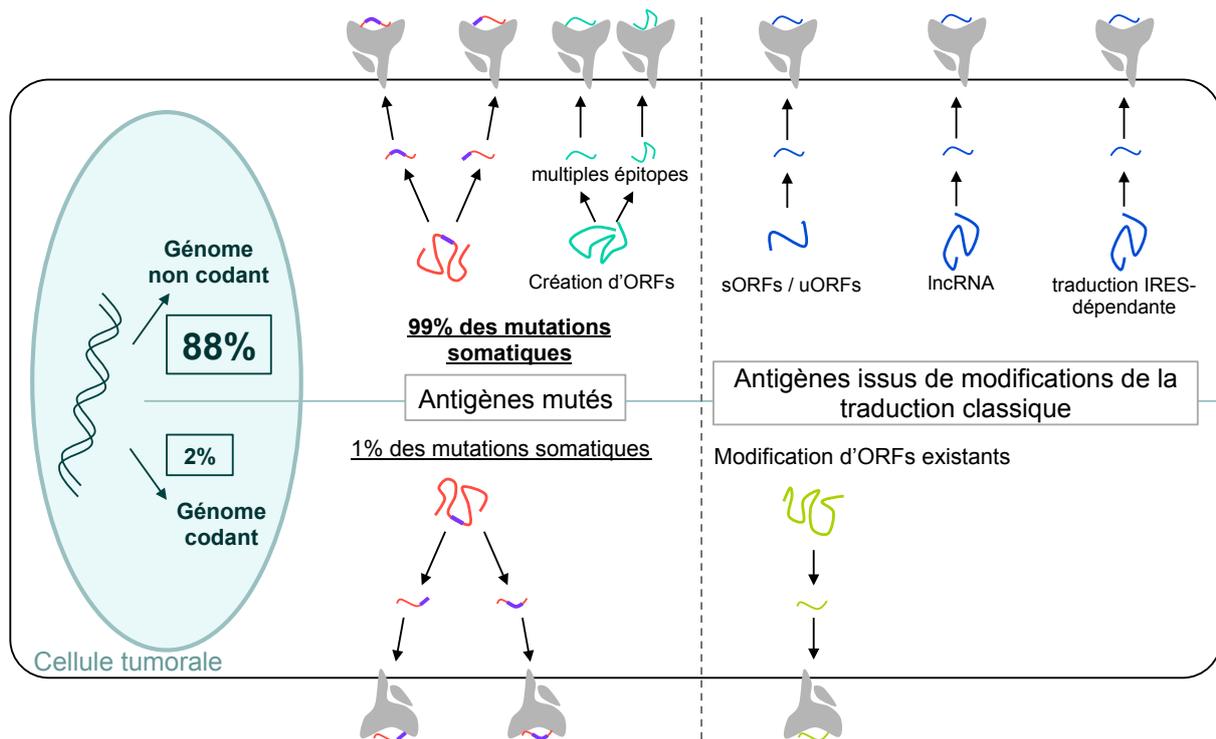


Figure 31 : Modes d'expression des « néoantigènes » : antigènes mutés et antigènes cryptiques.

Parmi les peptides issus d'antigènes mutés, les prédictions indiquent que seuls 0,1% sont effectivement des néoépitopes pouvant être présentés en surface et reconnus par le

système immunitaire (Vitiello & Zanetti, 2017). Les épitopes potentiels issus d'ORFs cryptiques spécifiques des cellules tumorales sont en revanche plus nombreux car ils couvrent l'ensemble de l'ORF. Dans le cas des antigènes MELOE-1 et MELOE-2, notre équipe a effectivement mis en évidence différents épitopes immunogènes présentés par les CMH de classe I et II (Bobinet et al., 2012; Godet et al., 2008; Godet, Moreau-Aubry, et al., 2010; Rogel et al., 2011).

Une autre caractéristique des néoantigènes cryptiques est le fait que leur expression soit modulable. Sous l'effet de différents signaux environnementaux comme le stress cellulaire (Andreev et al., 2015; Lasfargues, Martineau, Bousquet, & Pyronnet, 2013; Leprivier et al., 2015a; Robichaud et al., 2014) ou les conditions inflammatoires (Prasad, Starck, & Shastri, 2016; Xiong et al., 2006) l'expression de TSA peut être activée. L'identification des modes d'activation de ces néoantigènes permet de développer des inducteurs d'expression capables de potentialiser des protocoles d'immunothérapie.

Enfin, l'expression de ces néoantigènes ne dépendant pas uniquement de mutations somatiques aléatoires, ils serait possible d'identifier des TSA partagés et donc de proposer des thérapies accessibles à un plus grand nombre de patients.

Dans le but d'identifier de nouveaux antigènes de mélanome dont l'origine et le profil d'expression seraient semblables à ceux de MELOE-1 et de MELOE-2, c'est à dire issus de longs ARNs non codants et sous le contrôle traductionnel de séquences IRES, notre équipe a mis en place un nouveau projet de recherche, qui est issu des résultats de ces travaux de thèse. Ce projet repose sur un protocole d'analyse bioinformatique permettant au sein des lncRNAs spécifiques de mélanomes caractérisés par RNAseq, d'identifier des ORFs putatifs traduits de façon IRES-dépendante puis des épitopes antigéniques putatifs au sein des polypeptides traduits.

IV. L'expression des néoantigènes et la tolérance immunitaire

Le choix des antigènes cibles pour des protocoles d'immunothérapie se fait en général selon deux critères principaux : la spécificité de l'antigène et la qualité de la réponse immunitaire induite. Les antigènes mutés regroupent ces deux caractéristiques puisque les

mutations somatiques ne surviennent que dans les cellules tumorales et que pourvu qu'il n'existe pas de cross-réactivité avec le peptide naturel, les lymphocytes T reconnaissant l'épitope muté n'auront ni été négativement sélectionnés au cours de la sélection thymique ni été l'objet d'une tolérance immunitaire.

Au cours de leur maturation dans le thymus, les lymphocytes subissent deux épisodes de sélection afin d'obtenir en périphérie des lymphocytes réactifs à des peptides du non-soi et tolérants face à des peptides du soi. La sélection négative consiste à éliminer les cellules dont les TCR (« T cell receptors ») reconnaissent des protéines du soi et qui risqueraient de provoquer des réactions auto-immunes en périphérie. Pour cela, une population de cellules de la médulla du thymus, les mTEC (« medullar thymic epithelial cells ») ont la capacité d'exprimer un large panel des gènes grâce à la mise en place d'un système d'expression dérégulé des gènes (pEG : « promiscuous gene expression »). Les gènes exprimés par les mTEC correspondent à la quasi-totalité des types cellulaires, pouvant représenter jusqu'à 5-10% de l'ensemble des gènes connus (Kyewski & Derbinski, 2004). L'expression des gènes tissus-spécifiques par les mTEC repose en grande partie sur le facteur de transcription AIRE « autoimmune regulator » qui interagit avec la machinerie de transcription et favorise l'élongation de la transcription (Derbinski, Schulte, Kyewski, & Klein, 2001; Ucar & Rattay, 2015).

L'étude de ce mode de transcription permissif et unique a cependant révélé quelques failles comme c'est le cas pour l'antigène de différenciation Melan-A/MART-1 (Pinto et al., 2014). La fréquente expression dans les mTEC d'un transcrit tronqué ne contenant pas l'épitope immunodominant Melan-A₂₆₋₃₅ permet de retrouver en périphérie un répertoire spécifique fréquent et d'une large gamme d'affinité.

Ces différentes études ne prennent en compte que les protéines traduites à partir d'ARNs messagers de façon coiffe dépendante et pour lesquelles des rôles ont été décrits. L'expression de transcrits cryptiques dans les mTEC et l'existence de modes de traduction alternatifs tels que les séquences IRES ou l'utilisation de codons d'initiation non-AUG ne sont pas documentés. En se basant sur nos études des antigènes de la famille MELOE nous pouvons émettre certaines hypothèses. Tout d'abord, l'expression de MELOE-3 dans les mélanocytes normaux et l'absence de répertoire lymphocytaire T CD4⁺ ou CD8⁺ suggèrent une tolérance immunitaire, cohérente avec son expression en conditions physiologiques. La

traduction de transcrits considérés non-codants paraît donc possible dans les mTEC, dans la mesure où elle implique le mode de traduction coiffe-dépendant. En revanche, en ce qui concerne les antigènes IRES-dépendants MELOE-1 et MELOE-2, l'importante fréquence de leur répertoire spécifique en périphérie ainsi que la présence de lymphocytes T spécifiques de forte avidité fonctionnelle, suggèrent une faible sélection négative (Godet, Desfrancois, et al., 2010). Si cette hypothèse s'avère valide et que les lymphocytes T spécifiques d'antigènes IRES-dépendants ne subissent pas la sélection négative, leur utilisation en immunothérapie anti-tumorale est n'en est que plus attractive.

En conclusion, l'identification récente des néoantigènes issus de transcrits et/ou de modes de traduction cryptiques tels que la famille des antigènes MELOE est une avancée majeure en immunothérapie anti-tumorale, offrant d'une part la possibilité de cibler de nouvelles cibles spécifiques et partagées, et d'autre part de moduler l'expression de ces cibles en documentant finement les mécanismes responsables de leur traduction.

Bibliographie

- Aarnoudse, C. A., Van den Doel, P. B., Heemskerk, B., & Schrier, P. I. (1999). Interleukin-2-induced, melanoma-specific T cells recognize camel, an unexpected translation product of LAGE-1. *International Journal of Cancer*, *82*(3), 442-448. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19990730\)82:3<442::AID-IJC19>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19990730)82:3<442::AID-IJC19>3.0.CO;2-Z)
- Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, *26*(9), 1324-1337. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210220>
- Adams, S. L., Safer, B., Anderson, W. F., & Merrick, W. C. (1975). Eukaryotic initiation complex formation. Evidence for two distinct pathways. *J Biol Chem*, *250*(23), 9083-9089. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1194278>
- Aguissa-Touré, A. H., & Li, G. (2012). Genetic alterations of PTEN in human melanoma. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0878-0>
- Akers, S. N., Odunsi, K., & Karpf, A. R. (2010). Regulation of cancer germline antigen gene expression: implications for cancer immunotherapy. *Future Oncology*, *6*(5), 717-732. <https://doi.org/10.2217/fon.10.36>
- Alanio, C., Lemaitre, F., Law, H. K. W., Hasan, M., & Albert, M. L. (2010). Enumeration of human antigen-specific naive CD8+ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood*, *115*(18), 3718-3725. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-251124>
- Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. a J. R., Behjati, S., Biankin, A. V, ... Stratton, M. R. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, *500*, 415-21. <https://doi.org/10.1038/nature12477>
- Ali, Z., Yousaf, N., & Larkin, J. (2013). Melanoma epidemiology, biology and prognosis. In *European Journal of Cancer, Supplement* (Vol. 11, p. 81-91). <https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2013.07.012>
- Allam, H., & Ali, N. (2010). Initiation factor eIF2-independent mode of c-Src mRNA translation occurs via an internal ribosome entry site. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(8), 5713-5725. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.029462>
- Allemand, E., Guil, S., Myers, M., Moscat, J., Cáceres, J. F., & Krainer, A. R. (2005). Regulation of heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 transport by phosphorylation in cells stressed by osmotic shock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(10), 3605-3610. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409889102>
- Andersen, M. H., Pedersen, L. Ø., Becket, J. C., & Thor Straten, P. (2001). Identification of a cytotoxic T lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein survivin in cancer patients. *Cancer Research*, *61*(3), 869-872.
- Andersen, M. H., Svane, I., Becker, J. C., & Straten, P. T. (2007). The universal character of the tumor-associated antigen survivin. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0686>
- Anderson, D. M., Anderson, K. M., Chang, C. L., Makarewich, C. A., Nelson, B. R., McAnally, J. R., ... Olson, E. N. (2015). A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell*, *160*(4), 595-606. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.009>
- Andreev, D. E., O'Connor, P. B. F., Fahey, C., Kenny, E. M., Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., ... Baranov, P. V. (2015). Translation of 5' leaders is pervasive in genes resistant to eIF2 repression. *eLife*, *4*,

e03971. <https://doi.org/10.7554/eLife.03971>

- Andrews, S. J., & Rothnagel, J. A. (2014). Emerging evidence for functional peptides encoded by short open reading frames. *Nature reviews. Genetics*, *15*(3), 193-204. <https://doi.org/10.1038/nrg3520>
- Anichini, A., Maccalli, C., Mortarini, R., Salvi, S., Mazzocchi, A., Squarcina, P., ... Parmiani, G. (1993). Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients. *Journal of Experimental Medicine*, *177*(4), 989-998. <https://doi.org/10.1084/jem.177.4.989>
- Antón, L. C., & Yewdell, J. W. (2014). Translating DRiPs: MHC class I immunosurveillance of pathogens and tumors. *Journal of leukocyte biology*, *95*(4), 551-62. <https://doi.org/10.1189/jlb.1113599>
- Anwar, S., Wulaningsih, W., & Lehmann, U. (2017). Transposable Elements in Human Cancer: Causes and Consequences of Deregulation. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(5), 974. <https://doi.org/10.3390/ijms18050974>
- Audigier, S., Guiramand, J., Prado-Lourenco, L., Conte, C., Gonzalez-Herrera, I. G., Cohen-Solal, C., ... Prats, A.-C. (2008). Potent activation of FGF-2 IRES-dependent mechanism of translation during brain development. *RNA (New York, N.Y.)*, *14*(9), 1852-64. <https://doi.org/10.1261/rna.790608>
- Avdulov, S., Li, S., Michalek, V., Burrichter, D., Peterson, M., Perlman, D. M., ... Polunovsky, V. A. (2004). Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer Cell*, *5*(6), 553-563. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.05.024>
- Bagriacik, E. U., Kirkpatrick, A., & Miller, K. S. (1996). Glycosylation of native MHC class Ia molecules is required for recognition by allogeneic cytotoxic T lymphocytes. *Glycobiology*, *6*(4), 413-421. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8842705>
- Bahar Halpern, K., Veprik, A., Rubins, N., Naaman, O., & Walker, M. D. (2012). GPR41 Gene Expression Is Mediated by Internal Ribosome Entry Site (IRES)-dependent Translation of Bicistronic mRNA Encoding GPR40 and GPR41 Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(24), 20154-20163. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.358887>
- Baird, S. D., Lewis, S. M., Turcotte, M., & Holcik, M. (2007). A search for structurally similar cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Research*, *35*(14), 4664-4677. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm483>
- Baird, S. D., Turcotte, M., Korneluk, R. G., & Holcik, M. (2006). Searching for IRES. *Rna*, *12*(10), 1755-1785. <https://doi.org/10.1261/rna.157806>
- Barbosa, C., Peixeiro, I., & Romão, L. (2013). Gene Expression Regulation by Upstream Open Reading Frames and Human Disease. *PLoS Genetics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003529>
- Bassani-Sternberg, M., Bräunlein, E., Klar, R., Engleitner, T., Sinitcyn, P., Audehm, S., ... Krackhardt, A. M. (2016). Direct identification of clinically relevant neoepitopes presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry. *Nature Communications*, *7*, 13404. <https://doi.org/10.1038/ncomms13404>
- Bassani-Sternberg, M., & Coukos, G. (2016). Mass spectrometry-based antigen discovery for cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*, *41*, 9-17.

<https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.04.005>

- Bazzini, A. A., Johnstone, T. G., Christiano, R., Mackowiak, S. D., Obermayer, B., Fleming, E. S., ... Giraldez, A. J. (2014). Identification of small ORFs in vertebrates using ribosome footprinting and evolutionary conservation. *The EMBO Journal*, 33(9), 981-993. <https://doi.org/10.1002/embj.201488411>
- Beatty, G. L., & Vonderheide, R. H. (2008). Telomerase as a universal tumor antigen for cancer vaccines. *Expert review of vaccines*, 7(7), 881-7. <https://doi.org/10.1586/14760584.7.7.881>
- Bedogni, B., & Powell, M. B. (2009). Hypoxia, melanocytes and melanoma - Survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. *Pigment Cell and Melanoma Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00553.x>
- Berdasco, M., & Esteller, M. (2010). Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.005>
- Bertolotto, C., Lesueur, F., Giuliano, S., Strub, T., de Lichy, M., Bille, K., ... Bressac-de Paillerets, B. (2011). A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature*, 480(7375), 94-98. <https://doi.org/10.1038/nature10539>
- Bhan, A., Soleimani, M., & Mandal, S. S. (2017). Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. *Cancer Research*, 77(15), 3965-3981. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2634>
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432(7015), 332-337. <https://doi.org/10.1038/nature03096>
- Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., ... Koumenis, C. (2005). ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *The EMBO Journal*, 24(19), 3470-3481. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600777>
- Birney, E., Kumar, S., & Krainer, A. R. (1993). Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: Conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Research*, 21(25), 5803-5816. <https://doi.org/10.1093/nar/21.25.5803>
- Blais, J. D., Addison, C. L., Edge, R., Falls, T., Zhao, H., Wary, K., ... Bell, J. C. (2006). Perk-Dependent Translational Regulation Promotes Tumor Cell Adaptation and Angiogenesis in Response to Hypoxic Stress. *Molecular and Cellular Biology*, 26(24), 9517-9532. <https://doi.org/10.1128/MCB.01145-06>
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 611-622. <https://doi.org/10.1038/nrg1656>
- Bobinet, M., Vignard, V., Florenceau, L., Lang, F., Labbariere, N., & Moreau-Aubry, A. (2013). Overexpression of Meloe Gene in Melanomas Is Controlled Both by Specific Transcription Factors and Hypomethylation. *PLoS ONE*, 8(9), 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075421>
- Bobinet, M., Vignard, V., Rogel, A., Khammari, A., Dreno, B., Lang, F., & Labbariere, N. (2012). MELOE-1 Antigen Contains Multiple HLA Class II T Cell Epitopes Recognized by Th1 CD4+ T Cells from Melanoma Patients. *PLoS ONE*, 7(12), 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051716>
- Bocchia, M., Korontsvit, T., Xu, Q., Mackinnon, S., Yang, S. Y., Sette, A., & Scheinberg, D. A. (1996).

- Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood*, 87(9), 3587-92. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8611681>
- Boël, P., Wildmann, C., Sensi, M. L., Brasseur, R., Renauld, J. C., Coulie, P., ... van der Bruggen, P. (1995). BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity*, 2(2), 167-175. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(95\)80053-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(95)80053-0)
- Bonnal, S., Pileur, F., Orsini, C., Parker, F., Pujol, F., Prats, A. C., & Vagner, S. (2005). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel internal ribosome entry site trans-acting factor that modulates alternative initiation of translation of the fibroblast growth factor 2 mRNA. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4144-4153. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411492200>
- Boon, T., & Pel, A. (1989). T cell-recognized antigenic peptides derived from the cellular genome are not protein degradation products but can be generated directly by transcription and translation of short subgenic regions. A hypothesis. *Immunogenetics*, 29(2), 75-79. <https://doi.org/10.1007/BF00395854>
- Boyer, B., Bourgeois, Y., & Poupon, M.-F. (2002). Src kinase contributes to the metastatic spread of carcinoma cells. *Oncogene*, 21, 2347-2356. <https://doi.org/10.1038/sj/>
- Braasch, D. A., & Corey, D. R. (2001). Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chemistry & biology*, 8(1), 1-7. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11182314>
- Bradish, J. R., Montironi, R., Lopez-Beltran, A., Post, K. M., MacLennan, G. T., & Cheng, L. (2013). Towards personalized therapy for patients with malignant melanoma: molecular insights into the biology of BRAF mutations. *Future oncology (London, England)*, 9(2), 245-53. <https://doi.org/10.2217/fon.12.179>
- Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q. M., Hwu, W.-J., Topalian, S. L., Hwu, P., ... Wigginton, J. M. (2012). Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(26), 2455-2465. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200694>
- Branca, R. M. M., Orre, L. M., Johansson, H. J., Granholm, V., Huss, M., Pérez-Bercoff, Å., ... Lehtiö, J. (2013). HiRIEF LC-MS enables deep proteome coverage and unbiased proteogenomics. *Nature Methods*, 11(1), 59-62. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2732>
- Braunstein, S., Karpisheva, K., Pola, C., Goldberg, J., Hochman, T., Yee, H., ... Schneider, R. J. (2007). A Hypoxia-Controlled Cap-Dependent to Cap-Independent Translation Switch in Breast Cancer. *Molecular Cell*, 28(3), 501-512. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.019>
- Brent, M. R. (2005). Genome annotation past , present , and future : How to define an ORF at each locus Genome annotation past , present , and future : How to define an ORF at each locus. *Genome Research*, 15, 1777-1786. <https://doi.org/10.1101/gr.3866105>
- Bright, R. K., Bright, J. D., & Byrne, J. A. (2014). Overexpressed oncogenic tumor-self antigens New vaccine targets. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(11), 3297-3305. <https://doi.org/10.4161/hv.29475>
- Brubaker, S. W., Gauthier, A. E., Mills, E. W., Ingolia, N. T., & Kagan, J. C. (2014). A bicistronic MAVS transcript highlights a class of truncated variants in antiviral immunity. *Cell*, 156(4), 800-811. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.021>

- Burkhart, D. L., & Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer*, 8(9), 671-682. <https://doi.org/10.1038/nrc2399>
- Burotto, M., Chiou, V. L., Lee, J. M., & Kohn, E. C. (2014). The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. *Cancer*, 120(22), 3446-3456. <https://doi.org/10.1002/cncr.28864>
- Bushell, M., Wood, W., Carpenter, G., Pain, V. M., Morley, S. J., & Clemens, M. J. (2001). Disruption of the interaction of mammalian protein synthesis eukaryotic initiation factor 4B with the poly(A)-binding protein by caspase- and viral protease-mediated cleavages. *The Journal of biological chemistry*, 276(26), 23922-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100384200>
- Buxadé, M., Parra, J. L., Rousseau, S., Shpiro, N., Marquez, R., Morrice, N., ... Proud, C. G. (2005). The Mnks are novel components in the control of TNF α biosynthesis and phosphorylate and regulate hnRNP A1. *Immunity*, 23(2), 177-189. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.009>
- Buzyn, A., Ostankovitch, M., Zerbib, A., Kemula, M., Connan, F., Varet, B., ... Choppin, J. (1997). Peptides derived from the whole sequence of BCR-ABL bind to several class I molecules allowing specific induction of human cytotoxic T lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 27(8), 2066-2072. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270834>
- Cabrera-Quio, L. E., Herberg, S., & Pauli, A. (2016). Decoding sORF translation – from small proteins to gene regulation. *RNA Biology*. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1218589>
- Calviello, L., Mukherjee, N., Wyler, E., Zauber, H., Hirsekorn, A., Selbach, M., ... Ohler, U. (2015). Detecting actively translated open reading frames in ribosome profiling data. *Nature Methods*, 13(2), 165-170. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3688>
- Calvo, S. E., Pagliarini, D. J., & Mootha, V. K. (2009). Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(18), 7507-7512. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810916106>
- Cammas, A., Pileur, F., Bonnal, S., Lewis, S. M., Lévêque, N., Holcik, M., & Vagner, S. (2007). Cytoplasmic Relocalization of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 Controls Translation Initiation of Specific mRNAs. *Molecular biology of the cell*, 18(1), 5048-5059. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07>
- Carbonnelle, D., Vignard, V., Sehedic, D., Moreau-Aubry, A., Florenceau, L., Charpentier, M., ... Lang, F. (2013). The Melanoma Antigens MELOE-1 and MELOE-2 Are Translated from a Bona Fide Polycistronic mRNA Containing Functional IRES Sequences. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075233>
- Cardinaud, S., Starck, S. R., Chandra, P., & Shastri, N. (2010). The synthesis of truncated polypeptides for immune surveillance and viral evasion. *PLoS ONE*, 5(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008692>
- Carrieri, C., Cimatti, L., Biagioli, M., Beugnet, A., Zucchelli, S., Fedele, S., ... Gustincich, S. (2012). Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature*, 491(7424), 454-457. <https://doi.org/10.1038/nature11508>
- Cencig, S., Nanbru, C., Le, S.-Y., Gueydan, C., Huez, G., & Krays, V. (2004). Mapping and characterization of the minimal internal ribosome entry segment in the human c-myc mRNA 5' untranslated region. *Oncogene*, 23(1), 267-277. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207017>

- Cesana, M., Cacchiarelli, D., Legnini, I., Santini, T., Sthandier, O., Chinappi, M., ... Bozzoni, I. (2011). A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell*, *147*(2), 358-369. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.028>
- Chalopin, B., Florenceau, L., Fradin, D., Labarrière, N., & Moreau-Aubry, A. (2015). A lineage-specific methylation pattern controls the transcription of the polycistronic mRNA coding MELOE melanoma antigens. *Melanoma research*, *25*(4), 279-83. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000167>
- Chapman, J. R., Sheil, A. G. R., & Disney, A. P. S. (2001). Recurrence of cancer after renal transplantation. *Transplantation Proceedings*, *33*(1-2), 1830-1831. [https://doi.org/10.1016/S0041-1345\(00\)02698-1](https://doi.org/10.1016/S0041-1345(00)02698-1)
- Chaux, P., Luiten, R., Demotte, N., Vantomme, V., Stroobant, V., Traversari, C., ... van der Bruggen, P. (1999). Identification of five MAGE-A1 epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes obtained by in vitro stimulation with dendritic cells transduced with MAGE-A1. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *163*(5), 2928-2936. https://doi.org/ji_v163n5p2928 [pii]
- Chen, L., Yang, H., Xiao, Y., Tang, X., Li, Y., Han, Q., ... Zhu, Y. (2016). LncRNA GAS5 is a critical regulator of metastasis phenotype of melanoma cells and inhibits tumor growth in vivo. *OncoTargets and therapy*, *9*, 4075-87. <https://doi.org/10.2147/OTT.S98203>
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., & Moses, H. L. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Molecular cancer research : MCR*, *6*(10), 1521-33. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2203>
- Chew, G.-L., Pauli, A., Rinn, J. L., Regev, A., Schier, A. F., & Valen, E. (2013). Ribosome profiling reveals resemblance between long non-coding RNAs and 5' leaders of coding RNAs. *Development (Cambridge, England)*, *140*(13), 2828-34. <https://doi.org/10.1242/dev.098343>
- Chooniedass-Kothari, S., Emberley, E., Hamedani, M. K., Troup, S., Wang, X., Czosnek, A., ... Leygue, E. (2004). The steroid receptor RNA activator is the first functional RNA encoding a protein. *FEBS Letters*, *566*(1-3), 43-47. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.03.104>
- Cilensek, Z. M., Yehiely, F., Kular, R. K., & Deiss, L. P. (2002). A member of the GAGE family of tumor antigens is an anti-apoptotic gene that confers resistance to Fas/CD95/APO-1, interferon-g, taxol and g-irradiation. *Cancer Biology and Therapy*, *1*(4), 380-387. <https://doi.org/10.4161/cbt.1.4.12>
- Clark, M. B., Choudhary, A., Smith, M. A., Taft, R. J., & Mattick, J. S. (2013). The dark matter rises: the expanding world of regulatory RNAs. *Essays in biochemistry*, *54*(54), 1-16. <https://doi.org/10.1042/bse0540001>
- Clarke, H. J., Chambers, J. E., Liniker, E., & Marciniak, S. J. (2014). Endoplasmic Reticulum Stress in Malignancy. *Cancer Cell*, *25*(5), 563-573. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.03.015>
- Clemens, M. J. (2004). Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. *Oncogene*, *23*, 3180-3188. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207544>
- Clemente, C. G., Mihm, M. C., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., & Cascinelli, N. (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*, *77*(7), 1303-1310. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-)

- Cohen, C. J., Gartner, J. J., Horovitz-Fried, M., Shamalov, K., Trebska-McGowan, K., Bliskovsky, V. V., ... Robbins, P. F. (2015). Isolation of neoantigen-specific T cells from tumor and peripheral lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI82416>
- Cole, D. K., Yuan, F., Rizkallah, P. J., Miles, J. J., Gostick, E., Price, D. A., ... Sewell, A. K. (2009). Germ Line-governed Recognition of a Cancer Epitope by an Immunodominant Human T-cell Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 284(40), 27281-27289. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.022509>
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis*. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>
- Colussi, T. M., Costantino, D. A., Zhu, J., Donohue, J. P., Korostelev, A. A., Jaafar, Z. A., ... Kieft, J. S. (2015). Initiation of translation in bacteria by a structured eukaryotic IRES RNA. *Nature*, 519(7541), 110-113. <https://doi.org/10.1038/nature14219>
- Conte, C., Ainaoui, N., Delluc-Clavières, A., Khoury, M. P., Azar, R., Pujol, F., ... Prats, A. C. (2009). Fibroblast growth factor 1 induced during myogenesis by a transcription-translation coupling mechanism. *Nucleic Acids Research*, 37(16), 5267-5278. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp550>
- Cordaux, R., & Batzer, M. A. (2009). The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature Reviews Genetics*, 10(10), 691-703. <https://doi.org/10.1038/nrg2640>
- Coulie, P. G., Brichard, V., Van Pel, A., Wölfel, T., Schneider, J., Traversari, C., ... Boon, T. (1994). A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *The Journal of experimental medicine*, 180(1), 35-42. <https://doi.org/10.1084/jem.180.1.35>
- Coulie, P. G., Lehmann, F., Lethé, B., Herman, J., Lurquin, C., Andrawiss, M., & Boon, T. (1995). A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17), 7976-80. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.7976>
- Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P., & Boon, T. (2014a). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 14(2), 135-146. <https://doi.org/10.1038/nrc3670>
- Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P., & Boon, T. (2014b). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 14(2), 135-46. <https://doi.org/10.1038/nrc3670>
- Covington, D. K., Briscoe, C. A., Brown, A. J., & Jayawickreme, C. K. (2006). The G-protein-coupled receptor 40 family (GPR40–GPR43) and its role in nutrient sensing. *Biochemical Society Transactions*, 34(5), 770-773. <https://doi.org/10.1042/BST0340770>
- Cronin, J. C., Wunderlich, J., Loftus, S. K., Prickett, T. D., Wei, X., Ridd, K., ... Samuels, Y. (2009). Frequent mutations in the MITF pathway in melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 22(4), 435-444. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00578.x>
- Cubillos-Ruiz, J. R., Bettigole, S. E., & Glimcher, L. H. (2017). Tumorigenic and Immunosuppressive

Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer. *Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.004>

Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., ... Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949-954.
<https://doi.org/10.1038/nature00766>

Davies, M. a. (2012). The Role of the PI3K-AKT Pathway in Melanoma. *The Cancer Journal*, 18(2), 142-147. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e31824d448c>

Davies, M. A., & Samuels, Y. (2010). Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*, 29(41), 5545-5555. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.323>

de Andres-Pablo, A., Morillon, A., & Wery, M. (2017). LncRNAs, lost in translation or licence to regulate? *Current Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0615-1>

De Backer, O., Arden, K. C., Boretti, M., Vantomme, V., De Smet, C., Czekay, S., ... Van Der Bruggen, P. (1999). Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Research*, 59(13), 3157-3165. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19970127\)70:3<349::aid-ijc17>3.0.co](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19970127)70:3<349::aid-ijc17>3.0.co)

De Benedetti, A., & Graff, J. R. (2004). eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene*, 23(18), 3189-3199. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207545>

De Plaen, E., Traversari, C., Gaforio, J. J., Szikora, J. P., De Smet, C., Brasseur, F., ... Brasseur, R. (1994). Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*, 40(5), 360-369. <https://doi.org/10.1007/BF01246677>

De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F., & Boon, T. (1996). The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(14), 7149-53. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8692960>

De Toni, E. N., Kuntzen, C., Gerbes, A. L., Thasler, W. E., Sonuc, N., Mucha, S. R., ... Eichhorst, S. T. (2007). P60-c-src suppresses apoptosis through inhibition of caspase 8 activation in hepatoma cells, but not in primary hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 46(4), 682-691. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.10.010>

DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., & Thompson, C. B. (2008). The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>

DeNardo, D. G., Andreu, P., & Coussens, L. M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(2), 309-316. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9223-6>

Denmeade, S. R., Mhaka, A. M., Rosen, D. M., Brennen, W. N., Dalrymple, S., Dach, I., ... Isaacs, J. T. (2012). Engineering a Prostate-Specific Membrane Antigen-Activated Tumor Endothelial Cell Prodrug for Cancer Therapy. *Science Translational Medicine*, 4(140), 140ra86-140ra86. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003886>

Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., & Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nature immunology*, 2(11), 1032-9.

<https://doi.org/10.1038/ni723>

- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., ... Guigó, R. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Research*, 22(9), 1775-1789. <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>
- Dever, T. E., Feng, L., Wek, R. C., Cigan, A. M., Donahue, T. F., & Hinnebusch, A. G. (1992). Phosphorylation of initiation factor 2 α by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell*, 68(3), 585-596. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90193-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90193-G)
- Dever, T. E., & Green, R. (2012). The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(7), 1-16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013706>
- Diederichs, S. (2014). The four dimensions of noncoding RNA conservation. *Trends in Genetics*, 30(4), 121-123. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.01.004>
- Dobbyn, H. C., Hill, K., Hamilton, T. L., Spriggs, K. A., Pickering, B. M., Coldwell, M. J., ... Willis, A. E. (2008). Regulation of BAG-1 IRES-mediated translation following chemotoxic stress. *Oncogene*, 27(8), 1167-1174. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210723>
- Dreyfuss, G., Kim, V. N., Kataoka, N., & Medical, H. H. (2002). Messenger-Rna-Binding Proteins and the Messages They Carry, 3(March). <https://doi.org/10.1038/nrm760>
- Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Piiol-roma, S., & Burd, C. G. (1993). hnRNP PROTEINS AND THE BIOGENESIS OF mRNA, 289-321.
- Du, J., Miller, A. J., Widlund, H. R., Horstmann, M. A., Ramaswamy, S., & Fisher, D. E. (2003). MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *The American journal of pathology*, 163(1), 333-43. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63657-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63657-7)
- Du, J., Widlund, H. R., Horstmann, M. A., Ramaswamy, S., Ross, K., Huber, W. E., ... Fisher, D. E. (2004). Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer cell*, 6(6), 565-76. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.10.014>
- Du, T. (2005). microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, 132(21), 4645-4652. <https://doi.org/10.1242/dev.02070>
- Du, X., Wang, J., Zhu, H., Rinaldo, L., Lamar, K.-M., Palmenberg, A. C., ... Gomez, C. M. (2013). Second Cistron in CACNA1A Gene Encodes a Transcription Factor Mediating Cerebellar Development and SCA6. *Cell*, 154(1), 118-133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.059>
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). THE THREE ES OF CANCER IMMUNOEDITING. *Annu. Rev. Immunol*, 22, 329-60. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>
- Dvorak, H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine*, 315(26), 1650-9. <https://doi.org/10.1056/NEJM198612253152606>

- Edfalk, S., Steneberg, P., & Edlund, H. (2008). Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes*, 57(9), 2280-2287. <https://doi.org/10.2337/db08-0307>
- Eggermont, A. M. M., Spatz, A., & Robert, C. (2014). Cutaneous melanoma. *The Lancet*, 383(9919), 816-827. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60802-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60802-8)
- Elder, D. E. (2006). Precursors to melanoma and their mimics: nevi of special sites. *Modern pathology*, 19 Suppl 2, S4-S20. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800515>
- Engels, B., Engelhard, V. H., Sidney, J., Sette, A., Binder, D. C., Liu, R. B., ... Schreiber, H. (2013). Relapse or eradication of cancer is predicted by peptide-major histocompatibility complex affinity. *Cancer Cell*, 23(4), 516-526. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.03.018>
- Erdag, G., Schaefer, J. T., Smolkin, M. E., Deacon, D. H., Shea, S. M., Dengel, L. T., ... Slingluff, C. L. (2012). Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. *Cancer Research*, 72(5), 1070-1080. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3218>
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics*, 8(4), 286-298. <https://doi.org/10.1038/nrg2005>
- Evans, J. R., Feng, F. Y., & Chinnaiyan, A. M. (2016, août 1). The bright side of dark matter: LncRNAs in cancer. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI84421>
- Evans, J. R., Mitchell, S. a, Spriggs, K. a, Ostrowski, J., Bomsztyk, K., Ostarek, D., & Willis, A. E. (2003). Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo. *Oncogene*, 22(39), 8012-8020. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206645>
- Faghihi, M. A., Zhang, M., Huang, J., Modarresi, F., Van der Brug, M. P., Nalls, M. A., ... Wahlestedt, C. (2010). Evidence for natural antisense transcript-mediated inhibition of microRNA function. *Genome biology*, 11(5), R56. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-5-r56>
- Fan, S., Ramalingam, S. S., Kauh, J., Xu, Z., Khuri, F. R., & Sun, S.-Y. (2009). Phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4 (eIF4E) is elevated in human cancer tissues. *Cancer biology & therapy*, 8(15), 1463-9. <https://doi.org/10.1115/1.3071969>.Automating
- Faye, M. D., & Holcik, M. (2015). The role of IRES trans-acting factors in carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(7), 887-897. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.09.012>
- Feoktistova, K., Tuvshintogs, E., Do, A., & Fraser, C. S. (2013). Human eIF4E promotes mRNA restructuring by stimulating eIF4A helicase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(33), 13339-13344. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303781110>
- Ferreira, P. G., Jares, P., Rico, D., Gomez-Lopez, G., Martinez-Trillos, A., Villamor, N., ... Guigo, R. (2014). Transcriptome characterization by RNA sequencing identifies a major molecular and clinical subdivision in chronic lymphocytic leukemia. *Genome Research*, 24(2), 212-226. <https://doi.org/10.1101/gr.152132.112>
- Fidler, I. J., Weinberg, R. A., Fidler, I. J., Joyce, J. A., Pollard, J. W., Hanahan, D., ... Creighton, C. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the « seed and soil » hypothesis revisited.

Nature reviews. Cancer, 3(6), 453-8. <https://doi.org/10.1038/nrc1098>

- Fields, A. P., Rodriguez, E. H., Jovanovic, M., Stern-Ginossar, N., Haas, B. J., Mertins, P., ... Weissman, J. S. (2015). A Regression-Based Analysis of Ribosome-Profiling Data Reveals a Conserved Complexity to Mammalian Translation. *Molecular Cell*, 60(5), 816-827. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.11.013>
- Filbin, M. E., & Kieft, J. S. (2009). Toward a structural understanding of IRES RNA function. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(3), 267-276. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.03.005>
- Fingar, D. C., & Blenis, J. (2004). Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*, 23(18), 3151-3171. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207542>
- Fingar, D. C., Richardson, C. J., Tee, A. R., Cheatham, L., Tsou, C., & Blenis, J. (2004). mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular and Cellular Biology*, 24(1), 200-216. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.1.200>
- Fingar, D. C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E., & Blenis, J. (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes and Development*, 16(12), 1472-1487. <https://doi.org/10.1101/gad.995802>
- Fitzgerald, K. D., & Semler, B. L. (2009). Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1789(9-10), 518-528. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.07.004>
- Flockhart, R. J., Webster, D. E., Qu, K., Mascarenhas, N., Kovalski, J., Kretz, M., & Khavari, P. A. (2012). BRAFV600E remodels the melanocyte transcriptome and induces BANC1 to regulate melanoma cell migration. *Genome Research*, 22(6), 1006-1014. <https://doi.org/10.1101/gr.140061.112>
- Flynn, A., & Proud, C. G. (1995). Serine 209, not serine 53, is the major site of phosphorylation in initiation factor eIF-4E in serum-treated Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry*, 270(37), 21684-21688. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.37.21684>
- Fogal, V., Richardson, A. D., Karmali, P. P., Scheffler, I. E., Smith, J. W., & Ruoslahti, E. (2010). Mitochondrial p32 Protein Is a Critical Regulator of Tumor Metabolism via Maintenance of Oxidative Phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 30(6), 1303-1318. <https://doi.org/10.1128/MCB.01101-09>
- Fogal, V., Zhang, L., Krajewski, S., & Ruoslahti, E. (2008). Mitochondrial/cell-surface protein p32/gC1qR as a molecular target in tumor cells and tumor stroma. *Cancer Research*, 68(17), 7210-7218. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6752>
- Fortier, M.-H., Caron, É., Hardy, M.-P., Voisin, G., Lemieux, S., Perreault, C., & Thibault, P. (2008). The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(3), 595-610. <https://doi.org/10.1084/jem.20071985>
- Foulds, L. (1954). The Experimental Study of Tumor Progression: A Review. *Cancer Research*, 14(5), 327-339. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13160960>
- Frith, M. C., Forrest, A. R., Nourbakhsh, E., Pang, K. C., Kai, C., Kawai, J., ... Grimmond, S. M. (2006). The abundance of short proteins in the mammalian proteome. *PLoS Genetics*, 2(4), 515-528.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020052>

- Frith, M. C., Pheasant, M., & Mattick, J. S. (2005). The amazing complexity of the human transcriptome. *European journal of human genetics: EJHG*, 13(8), 894-7. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201459>
- Furic, L., Rong, L., Larsson, O., Koumakpayi, I. H., Yoshida, K., Brueschke, A., ... Sonenberg, N. (2010). eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 14134-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005320107>
- Gaccioli, F., Huang, C. C., Wang, C., Bevilacqua, E., Franchi-Gazzola, R., Gazzola, G. C., ... Hatzoglou, M. (2006). Amino acid starvation induces the SNAT2 neutral amino acid transporter by a mechanism that involves eukaryotic initiation factor 2?? phosphorylation and cap-independent translation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(26), 17929-17940. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600341200>
- Galindo, M. I., Pueyo, J. I., Fouix, S., Bishop, S. A., & Couso, J. P. (2007). Peptides Encoded by Short ORFs Control Development and Define a New Eukaryotic Gene Family. *PLoS Biology*, 5(5), e106. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050106>
- Gallegos, A. M., & Bevan, M. J. (2006). Central tolerance: Good but imperfect. *Immunological Reviews*, 209, 290-296. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00348.x>
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., ... Pagès, F. (2006). Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science*, 313(5795), 1960-1964. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>
- Gao, G., Dhar, S., & Bedford, M. T. (2017). PRMT5 regulates IRES-dependent translation via methylation of hnRNP A1. *Nucleic Acids Research*, 45(10), 4359-4369. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1367>
- Garraway, L. A., & Lander, E. S. (2013). Lessons from the cancer genome. *Cell*, 153(1), 17-37. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.002>
- Garraway, L. A., Widlund, H. R., Rubin, M. A., Getz, G., Berger, A. J., Ramaswamy, S., ... Sellers, W. R. (2005a). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*, 436(7047), 117-122. <https://doi.org/10.1038/nature03664>
- Garraway, L. A., Widlund, H. R., Rubin, M. A., Getz, G., Berger, A. J., Ramaswamy, S., ... Sellers, W. R. (2005b). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*, 436(7047), 117-22. <https://doi.org/10.1038/nature03664>
- Gattinoni, L., Powell, D. J., Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nature reviews. Immunology*, 6(5), 383-93. <https://doi.org/10.1038/nri1842>
- Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., ... Swanton, C. (2012). Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *New England Journal of Medicine*, 366(10), 883-892. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113205>
- Gesteland, R. F., & Atkins, J. F. (1996). Recoding: Dynamic Reprogramming of Translation. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), 741-768. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.003521>

- Gilboa, E. (1999). The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity*. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80101-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80101-6)
- Gingras, A. C., Raught, B., Gygi, S. P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S. K., ... Sonenberg, N. (2001). Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes and Development*, *15*(21), 2852-2864. <https://doi.org/10.1101/gad.912401>
- Gjerstorff, M. F., Andersen, M. H., & Ditzel, H. J. (2015). Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy. *Oncotarget*, *6*(18), 15772-15787. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4694>
- Godefroy, E., Moreau-Aubry, A., Diez, E., Dreno, B., Jotereau, F., & Guilloux, Y. (2005). alpha v beta3-dependent cross-presentation of matrix metalloproteinase-2 by melanoma cells gives rise to a new tumor antigen. *The Journal of experimental medicine*, *202*(1), 61-72. <https://doi.org/jem.20042138> [pii]\r10.1084/jem.20042138
- Godet, Y., Desfrançois, J., Vignard, V., Schadendorf, D., Khammari, A., Dreno, B., ... Labarrière, N. (2010). Frequent occurrence of high affinity T cells against MELOE-1 makes this antigen an attractive target for melanoma immunotherapy. *European Journal of Immunology*, *40*(6), 1786-1794. <https://doi.org/10.1002/eji.200940132>
- Godet, Y., Fabre, E., Dosset, M., Lamuraglia, M., Levionnois, E., Ravel, P., ... Adotévi, O. (2012). Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T-cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes: Potential synergistic effect with chemotherapy response. *Clinical Cancer Research*, *18*(10), 2943-2953. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3185>
- Godet, Y., Moreau-Aubry, A., Guilloux, Y., Vignard, V., Khammari, A., Dreno, B., ... Labarriere, N. (2008). MELOE-1 is a new antigen overexpressed in melanomas and involved in adoptive T cell transfer efficiency. *The Journal of experimental medicine*, *205*(11), 2673-2682. <https://doi.org/10.1084/jem.20081356>
- Godet, Y., Moreau-Aubry, A., Mompelat, D., Vignard, V., Khammari, A., Dreno, B., ... Labarriere, N. (2010). An additional ORF on meloe cDNA encodes a new melanoma antigen, MELOE-2, recognized by melanoma-specific T cells in the HLA-A2 context. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *59*(3), 431-439. <https://doi.org/10.1007/s00262-009-0762-z>
- Goding, C. R. (2016). Targeting the lncRNA SAMMSON Reveals Metabolic Vulnerability in Melanoma. *Cancer Cell*, *29*(5), 619-621. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.04.010>
- Goedert, L., Pereira, C. G., Roszik, J., Placa, J. R., Cardoso, C., Chen, G., ... Espreafico, E. M. (2016). RMEL3, a novel BRAFV600E-associated long noncoding RNA, is required for MAPK and PI3K signaling in melanoma. *Oncotarget*, *7*(24), 36711-36718. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9164>
- Goel, V. K., Lazar, A. J. F., Warneke, C. L., Redston, M. S., & Haluska, F. G. (2006). Examination of Mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in Primary Cutaneous Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, *126*(1), 154-160. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700026>
- Golovko, A., Kojukhov, A., Guan, B. J., Morpurgo, B., Merrick, W. C., Mazumder, B., ... Komar, A. A. (2016). The eIF2A knockout mouse. *Cell Cycle*, *15*(22), 3115-3120. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1237324>
- Gonzalez-Herrera, I. G., Prado-Lourenco, L., Pileur, F., Conte, C., Morin, A., Cabon, F., ... Prats, A.-C.

- (2006). Testosterone regulates FGF-2 expression during testis maturation by an IRES-dependent translational mechanism. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(3), 476-478. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3314fje>
- Graf, C., Heidel, F., Tenzer, S., Radsak, M. P., Solem, F. K., Britten, C. M., ... Wölfel, T. (2007). A neoepitope generated by an FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) is recognized by leukemia-reactive autologous CD8+ T cells. *Blood*, 109(7), 2985-2988. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-032839>
- Graff, J. R., Konicek, B. W., Carter, J. H., & Marcusson, E. G. (2008). Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5635>
- Granados, D. P., Tanguay, P.-L., Hardy, M.-P., Caron, É., de Verteuil, D., Meloche, S., & Perreault, C. (2009). ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides. *BMC Immunology*, 10(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-10-10>
- Gray, T. A., Saitoh, S., & Nicholls, R. D. (1999). An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5616-5621. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5616>
- Greaves, M. (2015). Evolutionary determinants of cancer. *Cancer Discovery*, 5(8), 806-821. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0439>
- Greaves, M., & Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306-313. <https://doi.org/10.1038/nature10762>
- Greene, V. R., Johnson, M. M., Grimm, E. A., & Ellerhorst, J. A. (2009). Frequencies of NRAS and BRAF mutations increase from the radial to the vertical growth phase in cutaneous melanoma. *The Journal of investigative dermatology*, 129(6), 1483-8. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.374>
- Greenman, C., Stephens, P. R., Bignell, G., Birney, E., Stratton, M. R., Smith, R. M., ... Futreal, P. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 446(7132), 153-158. <https://doi.org/10.1038/nature05610>
- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1996). Telomeres, Telomerase and Cancer. *Sci. Am.*, 274(2), 92-97. <https://doi.org/10.1056/nejm200004273421710>
- Grimaldi, A., Zarone, M. R., Irace, C., Zappavigna, S., Lombardi, A., Kawasaki, H., ... Misso, G. (2017). Non-coding RNAs as a new dawn in tumor diagnosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.035>
- Grivnenkov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Gros, A., Parkhurst, M. R., Tran, E., Pasetto, A., Robbins, P. F., Ilyas, S., ... Rosenberg, S. A. (2016). Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. *Nature Medicine*, 22(4), 433-438. <https://doi.org/10.1038/nm.4051>
- Grover, R., Ray, P. S., & Das, S. (2008). Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated translation of p53 isoforms. *Cell Cycle*, 7(14), 2189-2198. <https://doi.org/10.4161/cc.7.14.6271>
- Gulich, A. E., van Leeuwen, M. T., Falster, M. O., & Vajdic, C. M. (2007). Incidence of cancers in

- people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet*, 370(9581), 59-67. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61050-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61050-2)
- Grunau, C., Sanchez, C., Ehrlich, M., van der Bruggen, P., Hindermann, W., Rodriguez, C., ... De Sario, A. (2005). Frequent DNA hypomethylation of human juxtacentromeric BAGE loci in cancer. *Genes, chromosomes & cancer*, 43(1), 11-24. <https://doi.org/10.1002/gcc.20155>
- Guil, S., Long, J. C., & Cáceres, J. F. (2006). hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Molecular and cellular biology*, 26(15), 5744-58. <https://doi.org/10.1128/MCB.00224-06>
- Guilloux, Y., Lucas, S., Brichard, V. G., Van Pel, A., Viret, C., De Plaen, E., ... Boon, T. (1996). A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *The Journal of experimental medicine*, 183(3), 1173-1183. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1173>
- Guo, J. Y., & White, E. (2016). Autophagy, Metabolism, and Cancer. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 81(22), 73-78. <https://doi.org/10.1101/sqb.2016.81.030981>
- Guo, L., Yao, L., & Jiang, Y. (2016). A novel integrative approach to identify lncRNAs associated with the survival of melanoma patients. *Gene*, 585(2), 216-220. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.03.036>
- Gure, A. O., Türeci, Ö., Sahin, U., Tsang, S., Scanlan, M. J., Jäger, E., ... Chen, Y. T. (1997). SSX: A multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *International Journal of Cancer*, 72(6), 965-971. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970917\)72:6<965::AID-IJC8>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970917)72:6<965::AID-IJC8>3.0.CO;2-N)
- Gutschner, T., & Diederichs, S. (2012). The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA biology*, 9(6), 703-719. <https://doi.org/10.4161/rna.20481>
- Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M. F., Feldser, D., ... Lander, E. S. (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*, 458(7235), 223-7. <https://doi.org/10.1038/nature07672>
- Guttman, M., & Rinn, J. L. (2012). Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature*, 482(7385), 339-346. <https://doi.org/10.1038/nature10887>
- Guttman, M., Russell, P., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., & Lander, E. S. (2013). Ribosome profiling provides evidence that large noncoding RNAs do not encode proteins. *Cell*, 154(1), 240-251. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.009>
- Haas, G. G., D'Cruz, O. J., & De Bault, L. E. (1988). Distribution of human leukocyte antigen-ABC and -D/DR antigens in the unfixed human testis. *American journal of reproductive immunology and microbiology : AJRIM*, 18(2), 47-51. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2467568>
- Hackett, J. A., & Greider, C. W. (2002). Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene*, 21(4), 619-626. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205061>
- Han, S. P., Tang, Y. H., & Smith, R. (2010). Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *The Biochemical journal*, 430(3), 379-392. <https://doi.org/10.1042/BJ20100396>

- Hanada, K., Zhang, X., Borevitz, J. O., Li, W. H., & Shiu, S. H. (2007). A large number of novel coding small open reading frames in the intergenic regions of the Arabidopsis thaliana genome are transcribed and/or under purifying selection. *Genome Research*, 17(5), 632-640. <https://doi.org/10.1101/gr.5836207>
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80108-7)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hardee, M. E., Dewhirst, M. W., Agarwal, N., & Sorg, B. S. (2009). Novel imaging provides new insights into mechanisms of oxygen transport in tumors. *Current molecular medicine*, 9(4), 435-441. <https://doi.org/10.2174/156652409788167122>
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., & Ron, D. (2000). Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Molecular Cell*, 6(5), 1099-1108. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00108-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00108-8)
- Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., & Ron, D. (2000). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Molecular Cell*, 5(5), 897-904. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80330-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80330-5)
- Harley, C. B. (2008). Telomerase and cancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 8(3), 167-179. <https://doi.org/10.1038/nrc2275>
- Harris, M. L., Baxter, L. L., Loftus, S. K., & Pavan, W. J. (2010). Sox proteins in melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00711.x>
- Harrow, J., Frankish, A., Gonzalez, J. M., Tapanari, E., Diekhans, M., Kokocinski, F., ... Hubbard, T. J. (2012). GENCODE: The reference human genome annotation for the ENCODE project. *Genome Research*, 22(9), 1760-1774. <https://doi.org/10.1101/gr.135350.111>
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585-621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Hayward, N. K., Wilmott, J. S., Waddell, N., Johansson, P. A., Field, M. A., Nones, K., ... Mann, G. J. (2017). Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature*, 545(7653), 175-180. <https://doi.org/10.1038/nature22071>
- He, Y., & Smith, R. (2009). Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8532-1>
- Heemskerk, B., Kvistborg, P., & Schumacher, T. N. M. (2012). The cancer antigenome. *The EMBO Journal*, 32(2), 194-203. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.333>
- Hellen, C. U. T., & Sarnow, P. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes and Development*, 15, 1593-1612. <https://doi.org/doi/10.1101/gad.891101>

- Hers, I., Vincent, E. E., & Tavaré, J. M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cellular Signalling*. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.004>
- Hershey, J. W. B., Sonenberg, N., & Mathews, M. B. (2012). Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(12), a011528-. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011528>
- Hezroni, H., Koppstein, D., Schwartz, M. G., Avrutin, A., Bartel, D. P., & Ulitsky, I. (2015). Principles of Long Noncoding RNA Evolution Derived from Direct Comparison of Transcriptomes in 17 Species. *Cell Reports*, 11(7), 1110-1122. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.023>
- Hinnebusch, A. G. (2014). The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annual review of biochemistry*, 83(January), 779-812. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035802>
- Hodgkinson, C. A., Moore, K. J., Nakayama, A., Steingrímsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Arnheiter, H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*, 74(2), 395-404. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90429-T](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90429-T)
- Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V, Arold, S. T., Imielinski, M., Theurillat, J. P., ... Chin, L. (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*, 150(2), 251-263. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.024>
- Hoek, K. S., Schlegel, N. C., Eichhoff, O. M., Widmer, D. S., Praetorius, C., Einarsson, S. O., ... Steingrímsson, E. (2008). Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy. *Pigment cell & melanoma research*, 21(6), 665-76. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2008.00505.x>
- Hoffman, D. W., Query, C. C., Golden, B. L., White, S. W., & Keene, J. D. (1991). Rna-Binding Domain of the a-Protein Component of the U1 Small Nuclear Ribonucleoprotein Analyzed by Nmr-Spectroscopy Is Structurally Similar to Ribosomal-Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6), 2495-2499. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2495>
- Hofmann, O., Caballero, O. L., Stevenson, B. J., Chen, Y.-T., Cohen, T., Chua, R., ... Hide, W. (2008). Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), 20422-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810777105>
- Holcık, M. (2015). Could the eIF2 α -Independent Translation Be the Achilles Heel of Cancer? *Frontiers in oncology*, 5(November), 264. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00264>
- Holcık, M. (2004). Targeting translation for treatment of cancer--a novel role for IRES? *Current cancer drug targets*, 4, 299-311. <https://doi.org/10.2174/1568009043333005>
- Holcık, M., Gordon, B. W., & Korneluk, R. G. (2003). The Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation of Antiapoptotic Protein XIAP Is Modulated by the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins C1 and C2. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 23(1), 280-288. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.1.280-288.2003>
- Holcık, M., & Korneluk, R. G. (2000). Functional characterization of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: role of La autoantigen in XIAP translation.

- Molecular and cellular biology*, 20(13), 4648-57. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10848591>
- Holcik, M., & Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(4), 318-27. <https://doi.org/10.1038/nrm1618>
- Holcik, M., Yeh, C., Korneluk, R. G., & Chow, T. (2000). Translational upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) increases resistance to radiation induced cell death. *Oncogene*, 19(36), 4174-4177. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203765>
- Hon, C.-C., Ramilowski, J. A., Harshbarger, J., Bertin, N., Rackham, O. J. L., Gough, J., ... Forrest, A. R. (2017). An atlas of human long non-coding RNAs with accurate 5' ends. *Nature*, 543(7644), 199-204. <https://doi.org/10.1038/nature21374>
- Hong, J.-J., Wu, T.-Y., Chang, T.-Y., & Chen, C.-Y. (2013). Viral IRES Prediction System - a Web Server for Prediction of the IRES Secondary Structure In Silico. *PLoS ONE*, 8(11), e79288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079288>
- Hsieh, A. C., & Ruggero, D. (2010). Targeting eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in cancer. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0433>
- Hsu, P. P., & Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134(5), 703-707. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.021>
- Huang, J., El-Gamil, M., Dudley, M. E., Li, Y. F., Rosenberg, S. A., & Robbins, P. F. (2004). T cells associated with tumor regression recognize frameshifted products of the CDKN2A tumor suppressor gene locus and a mutated HLA class I gene product. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(10), 6057-64. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15128789>
- Hudson, T. J., Anderson, W., Aretz, A., Barker, A. D., Bell, C., Bernabé, R. R., ... Yang, H. (2010). International network of cancer genome projects. *Nature*, 464(7291), 993-998. <https://doi.org/10.1038/nature08987>
- Hui, D., Kumar, K. N., Mach, J. R., Srinivasan, A., Pal, R., Bao, X., ... Michaelis, E. K. (2009). A rat brain bicistronic gene with an internal ribosome entry site codes for a phencyclidine-binding protein with cytotoxic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 284(4), 2245-2257. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807063200>
- Huijbers, I. J., Soudja, S. M., Uyttenhove, C., Buferne, M., Inderberg-Suso, E.-M., Colau, D., ... Van den Eynde, B. J. (2012). Minimal Tolerance to a Tumor Antigen Encoded by a Cancer-Germline Gene. *The Journal of Immunology*, 188(1), 111-121. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002612>
- Idriss, H., Kumar, A., Wilson, S. H., Casas-Finet, J. R., Guo, H., & Damuni, Z. (1994). Regulation of in Vitro Nucleic Acid Strand Annealing Activity of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein Protein A1 by Reversible Phosphorylation. *Biochemistry*, 33(37), 11382-11390. <https://doi.org/10.1021/bi00203a037>
- Ingolia, N. T., Brar, G. A., Rouskin, S., Mcgeachy, A. M., & Weissman, J. S. (2013). Genome-wide Annotation and Quantitation of Translation by Ribosome Profiling. *Current Protocols in Molecular Biology*, 4(4,18), 1-22. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0418s103>. Genome-wide

- Ingolia, N. T., Brar, G. A., Stern-Ginossar, N., Harris, M. S., Talhouarne, G. J. S., Jackson, S. E., ... Weissman, J. S. (2014). Ribosome Profiling Reveals Pervasive Translation Outside of Annotated Protein-Coding Genes. *Cell Reports*, 8(5), 1365-1379. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.045>
- Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S., & Weissman, J. S. (2009). Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5924), 218-23. <https://doi.org/10.1126/science.1168978>
- Ingolia, N. T., Lareau, L. F., & Weissman, J. S. (2011). Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell*, 147(4), 789-802. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.002>
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(2), 113-127. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2010). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071-1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>.The
- Jan, E., & Sarnow, P. (2002). Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *Journal of molecular biology*, 324(5), 889-902. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470947>
- Jean-Philippe, J., Paz, S., & Caputi, M. (2013). hnRNP A1: The Swiss Army Knife of gene expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18999-19024. <https://doi.org/10.3390/ijms140918999>
- Ji, B., Harris, B. R. E., Liu, Y., Deng, Y., Gradilone, S. A., Cleary, M. P., ... Yang, D. Q. (2017). Targeting IRES-mediated p53 synthesis for cancer diagnosis and therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms18010093>
- Jo, O. D., Martin, J., Bernath, A., Masri, J., Lichtenstein, A., & Gera, J. (2008). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 regulates cyclin D1 and c-myc internal ribosome entry site function through Akt signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 283(34), 23274-23287. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801185200>
- Johannes, G., Carter, M. S., Eisen, M. B., Brown, P. O., & Sarnow, P. (1999). Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(23), 13118-23. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.23.13118>
- Johnson, L. A., Morgan, R. A., Dudley, M. E., Cassard, L., Yang, J. C., Hughes, M. S., ... Rosenberg, S. A. (2009). Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*, 114(3), 535-546. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-211714>
- Johnson, R., & Guigo, R. (2014). The RIDL hypothesis: transposable elements as functional domains of long noncoding RNAs. *RNA*, 20(7), 959-976. <https://doi.org/10.1261/rna.044560.114>
- Johnstone, T. G., Bazzini, A. A., & Giraldez, A. J. (2016). Upstream ORFs are prevalent translational repressors in vertebrates. *The EMBO Journal*, 35(7), 706-723. <https://doi.org/10.15252/embj.201592759>

- Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: A recipe for cancer growth. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1756509>
- Joshi, B., Cai, A. L., Keiper, B. D., Minich, W. B., Mendez, R., Beach, C. M., ... Rhoads, R. E. (1995). Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Ser-209. *The Journal of biological chemistry*, *270*(24), 14597-603. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7782323>
- Kageyama, S., Tsomides, T. J., Sykulev, Y., & Eisen, H. N. (1995). Variations in the number of peptide-MHC class I complexes required to activate cytotoxic T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *154*(2), 567-76. Consulté à l'adresse <http://www.jimmunol.org/content/154/2/567.abstract>
- Kalialis, L. V., Drzewiecki, K. T., Mohammadi, M., Mehlsen, A.-B., & Klyver, H. (2008). Spontaneous regression of metastases from malignant melanoma: a case report. *Melanoma research*, *18*(4), 279-283. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e328307ee4c>
- Kanamori, Y., & Nakashima, N. (2001). A tertiary structure model of the internal ribosome entry site (IRES) for methionine-independent initiation of translation. *RNA (New York, N.Y.)*, *7*(2), 266-274. <https://doi.org/10.1017/S1355838201001741>
- Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., & Lu, C. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, *503*(7471), 333-339. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Kapusta, A., Kronenberg, Z., Lynch, V. J., Zhuo, X., Ramsay, L., Bourque, G., ... Feschotte, C. (2013). Transposable Elements Are Major Contributors to the Origin, Diversification, and Regulation of Vertebrate Long Noncoding RNAs. *PLoS Genetics*, *9*(4), e1003470. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003470>
- Karginov, T. A., Pastor, D. P. H., Semler, B. L., & Gomez, C. M. (2017). Mammalian Polycistronic mRNAs and Disease. *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.11.007>
- Kastan, M. B. (2008). DNA Damage Responses: Mechanisms and Roles in Human Disease: 2007 G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Molecular Cancer Research*, *6*(4), 517-524. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0020>
- Kastenhuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell*, *170*(6), 1062-1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C. H., Robbins, P. F., Rivoltini, L., Topalian, S. L., ... Rosenberg, S. A. (1994). Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(9), 3515-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.9.3515>
- Kawashima, H., Takano, H., Sugita, S., Takahara, Y., Sugimura, K., & Nakatani, T. (2003). A novel steroid receptor co-activator protein (SRAP) as an alternative form of steroid receptor RNA-activator gene: expression in prostate cancer cells and enhancement of androgen receptor activity. *The Biochemical journal*, *369*, 163-71. <https://doi.org/10.1042/BJ20020743>
- Kelley, D. R., & Rinn, J. L. (2012). Transposable elements reveal a stem cell specific class of long noncoding RNAs. *Genome Biology*, *13*(11), R107. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-11-r107>

- Kennedy, R., & Celis, E. (2008). Multiple roles for CD4⁺ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunological Reviews*, 222(1), 129-144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00616.x>
- Kessels, H. W. H. G., de Visser, K. E., Tirion, F. H., Coccoris, M., Kruisbeek, A. M., & Schumacher, T. N. M. (2004). The impact of self-tolerance on the polyclonal CD8⁺ T cell repertoire. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172, 2324-2331. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2324>
- Kevil, C., Carter, P., Hu, B., & DeBenedetti, A. (1995). Translational enhancement of FGF-2 by eIF-4 factors, and alternate utilization of CUG and AUG codons for translation initiation. *Oncogene*, 11(11), 2339-2348.
- Khaitan, D., Dinger, M. E., Mazar, J., Crawford, J., Smith, M. A., Mattick, J. S., & Perera, R. J. (2011). The Melanoma-Upregulated Long Noncoding RNA SPRY4-IT1 Modulates Apoptosis and Invasion. *Cancer Research*, 71(11). Consulté à l'adresse <http://cancerres.aacrjournals.org.gate2.inist.fr/content/71/11/3852.long>
- Khalil, A. M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Rivea Morales, D., ... Rinn, J. L. (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(28), 11667-72. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904715106>
- Khammari, A., Labarrière, N., Vignard, V., Nguyen, J.-M., Pandolfino, M.-C., Knol, A. C., ... Dreno, B. (2009). Treatment of Metastatic Melanoma with Autologous Melan-A/Mart-1-Specific Cytotoxic T Lymphocyte Clones. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(12), 2835-2842. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.144>
- Khong, H. T., & Rosenberg, S. A. (2002). Pre-existing immunity to tyrosinase-related protein (TRP)-2, a new TRP-2 isoform, and the NY-ESO-1 melanoma antigen in a patient with a dramatic response to immunotherapy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(2), 951-6. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.2.951>
- Khosravi, S., Tam, K. J., Ardekani, G. S., Martinka, M., McElwee, K. J., & Ong, C. J. (2015). eIF4E Is an Adverse Prognostic Marker of Melanoma Patient Survival by Increasing Melanoma Cell Invasion. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(5), 1358-1367. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.552>
- Khurana, E., Fu, Y., Chakravarty, D., Demichelis, F., Rubin, M. A., & Gerstein, M. (2016). Role of non-coding sequence variants in cancer. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 93-108. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.17>
- Kieft, J. S. (2008). Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends in biochemical sciences*, 33(6), 274-83. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.04.007>
- Kim, J. H., Paek, K. Y., Choi, K., Kim, T.-D., Hahm, B., Kim, K.-T., & Jang, S. K. (2003). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C modulates translation of c-myc mRNA in a cell cycle phase-dependent manner. *Molecular and cellular biology*, 23(2), 708-20. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509468>
- Kim, J. H., Park, S. M., Park, J. H., Keum, S. J., & Jang, S. K. (2011). eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions. *The EMBO journal*, 30(12), 2454-64. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.146>
- Kim, M., Pinto, S. M., Getnet, D., Nirujogi, R. S., Manda, S. S., Chaerkady, R., ... Pandey, A. (2014). A

- draft map of the human proteome. *Nature*, 509(7502), 575-581. <https://doi.org/10.1038/nature13302>
- Kim, Y. K., Back, S. H., Rho, J., Lee, S. H., & Jang, S. K. (2001). La autoantigen enhances translation of BiP mRNA. *Nucleic acids research*, 29(24), 5009-16. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11812831>
- Kim, Y. K., Hahm, B., & Jang, S. K. (2000). Polypyrimidine tract-binding protein inhibits translation of bip mRNA. *Journal of molecular biology*, 304(2), 119-33. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4179>
- Kimball, S. R. (2001). Regulation of translation initiation by amino acids in eukaryotic cells. *Prog Mol Subcell Biol*, 26, 155-184. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11575165>
- Komar, A. A., & Hatzoglou, M. (2005). Internal Ribosome Entry Sites in Cellular mRNAs: Mystery of Their Existence. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 23425-23428. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400041200>
- Kondo, T., Hashimoto, Y., Kato, K., Inagaki, S., Hayashi, S., & Kageyama, Y. (2007). Small peptide regulators of actin-based cell morphogenesis encoded by a polycistronic mRNA. *Nature cell biology*, 9(6), 660-5. <https://doi.org/10.1038/ncb1595>
- Kornienko, A. E., Guenzl, P. M., Barlow, D. P., & Pauler, F. M. (2013). Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription. *BMC biology*, 11(1), 59. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-59>
- Koromilas, A. E. (2014). Roles of the translation initiation factor eIF2 α serine 51 phosphorylation in cancer formation and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(7), 871-880. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.12.007>
- Koromilas, a E., Lazaris-Karatzas, a, & Sonenberg, N. (1992). mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *The EMBO journal*, 11(11), 4153-4158. <https://doi.org/10.1126/science.1382315>
- Koyasu, S. (2003). The role of PI3K in immune cells. *Nature Immunology*, 4(4), 313-319. <https://doi.org/10.1038/ni0403-313>
- Kozak, M. (1978). How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90039-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90039-9)
- Kunze, M. M., Benz, F., Brau??, T. F., Lampe, S., Weigand, J. E., Braun, J., ... Schmid, T. (2016). sST2 translation is regulated by FGF2 via an hnRNP A1-mediated IRES-dependent mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(7), 848-859. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.05.005>
- Kunze, M. M., Benz, F., Brauß, T. F., Lampe, S., Weigand, J. E., Braun, J., ... Schmid, T. (2016). sST2 translation is regulated by FGF2 via an hnRNP A1-mediated IRES-dependent mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(7), 848-859. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.05.005>
- Kvistborg, P., Shu, C. J., Heemskerk, B., Fankhauser, M., Thruw, C. A., Toebes, M., ... Schumacher, T. N. (2012). TIL therapy broadens the tumor-reactive CD8 + T cell compartment in melanoma patients. *Oncimmunology*, 1(4), 409-418. <https://doi.org/10.4161/onci.18851>

- Kvistborg, P., van Buuren, M. M., & Schumacher, T. N. (2013). Human cancer regression antigens. *Current Opinion in Immunology*, 25(2), 284-290. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.03.005>
- Kwon, O. S., An, S., Kim, E., Yu, J., Hong, K. Y., Lee, J. S., & Jang, S. K. (2017). An mRNA-specific tRNAi carrier eIF2A plays a pivotal role in cell proliferation under stress conditions: Stress-resistant translation of c-Src mRNA is mediated by eIF2A. *Nucleic Acids Research*, 45(1), 296-310. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1117>
- Kyewski, B., & Derbinski, J. (2004). Self-representation in the thymus: an extended view. *Nature Reviews Immunology*, 4(9), 688-698. <https://doi.org/10.1038/nri1436>
- Labarriere, N., Fortun, A., Bellec, A., Khammari, A., Dreno, B., Saïagh, S., & Lang, F. (2013). A full GMP process to select and amplify epitope-specific T lymphocytes for adoptive immunotherapy of metastatic melanoma. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/932318>
- Lacerda, R., Menezes, J., & Romão, L. (2017). More than just scanning: the importance of cap-independent mRNA translation initiation for cellular stress response and cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(9), 1659-1680. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2428-2>
- Laduron, S., Deplus, R., Zhou, S., Kholmanskikh, O., Godelaine, D., De Smet, C., ... De Plaen, E. (2004). MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. *Nucleic Acids Research*, 32(14), 4340-4350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh735>
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2013). Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of Cell Science*, 126(8), 1713-1719. <https://doi.org/10.1242/jcs.125773>
- Lareau, L. F., Hite, D. H., Hogan, G. J., & Brown, P. O. (2014). Distinct stages of the translation elongation cycle revealed by sequencing ribosome-protected mRNA fragments. *eLife*, 2014(3). <https://doi.org/10.7554/eLife.01257>
- Lasfargues, C., Martineau, Y., Bousquet, C., & Pyronnet, S. (2013). Changes in translational control after pro-apoptotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), 177-190. <https://doi.org/10.3390/ijms14010177>
- Laumont, C. M., Daouda, T., Laverdure, J.-P., Bonneil, É., Caron-Lizotte, O., Hardy, M.-P., ... Perreault, C. (2016). Global proteogenomic analysis of human MHC class I-associated peptides derived from non-canonical reading frames. *Nature Communications*, 7, 10238. <https://doi.org/10.1038/ncomms10238>
- Laumont, C. M., & Perreault, C. (2017). Exploiting non-canonical translation to identify new targets for T cell-based cancer immunotherapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1(3). <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2628-4>
- Laressergues, D., Couzigou, J.-M., Clemente, H. S., Martinez, Y., Dunand, C., Bécard, G., & Combier, J.-P. (2015). Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature*, 520, 90-93. <https://doi.org/10.1038/nature14346>
- Lavorgna, G., Vago, R., Sarmini, M., Montorsi, F., Salonia, A., & Bellone, M. (2016). Long non-coding RNAs as novel therapeutic targets in cancer. *Pharmacological Research*, 110, 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.05.018>
- Lawrence, M. S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G. V, Cibulskis, K., Sivachenko, A., ... Getz, G. (2013).

- Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*, 499(7457), 214-8. <https://doi.org/10.1038/nature12213>
- Lazaris-Karatzas, A., Montine, K., & Sonenberg, N. (1990). Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5'cap. *Nature*, 345, 544-547. <https://doi.org/10.1038/345544a0>
- Le, S. Y., & Maizel, J. V. (1997). A common RNA structural motif involved in the internal initiation of translation of cellular mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 25(2), 362-369. <https://doi.org/10.1093/nar/25.2.362>
- Lee, J. T., & Herlyn, M. (2007). Microenvironmental influences in melanoma progression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(4), 862-872. <https://doi.org/10.1002/jcb.21204>
- Lee, S.-J. (1991). Expression of growth/differentiation factor 1 in the nervous system: Conservation of a bicistronic structure. *Biochemistry*, 88, 4250-4254. Consulté à l'adresse <http://www.pnas.org.gate2.inist.fr/content/88/10/4250.long>
- Leiserson, M. D. M., Vandin, F., Wu, H.-T., Dobson, J. R., Eldridge, J. V, Thomas, J. L., ... Raphael, B. J. (2014). Pan-cancer network analysis identifies combinations of rare somatic mutations across pathways and protein complexes. *Nature Genetics*, 47(2), 106-114. <https://doi.org/10.1038/ng.3168>
- Lennerz, V., Fatho, M., Gentilini, C., Frye, R. A., Lifke, A., Ferel, D., ... Wölfel, T. (2005). The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44), 16013-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500090102>
- Leprivier, G., Rotblat, B., Khan, D., Jan, E., & Sorensen, P. H. (2015a). Stress-mediated translational control in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(7), 845-860. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.11.002>
- Leprivier, G., Rotblat, B., Khan, D., Jan, E., & Sorensen, P. H. (2015b). Stress-mediated translational control in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(7), 845-860. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.11.002>
- Lessard, L., Liu, M., Marzese, D. M., Wang, H., Chong, K., Kawas, N., ... Hoon, D. S. B. (2015). The CASC15 Long Intergenic Noncoding RNA Locus Is Involved in Melanoma Progression and Phenotype Switching. *The Journal of investigative dermatology*, 135(10), 2464-74. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.200>
- Lethé, B., Lucas, S., Michaux, L., De Smet, C., Godelaine, D., Serrano, A., ... Boon, T. (1998). LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *International Journal of Cancer*, 76(6), 903-908. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19980610\)76:6<903::AID-IJC22>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19980610)76:6<903::AID-IJC22>3.0.CO;2-1)
- Leucci, E., Coe, E. A., Marine, J.-C., & Vance, K. W. (2016). The emerging role of long non-coding RNAs in cutaneous melanoma. *Pigment cell & melanoma research*, 29(6), 619-626. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12537>
- Leucci, E., Vendramin, R., Spinazzi, M., Laurette, P., Fiers, M., Wouters, J., ... Marine, J.-C. (2016). Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. *Nature*, 531(7595), 518-522. <https://doi.org/10.1038/nature17161>

- Levy, C., Khaled, M., & Fisher, D. E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in Molecular Medicine*, 12(9), 406-414. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.07.008>
- Lewis, S. M., & Holcik, M. (2008). For IRES trans-acting factors, it is all about location. *Oncogene*, 27(8), 1033-5. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210777>
- Lewis, S. M., Veyrier, A., Hosszu Ungureanu, N., Bonnal, S., Vagner, S., & Holcik, M. (2007). Subcellular relocalization of a trans-acting factor regulates XIAP IRES-dependent translation. *Molecular biology of the cell*, 18(4), 1302-1311. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06>
- Lewis, S. M., Veyrier, A., Ungureanu, N. H., Bonnal, S., & Holcik, M. (2007). Subcellular Relocalization of a Trans -acting Factor Regulates XIAP IRES-dependent Translation □, 18(April), 1302-1311. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06>
- Li, R., Zhang, L., Jia, L., Duan, Y., Li, Y., Bao, L., & Sha, N. (2014). Long non-coding RNA BANCR promotes proliferation in malignant melanoma by regulating MAPK pathway activation. *PLoS One*, 9(6), e100893. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100893>
- Lieberman, N., Gandin, V., Svitkin, Y. V., David, M., Virgili, G., Jaramillo, M., ... Sonenberg, N. (2015). DAP5 associates with eIF2 β and eIF4AI to promote Internal Ribosome Entry Site driven translation. *Nucleic Acids Research*, 43(7), 3764-3775. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv205>
- Lin, J.-C., Hsu, M., & Tarn, W.-Y. (2007). Cell stress modulates the function of splicing regulatory protein RBM4 in translation control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2235-40. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611015104>
- Linnemann, C., van Buuren, M. M., Bies, L., Verdegaal, E. M., Schotte, R., Calis, J. J., ... Schumacher, T. N. (2015). High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nat Med*, 21(1), 81-85. <https://doi.org/10.1038/nm.3773>
- Liu, T., Shen, S.-K., Xiong, J.-G., Xu, Y., Zhang, H.-Q., Liu, H.-J., & Lu, Z.-G. (2016). Clinical significance of long noncoding RNA SPRY4-IT1 in melanoma patients. *FEBS Open Bio*, 6(2), 147-154. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12030>
- Loercher, A. E., Tank, E. M. H., Delston, R. B., & Harbour, J. W. (2005). MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *Journal of Cell Biology*, 168(1), 35-40. <https://doi.org/10.1083/jcb.200410115>
- Lonchay, C., van der Bruggen, P., Connerotte, T., Hanagiri, T., Coulie, P., Colau, D., ... Boon, T. (2004). Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 Suppl, 14631-14638. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405743101>
- Lowe, S. W., Cepero, E., & Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432(7015), 307-315. <https://doi.org/10.1038/nature03098>
- Lu, P. D., Harding, H. P., & Ron, D. (2004). Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *Journal of Cell Biology*, 167(1), 27-33. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408003>
- Lu, Y., Zhang, Y., Hang, X., Qu, W., Lubec, G., Chen, C., & Zhang, C. (2013). Genome-wide computational identification of bicistronic mRNA in humans. *Amino Acids*, 44(2), 597-606.

<https://doi.org/10.1007/s00726-012-1380-1>

- Lucas, S., De Smet, C., Arden, K. C., Viars, C. S., Lethé, B., Lurquin, C., & Boon, T. (1998). Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Research*, *58*(4), 743-752.
- Lupetti, R., Pisarra, P., Verrecchia, A., Farina, C., Nicolini, G., Anichini, A., ... Traversari, C. (1998). Translation of a retained intron in tyrosinase-related protein (TRP) 2 mRNA generates a new cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined and shared human melanoma antigen not expressed in normal cells of the melanocytic lineage. *The Journal of experimental medicine*, *188*(6), 1005-16. <https://doi.org/10.1084/jem.188.6.1005>
- Lurquin, C., De Smet, C., Brasseur, F., Muscatelli, F., Martelange, V., De Plaen, E., ... Boon, T. (1997). Two Members of the HumanMAGEB Gene Family Located in Xp21.3 Are Expressed in Tumors of Various Histological Origins. *Genomics*, *46*(3), 397-408. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.5052>
- Ma, J., Ward, C. C., Jungreis, I., Slavoff, S. A., Schwaid, A. G., Neveu, J., ... Saghatelian, A. (2014). Discovery of human sORF-encoded polypeptides (SEPs) in cell lines and tissue. *Journal of Proteome Research*, *13*(3), 1757-1765. <https://doi.org/10.1021/pr401280w>
- Ma, L., Bajic, V. B., & Zhang, Z. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA biology*, *10*(6), 1-10. <https://doi.org/10.4161/rna.24604>
- Ma, X., Zhang, H., Xue, X., & Shah, Y. M. (2017). Hypoxia-inducible factor 2 α (HIF-2 α) promotes colon cancer growth by potentiating Yes-associated protein 1 (YAP1) activity. *Journal of Biological Chemistry*, jbc.M117.805655. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.805655>
- Macejak, D. G., & Sarnow, P. (1991). Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature*, *353*(6339), 90-94. <https://doi.org/10.1038/353090a0>
- Maeda, N., Kasukawa, T., Oyama, R., Gough, J., Frith, M., Engström, P. G., ... Hayashizaki, Y. (2006). Transcript annotation in FANTOM3: Mouse gene catalog based on physical cDNAs. *PLoS Genetics*, *2*(4), 498-503. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020062>
- Maertens, O., Johnson, B., Hollstein, P., Frederick, D. T., Cooper, Z. A., Messiaen, L., ... Liations, A. (2017). Elucidating Distinct Roles for NF1 in Melanomagenesis. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0313>
- Mahalingam, D., Wilding, G., Denmeade, S., Sarantopoulos, J., Cosgrove, D., Cetnar, J., ... Carducci, M. (2016). Mipsagargin, a novel thapsigargin-based PSMA-activated prodrug: results of a first-in-man phase I clinical trial in patients with refractory, advanced or metastatic solid tumours. *British Journal of Cancer*, *114*(9), 986-994. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.72>
- Malarkannan, S. (1995). A rare cryptic translation product is presented by Kb major histocompatibility complex class I molecule to alloreactive T cells. *Journal of Experimental Medicine*, *182*(6), 1739-1750. <https://doi.org/10.1084/jem.182.6.1739>
- Mamane, Y., Petroulakis, E., Rong, L., Yoshida, K., Ler, L. W., & Sonenberg, N. (2004). eIF4E – from translation to transformation. *Oncogene*, *23*(18), 3172-3179. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207549>
- Mangus, D. A., Evans, M. C., & Jacobson, A. (2003). Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds

- for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biology*, 4(7), 223. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-7-223>
- Mantovani, S., Garbelli, S., Palermo, B., Campanelli, R., Brazzelli, V., Borroni, G., ... Giachino, C. (2003). Molecular and functional bases of self-antigen recognition in long-term persistent melanocyte-specific CD8+ T cells in one vitiligo patient. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(2), 308-314. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12368.x>
- Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N., & Burley, S. K. (1999). Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Molecular Cell*, 3(6), 707-716. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)80003-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)80003-4)
- Martincorena, I., Roshan, A., Gerstung, M., Ellis, P., Van Loo, P., McLaren, S., ... Campbell, P. J. (2015). High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science*, 348(6237), 880-886. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6806>
- Matsumoto, A., Pasut, A., Matsumoto, M., Yamashita, R., Fung, J., Monteleone, E., ... Pandolfi, P. P. (2016). mTORC1 and muscle regeneration are regulated by the LINC00961-encoded SPAR polypeptide. *Nature*, 541(7636), 228-232. <https://doi.org/10.1038/nature21034>
- Matsushita, H., Vesely, M. D., Koboldt, D. C., Rickert, C. G., Uppaluri, R., Magrini, V. J., ... Schreiber, R. D. (2012). Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature*, 482. <https://doi.org/10.1038/nature10755>
- Mattick, J. S. (2001). Non-coding RNAs: The architects of eukaryotic complexity. *EMBO Reports*, 2(11), 986-991. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve230>
- Mattick, J. S. (2003). Challenging the dogma: The hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *BioEssays*. <https://doi.org/10.1002/bies.10332>
- Maxwell, P. H., Dachs, G. U., Gleadle, J. M., Nicholls, L. G., Harris, A. L., Stratford, I. J., ... Ratcliffe, P. J. (1997). Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(15), 8104-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.15.8104>
- Mayr, B., & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(8), 599-609. <https://doi.org/10.1038/35085068>
- Mazar, J., Zhao, W., Khalil, A. M., Lee, B., Shelley, J., Govindarajan, S. S., ... Perera, R. J. (2014). The functional characterization of long noncoding RNA SPRY4-IT1 in human melanoma cells. *Oncotarget*, 5(19), 8959-8969. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1863>
- Mazzocchi, A., Belli, F., Mascheroni, L., Vegetti, C., Parmiani, G., & Anichini, A. (1994). Frequency of cytotoxic T lymphocyte precursors (CTLp) interacting with autologous tumor via the T??cell receptor: Limiting dilution analysis of specific CTLp in peripheral blood and tumor???invaded lymph nodes of melanoma patients. *International Journal of Cancer*, 58(3), 330-339. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910580304>
- Melissari, M.-T., & Grote, P. (2016). Roles for long non-coding RNAs in physiology and disease. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 468(6), 945-58. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1804-y>

- Merkel, O., Taylor, N., Prutsch, N., Staber, P. B., Moriggl, R., Turner, S. D., & Kenner, L. (2017). When the guardian sleeps: Reactivation of the p53 pathway in cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 773, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.02.003>
- Merrick, W. C., & Anderson, W. F. (1975). Purification and characterization of homogeneous protein synthesis initiation factor M1 from rabbit reticulocytes. *The Journal of biological chemistry*, 250(4), 1197-206. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1112800>
- Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., ... Weinberg, R. A. (1997). hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization. *Cell*, 90(4), 785-795. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80538-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80538-3)
- Meyerson, M., Gabriel, S., & Getz, G. (2010). Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 11(10), 685-696. <https://doi.org/10.1038/nrg2841>
- Michaylira, C. Z., & Nakagawa, H. (2006). Hypoxic microenvironment as a cradle for melanoma development and progression. *Cancer Biology and Therapy*, 5(5), 476-479. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.5.2749>
- Miller, A. J., & Mihm, M. C. (2006). Melanoma. *N Engl J Med*, 355, 51-65. Consulté à l'adresse <http://www.nejm.org.gate2.inist.fr/doi/pdf/10.1056/NEJMra052166>
- Mitchell, S. A., Spriggs, K. A., Coldwell, M. J., Jackson, R. J., & Willis, A. E. (2003a). The Apaf-1 Internal Ribosome Entry Segment Attains the Correct Structural Conformation for Function via Interactions with PTB and unr. *Molecular Cell*, 11, 757-771. Consulté à l'adresse http://ac.els-cdn.com.gate2.inist.fr/S1097276503000935/1-s2.0-S1097276503000935-main.pdf?_tid=871494d0-9b93-11e7-bdf6-00000aab0f01&acdnat=1505644538_14979573b541f9b31270d3e2670c2211
- Mitchell, S. A., Spriggs, K. A., Coldwell, M. J., Jackson, R. J., & Willis, A. E. (2003b). The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr. *Molecular cell*, 11(3), 757-71. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12667457>
- Miyazaki, Y., Du, X., Muramatsu, S. -i., & Gomez, C. M. (2016). An miRNA-mediated therapy for SCA6 blocks IRES-driven translation of the CACNA1A second cistron. *Science Translational Medicine*, 8(347), 347ra94-347ra94. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf5660>
- Mohamed, E., Cao, Y., & Rodriguez, P. C. (2017). Endoplasmic reticulum stress regulates tumor growth and anti-tumor immunity: a promising opportunity for cancer immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2019-6>
- Mokrejs, M., Vopálenský, V., Kolenatý, O., Mašek, T., Feketová, Z., Sekyrová, P., ... Pospíšek, M. (2006). IRESite: the database of experimentally verified IRES structures (www.iresite.org). *Nucleic Acids Research*, 34(90001), D125-D130. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj081>
- Montagnani, V., Benelli, M., Apollo, A., Pescucci, C., & Stecca, B. (2016). Thin and thick primary cutaneous melanomas reveal distinct patterns of somatic copy number alterations. *Oncotarget*, 7(21), 30365-30378. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8758>
- Monte, M., Simonatto, M., Peche, L. Y., Bublik, D. R., Gobessi, S., Pierotti, M. A., ... Schneider, C.

- (2006). MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), 11160-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510834103>
- Montes, M., Nielsen, M. M., Maglieri, G., Jacobsen, A., Højfeldt, J., Agrawal-Singh, S., ... Lund, A. H. (2015). The lncRNA MIR31HG regulates p16INK4A expression to modulate senescence. *Nature Communications*, 6, 6967. <https://doi.org/10.1038/ncomms7967>
- Moreau-Aubry, A., Le Guiner, S., Labarrière, N., Gesnel, M.-C., Jotereau, F., & Breathnach, R. (2000). Brief Definitive Report A Processed Pseudogene Codes for a New Antigen Recognized by a CD8 α T Cell Clone on Melanoma. *J. Exp. Med*, 0(9), 1617-1623. Consulté à l'adresse <http://www.jem.org/cgi/current/full/191/9/1617>
- Morgan, C. E., Meagher, J. L., Levensgood, J. D., Delproposto, J., Rollins, C., Stuckey, J. A., & Tolbert, B. S. (2015). The First Crystal Structure of the UP1 Domain of hnRNP A1 Bound to RNA Reveals a New Look for an Old RNA Binding Protein. *Journal of Molecular Biology*, 427(20), 3241-3257. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.05.009>
- Morris, D. R., & Geballe, A. P. (2000). Upstream Open Reading Frames as Regulators of mRNA Translation. *Molecular and Cellular Biology*, 20(23), 8635-8642. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.23.8635-8642.2000>
- Musa, J., Orth, M. F., Dallmayer, M., Baldauf, M., Pardo, C., Rotblat, B., ... Grünwald, T. G. P. (2016a). Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1): a master regulator of mRNA translation involved in tumorigenesis. *Oncogene*, 35(36), 4675-4688. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.515>
- Musa, J., Orth, M. F., Dallmayer, M., Baldauf, M., Pardo, C., Rotblat, B., ... Grünwald, T. G. P. (2016b). Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1): a master regulator of mRNA translation involved in tumorigenesis. *Oncogene*, 35(36), 4675-4688. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.515>
- Nagano, T., & Fraser, P. (2011). No-nonsense functions for long noncoding RNAs. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.014>
- Navin, N., Kendall, J., Troge, J., Andrews, P., Rodgers, L., McIndoo, J., ... Wigler, M. (2011). Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*, 472(7341), 90-94. <https://doi.org/10.1038/nature09807>
- Necsulea, A., Soumillon, M., Warnefors, M., Liechti, A., Daish, T., Zeller, U., ... Kaessmann, H. (2014). The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods. *Nature*, 505(7485), 635-640. <https://doi.org/10.1038/nature12943>
- Nelson, B. R., Makarewich, C. A., Anderson, D. M., Winders, B. R., Troupes, C. D., Wu, F., ... Olson, E. N. (2016). A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science*, 351(6270), 271-275. <https://doi.org/10.1126/science.aad4076>
- Nissan, M. H., Pratilas, C. A., Jones, A. M., Ramirez, R., Won, H., Liu, C., ... Solit, D. B. (2014). Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Research*, 74(8), 2340-2350. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2625>
- Nordlund, J. J., Kirkwood, J. M., Forget, B. M., Milton, G., Albert, D. M., & Lerner, A. B. (1983). Vitiligo

- in patients with metastatic melanoma: A good prognostic sign. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 9(5), 689-696. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(83\)70182-9](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(83)70182-9)
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (New York, N.Y.)*, 194(4260), 23-8. <https://doi.org/10.1126/science.959840>
- Ohno, S. (1972). So much « junk » DNA in our genome. *Brookhaven symposia in biology*. <https://doi.org/citeulike-article-id:3483106>
- Omholt, K., Kröckel, D., Ringborg, U., & Hansson, J. (2006). Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma research*, 16(2), 197-200. <https://doi.org/10.1097/01.cmr.0000200488.77970.e3>
- Ostrand-Rosenberg, S., & Sinha, P. (2009). Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(8), 4499-506. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802740>
- Ott, P. A., Hu, Z., Keskin, D. B., Shukla, S. A., Sun, J., Bozym, D. J., ... Wu, C. J. (2017). An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature Publishing Group*, 547. <https://doi.org/10.1038/nature22991>
- Palermo, B., Campanelli, R., Garbelli, S., Mantovani, S., Lantelme, E., Brazzelli, V., ... Giachino, C. (2001). Speci[®]c Cytotoxic T Lymphocyte Responses Against Melan- A/MART1, Tyrosinase and Gp100 in Vitiligo by the Use of Major Histocompatibility Complex/Peptide Tetramers: the Role of Cellular Immunity in the Etiopathogenesis of Vitiligo. *Journal of Investigative Dermatology*, 117, 326-332. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01408.x>
- Palermo, B., Garbelli, S., Mantovani, S., Scoccia, E., Da Prada, G. A., Bernabei, P., ... Giachino, C. (2005). Qualitative difference between the cytotoxic T lymphocyte responses to melanocyte antigens in melanoma and vitiligo. *European Journal of Immunology*, 35(11), 3153-3162. <https://doi.org/10.1002/eji.200535110>
- Paul, S., Weiskopf, D., Angelo, M. A., Sidney, J., Peters, B., & Sette, A. (2013). HLA Class I Alleles Are Associated with Peptide-Binding Repertoires of Different Size, Affinity, and Immunogenicity. *The Journal of Immunology*, 191(12), 5831-5839. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302101>
- Pavitt, G. D., & Ron, D. (2012). New insights into translational regulation in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), 1-13. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012278>
- Pelletier, J., & Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, 334(6180), 320-325. <https://doi.org/10.1038/334320a0>
- Pestova, T. V, de Breyne, S., Pisarev, A. V, Abaeva, I. S., & Hellen, C. U. T. (2008). eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: a common role of domain II. *The EMBO journal*, 27(7), 1060-1072. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.49>
- Pestova, T. V, & Kolupaeva, V. G. (2002). The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal. *Genes & development*, 16(22), 2906-2922. <https://doi.org/10.1101/gad.1020902>
- Pestova, T. V, Lomakin, I. B., & Hellen, C. U. T. (2004). Position of the CrPV IRES on the 40S subunit

- and factor dependence of IRES/80S ribosome assembly. *EMBO reports*, 5(9), 906-13. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400240>
- Petz, M., Them, N., Huber, H., Beug, H., & Mikulits, W. (2012). La enhances IRES-mediated translation of laminin B1 during malignant epithelial to mesenchymal transition. *Nucleic Acids Research*, 40(1), 290-302. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr717>
- Philippe, C., Dubrac, A., Quelen, C., Desquesnes, A., Van Den Berghe, L., Segura, C., ... Touriol, C. (2016). PERK mediates the IRES-dependent translational activation of mRNAs encoding angiogenic growth factors after ischemic stress. *Science Signaling*, 9(426), ra44-ra44. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf2753>
- Philpott, C., Tovell, H., Frayling, I. M., Cooper, D. N., & Upadhyaya, M. (2017). The NF1 somatic mutational landscape in sporadic human cancers. *Human Genomics*, 11(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40246-017-0109-3>
- Pickering, B. M., Mitchell, S. A., Spriggs, K. A., Stoneley, M., & Willis, A. E. (2004). Bag-1 internal ribosome entry segment activity is promoted by structural changes mediated by poly(rC) binding protein 1 and recruitment of polypyrimidine tract binding protein 1. *Molecular and cellular biology*, 24(12), 5595-605. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.12.5595-5605.2004>
- Pienta, K. J., Robertson, B. A., Coffey, D. S., & Taichman, R. S. (2013). The cancer diaspora: Metastasis beyond the seed and soil hypothesis. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2158>
- Pikor, L., Thu, K., Vucic, E., & Lam, W. (2013). The detection and implication of genome instability in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 32(3-4), 341-352. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9429-5>
- Piñol-Roma, S., & Dreyfuss, G. (1992). Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature*, 355, 730-732. <https://doi.org/10.1038/355730a0>
- Pinto, S., Sommermeyer, D., Michel, C., Wilde, S., Schendel, D., Uckert, W., ... Kyewski, B. (2014). Misinitiation of intrathymic MART-1 transcription and biased TCR usage explain the high frequency of MART-1-specific T cells. *European Journal of Immunology*, 44(9), 2811-2821. <https://doi.org/10.1002/eji.201444499>
- Pisarev, A. V., Shirokikh, N. E., & Hellen, C. U. T. (2005). Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites. *Comptes Rendus - Biologies*. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2005.02.004>
- Pittet, M. J., Valmori, D., Dunbar, P. R., Speiser, D. E., Liénard, D., Lejeune, F., ... Romero, P. (1999). High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *The Journal of experimental medicine*, 190(5), 705-15. <https://doi.org/10.1084/jem.190.5.705>
- Pittet, M. J., Zippelius, A., Valmori, D., Speiser, D. E., Cerottini, J.-C., & Romero, P. (2002). Melan-A/MART-1-specific CD8 T cells: from thymus to tumor. *Trends in Immunology*, 23(7), 325-328. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02244-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02244-5)
- Pleasance, E. D., Cheetham, R. K., Stephens, P. J., McBride, D. J., Humphray, S. J., Greenman, C. D., ... Stratton, M. R. (2010). A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature*, 463(7278), 191-196. <https://doi.org/10.1038/nature08658>

- Poliseno, L., Haimovic, A., Christos, P. J., Vega Y Saenz de Miera, E. C., Shapiro, R., Pavlick, A., ... Osman, I. (2011). Deletion of PTENP1 pseudogene in human melanoma. *The Journal of investigative dermatology*, 131(12), 2497-500. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.232>
- Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W. J., & Pandolfi, P. P. (2010). A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*, 465(7301), 1033-1038. <https://doi.org/10.1038/nature09144>
- Pollock, P. M., Harper, U. L., Hansen, K. S., Yudt, L. M., Stark, M., Robbins, C. M., ... Meltzer, P. S. (2002). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature Genetics*, 33(1), 19-20. <https://doi.org/10.1038/ng1054>
- Polunovsky, V. A., Gingras, A. C., Sonenberg, N., Peterson, M., Tan, A., Rubins, J. B., ... Bitterman, P. B. (2000). Translational control of the antiapoptotic function of Ras. *Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24776-24780. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001938200>
- Pontier, D. B., & Gribnau, J. (2011). Xist regulation and function eXplored. *Human Genetics*, 130(2), 223-236. <https://doi.org/10.1007/s00439-011-1008-7>
- Poynter, J. N., Elder, J. T., Fullen, D. R., Nair, R. P., Soengas, M. S., Johnson, T. M., ... Gruber, S. B. (2006). BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Research*, 16(4), 267-273. <https://doi.org/10.1097/01.cmr.0000222600.73179.f3>
- Prabakaran, S., Hemberg, M., Chauhan, R., Winter, D., Tweedie-Cullen, R. Y., Dittrich, C., ... Steen, J. A. (2014). Quantitative profiling of peptides from RNAs classified as noncoding. *Nature communications*, 5(May), 5429. <https://doi.org/10.1038/ncomms6429>
- Prasad, S., Starck, S. R., & Shastri, N. (2016). Presentation of Cryptic Peptides by MHC Class I Is Enhanced by Inflammatory Stimuli. *The Journal of Immunology*, 197(8), 2981-2991. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502045>
- Prasanth, K. V., & Spector, D. L. (2007). Eukaryotic regulatory RNAs: An answer to the « genome complexity » conundrum. *Genes and Development*, 21(1), 11-42. <https://doi.org/10.1101/gad.1484207>
- Prickett, T. D., Crystal, J. S., Cohen, C. J., Pasetto, A., Parkhurst, M. R., Gartner, J. J., ... Robbins, P. F. (2016). Durable complete response from metastatic melanoma after transfer of autologous T cells recognizing 10 mutated tumor antigens. *Cancer Immunology Research*, 4(8), 669-678. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0215>
- Proud, C. G. (2015). Mnks, eIF4E phosphorylation and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(7), 766-773. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.10.003>
- Pueyo, J. I., Magny, E. G., & Couso, J. P. (2016). New Peptides Under the s(ORF)ace of the Genome. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(8), 665-678. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.05.003>
- Qian, B. Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>
- Qian, S.-B., Reits, E., Neefjes, J., Deslich, J. M., Bennink, J. R., & Yewdell, J. W. (2006). Tight Linkage between Translation and MHC Class I Peptide Ligand Generation Implies Specialized Antigen Processing for Defective Ribosomal Products. *The Journal of Immunology*, 177(1), 227-233.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.227>

- Quaglino, P., Marengo, F., Osella-Abate, S., Cappello, N., Ortoncelli, M., Salomone, B., ... Bernengo, M. G. (2010). Vitiligo is an independent favourable prognostic factor in stage III and IV metastatic melanoma patients: Results from a single-institution hospital-based observational cohort study. *Annals of Oncology*, *21*(2), 409-414. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp325>
- Rammensee, H. G., Falk, K., & Rötzschke, O. (1993). Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annual review of immunology*, *11*, 213-44. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.001241>
- Rangarajan, A., Hong, S. J., Gifford, A., & Weinberg, R. A. (2004). Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell*, *6*(2), 171-183. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.07.009>
- Redmond, W. L., & Sherman, L. A. (2005). Peripheral Tolerance of CD8 T Lymphocytes. *Immunity*, *22*(3), 275-284. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.01.010>
- Reiling, J. H., & Sabatini, D. M. (2006). Stress and mTOR signaling. *Oncogene*, *25*(48), 6373-6383. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209889>
- Reineke, L. C., Cao, Y., Baus, D., Hossain, N. M., & Merrick, W. C. (2011). Insights into the role of yeast eIF2A in Ires-Mediated translation. *PLoS ONE*, *6*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024492>
- Ripberger, E., Linnebacher, M., Schwitalle, Y., Gebert, J., & Von Knebel Doeberitz, M. (2003). Identification of an HLA-A0201-restricted CTL epitope generated by a tumor-specific frameshift mutation in a coding microsatellite of the OGT gene. *Journal of Clinical Immunology*, *23*(5), 415-423. <https://doi.org/10.1023/A:1025329819121>
- Rizvi, N. A., Hellmann, M. D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J. J., ... Chan, T. A. (2015). Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, *348*(6230), 124-128. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1348>
- Robbins, P. F., El-Gamil, M., Li, Y. F., Fitzgerald, E. B., Kawakami, Y., Rosenberg, S. A., ... Li, F. (1997). The intronic region of an incompletely spliced gp100 gene transcript encodes an epitope recognized by melanoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes. *Journal of immunology*, *159*(1), 303-8. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9200467>
- Robbins, P. F., & Kawakami, Y. (1996). Human tumor antigens recognized by T cells. *Current Opinion In Immunology*, *8*(5), 628-636. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8902387>
- Robichaud, N., Del Rincon, S. V., Huor, B., Alain, T., Petrucelli, L. A., Hearnden, J., ... Sonenberg, N. (2014). Phosphorylation of eIF4E promotes EMT and metastasis via translational control of SNAIL and MMP-3. *Oncogene*, *34*(January), 1-11. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.146>
- Rock, K. L., Farfán-Arribas, D. J., Colbert, J. D., & Goldberg, A. L. (2014). Re-examining class-I presentation and the DRiP hypothesis. *Trends in Immunology*, *35*(4), 144-152. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.01.002>
- Rogel, A., Vignard, V., Bobinet, M., Labarriere, N., & Lang, F. (2011). A long peptide from MELOE-1 contains multiple HLA class II T cell epitopes in addition to the HLA-A*0201 epitope: An

- attractive candidate for melanoma vaccination. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(3), 327-337. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0938-6>
- Rolfe, D. F., & Brown, G. C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological reviews*, 77(3), 731-58. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9234964>
- Romanelli, M. G., Diani, E., & Lievens, P. M. J. (2013). New insights into functional roles of the polypyrimidine tract-binding protein. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), 22906-22932. <https://doi.org/10.3390/ijms141122906>
- Romero, P., Dunbar, P. R., Valmori, D., Pittet, M., Ogg, G. S., Rimoldi, D., ... Cerundolo, V. (1998). Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 188(9), 1641-1650. <https://doi.org/10.1084/jem.188.9.1641>
- Ron, D. (2002). Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI200216784>
- Ronsin, C., Chung-Scott, V., Poullion, I., Aknouche, N., Gaudin, C., & Triebel, F. (1999). A non-AUG-defined alternative open reading frame of the intestinal carboxyl esterase mRNA generates an epitope recognized by renal cell carcinoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes in situ. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(1), 483-490. https://doi.org/ji_v163n1p483 [pii]
- Rosenwald, I. B., Kaspar, R., Rousseau, D., Gehrke, L., Leboulch, P., Chen, J. J., ... London, I. M. (1995). Eukaryotic translation initiation factor 4E regulates expression of cyclin D1 at transcriptional and post-transcriptional levels. *J Biol Chem*, 270(36), 21176-21180. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7673150>
- Rousseau, D., Gingras, A. C., Pause, A., & Sonenberg, N. (1996). The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. *Oncogene*, 13(11), 2415-20. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8957083>
- Roy, R., Durie, D., Li, H., Liu, B. Q., Skehel, J. M. ark, Mauri, F., ... Pardo, O. E. (2014). hnRNPA1 couples nuclear export and translation of specific mRNAs downstream of FGF-2/S6K2 signalling. *Nucleic acids research*, 42(20), 12483-12497. <https://doi.org/10.1093/nar/gku953>
- Ruault, M., van der Bruggen, P., Brun, M.-E., Boyle, S., Roizès, G., & De Sario, A. (2002). New BAGE (B melanoma antigen) genes mapping to the juxtacentromeric regions of human chromosomes 13 and 21 have a cancer/testis expression profile. *European journal of human genetics : EJHG*, 10(12), 833-40. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200891>
- Rübsamen, D., Bles, J. S., Schulz, K., Döring, C., Hansmann, M.-L., Heide, H., ... Brüne, B. (2012). IRES-dependent translation of *egr2* is induced under inflammatory conditions. *RNA (New York, N.Y.)*, 18(10), 1910-20. <https://doi.org/10.1261/rna.033019.112>
- Rübsamen, D., Kunze, M. M., Buderus, V., Brauß, T. F., Bajer, M. M., Brüne, B., & Schmid, T. (2014). Inflammatory conditions induce IRES-dependent translation of *cyp24a1*. *PLoS ONE*, 9(1), 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085314>
- Rufo, N., Garg, A. D., & Agostinis, P. (2017). The Unfolded Protein Response in Immunogenic Cell Death and Cancer Immunotherapy. *Trends in Cancer*, 3(9), 643-658.

<https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.07.002>

- Ruiz-Orera, J., Messeguer, X., Subirana, J. A., & Alba, M. M. (2014). Long non-coding RNAs as a source of new peptides. *eLife*, 3(e03523), 1-24. <https://doi.org/10.7554/eLife.03523>
- Salk, J. J., Fox, E. J., & Loeb, L. A. (2010). Mutational Heterogeneity in Human Cancers: Origin and Consequences. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(1), 51-75. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102113>
- Sánchez, Y., & Huarte, M. (2013). Long non-coding RNAs: challenges for diagnosis and therapies. *Nucleic acid therapeutics*, 23(1), 15-20. <https://doi.org/10.1089/nat.2012.0414>
- Sarkar, D., Leung, E. Y., Baguley, B. C., Finlay, G. J., & Askarian-Amiri, M. E. (2015). Epigenetic regulation in human melanoma: Past and future. *Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society*, 2294(May 2015), 37-41. <https://doi.org/10.1080/15592294.2014.1003746>
- Schepens, B., Tinton, S. A., Bruynooghe, Y., Beyaert, R., & Cornelis, S. (2005). The polypyrimidine tract-binding protein stimulates HIF-1alpha IRES-mediated translation during hypoxia. *Nucleic acids research*, 33(21), 6884-94. <https://doi.org/10.1093/nar/gki1000>
- Schepens, B., Tinton, S. A., Bruynooghe, Y., Parthoens, E., Haegman, M., Beyaert, R., & Cornelis, S. (2007). A role for hnRNP C1/C2 and Unr in internal initiation of translation during mitosis. *The EMBO journal*, 26(1), 158-69. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601468>
- Scheper, G. C., van der Knaap, M. S., & Proud, C. G. (2007). Translation matters: protein synthesis defects in inherited disease. *Nature Reviews Genetics*, 8(9), 711-723. <https://doi.org/10.1038/nrg2142>
- Schmidt, K., Joyce, C. E., Buquicchio, F., Brown, A., Ritz, J., Distel, R. J., ... Novina, C. D. (2016). The lncRNA SLNCR1 Mediates Melanoma Invasion through a Conserved SRA1-like Region. *Cell reports*, 15(9), 2025-37. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.018>
- Schmidt, S. M., Schag, K., Müller, M. R., Weck, M. M., Appel, S., Kanz, L., ... Brossart, P. (2003). Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. *Blood*, 102(2), 571-576. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2554>
- Schmitt, A. M., & Chang, H. Y. (2016). Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell*, 29(4), 452-463. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.010>
- Schumacher, T., Bunse, L., Pusch, S., Sahm, F., Wiestler, B., Quandt, J., ... Platten, M. (2014). A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature*, 512(7514), 324-7. <https://doi.org/10.1038/nature13387>
- Schumacher, T., Bunse, L., Wick, W., & Platten, M. (2014). Mutant IDH1: An immunotherapeutic target in tumors. *Oncoimmunology*, 3(12), e974392. <https://doi.org/10.4161/2162402X.2014.974392>
- Schumacher, T. N., & Hacohen, N. (2016). Neoantigens encoded in the cancer genome. *Current Opinion in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.07.005>
- Schwitalle, Y., Linnebacher, M., Ripberger, E., Gebert, J., & von Knebel Doeberitz, M. (2004). Immunogenic peptides generated by frameshift mutations in DNA mismatch repair-deficient

cancer cells. *Cancer immunity*, 4, 14. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15563124>

- Segal, N. H., Parsons, D. W., Peggs, K. S., Velculescu, V., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Allison, J. P. (2008). Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer Research*, 68(3), 889-892. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3095>
- Serviss, J. T., Johnsson, P., & Grandér, D. (2014). An emerging role for long non-coding RNAs in cancer metastasis. *Frontiers in Genetics*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00234>
- Shah, S. P., Morin, R. D., Khattra, J., Prentice, L., Pugh, T., Burleigh, A., ... Aparicio, S. (2009). Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature*, 461(7265), 809-813. <https://doi.org/10.1038/nature08489>
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, a T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832), 1107-1111. <https://doi.org/10.1038/35074122>
- Shay, J. W., & Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer*, 33(5), 787-791. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(97\)00062-2](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(97)00062-2)
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2000). Hayflick, His Limit, and Cellular Ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1(October), 72-76. <https://doi.org/10.1038/35036093>
- Sherr, C. J. (2004). Principles of Tumor Suppression. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01075-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01075-4)
- Sherr, C. J., & McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00102-2)
- Shi, Y., Yang, Y., Hoang, B., Bardeleben, C., Holmes, B., Gera, J., & Lichtenstein, A. (2016a). Therapeutic potential of targeting IRES-dependent c-myc translation in multiple myeloma cells during ER stress. *Oncogene*, 35(8), 1015-1024. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.156>
- Shi, Y., Yang, Y., Hoang, B., Bardeleben, C., Holmes, B., Gera, J., & Lichtenstein, A. (2016b). Therapeutic potential of targeting IRES-dependent c-myc translation in multiple myeloma cells during ER stress. *Oncogene*, 35(September 2014), 1015-1024. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.156>
- Shi, Y., Yang, Y., Hoang, B., Bardeleben, C., Holmes, B., Gera, J., & Lichtenstein, A. (2016c). Therapeutic potential of targeting IRES-dependent c-myc translation in multiple myeloma cells during ER stress. *Oncogene*, 35(8), 1015-1024. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.156>
- Shi, Y., Yang, Y., Hoang, B., Bardeleben, C., Holmes, B., Gera, J., & Lichtenstein, A. (2016d). Therapeutic potential of targeting IRES-dependent c-myc translation in multiple myeloma cells during ER stress. *Oncogene*, 35(8), 1015-1024. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.156>
- Shields, J. D., Kourtis, I. C., Tomei, A. A., Roberts, J. M., & Swartz, M. A. (2010). Induction of Lymphoidlike Stroma and Immune Escape by Tumors That Express the Chemokine CCL21. *Science*, 328(5979), 749-752. <https://doi.org/10.1126/science.1185837>
- Siddiqui, N., Tempel, W., Nedyalkova, L., Volpon, L., Wernimont, A. K., Osborne, M. J., ... Borden, K. L. B. (2012). Structural insights into the allosteric effects of 4EBP1 on the eukaryotic translation

- initiation factor eIF4E. *Journal of Molecular Biology*, 415(5), 781-792. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.12.002>
- Sigal, A., & Rotter, V. (2000). Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: The demons of the guardian of the genome. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.3819>
- Skabkin, M. A., Skabkina, O. V, Dhote, V., Komar, A. A., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2010). Activities of Ligatin and MCT-1/DENR in eukaryotic translation initiation and ribosomal recycling. *Genes and Development*, 24(16), 1787-1801. <https://doi.org/10.1101/gad.1957510>
- Slavoff, S. A., Mitchell, A. J., Schwaid, A. G., Cabili, M. N., Ma, J., Levin, J. Z., ... Saghatelian, A. (2013). Peptidomic discovery of short open reading frame-encoded peptides in human cells. *Nature chemical biology*, 9(1), 59-64. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1120>
- Snyder, A., Makarov, V., Merghoub, T., Yuan, J., Zaretsky, J. M., Desrichard, A., ... Chan, T. a. (2014). Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *The New England journal of medicine*, 2189-2199. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1406498>
- Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. G. (2007). New Modes of Translational Control in Development, Behavior, and Disease. *Molecular Cell*, 28(5), 721-729. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.018>
- Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell*, 136(4), 731-745. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.042>
- Sonenberg, N., Morgan, M. A., Merrick, W. C., & Shatkin, A. J. (1978). A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *PNAS*, 75(10), 4843-4847. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.10.4843>
- Spahn, A., Blondeau, N., Heurteaux, C., Dehghani, F., & Rami, A. (2008). Concomitant transitory up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1-C2 in surviving cells during neuronal apoptosis. *Neurochemical research*, 33(9), 1859-68. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9658-0>
- Speiser, D. E., Liénard, D., Pittet, M. J., Batard, P., Rimoldi, D., Guillaume, P., ... Romero, P. (2002). In vivo activation of melanoma-specific CD8+ T cells by endogenous tumor antigen and peptide vaccines. A comparison to virus-specific T cells. *European Journal of Immunology*, 32(3), 731-741. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200203\)32:3<731::AID-IMMU731>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200203)32:3<731::AID-IMMU731>3.0.CO;2-H)
- Spriggs, K., Bushell, M., Mitchell, S., & Willis, A. (2005). Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors. *Cell Death and Differentiation*, 12, 585-591. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401642>
- St.Laurent, G., Wahlestedt, C., & Kapranov, P. (2015). The Landscape of long noncoding RNA classification. *Trends in Genetics*, 31(5), 239-251. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.03.007>
- Starck, S. R., Jiang, V., Pavon-Eternod, M., Prasad, S., McCarthy, B., Pan, T., & Shastri, N. (2012a). Leucine-tRNA Initiates at CUG Start Codons for Protein Synthesis and Presentation by MHC Class I. *Science*, 336(6089), 1719-1723. <https://doi.org/10.1126/science.1220270>
- Starck, S. R., Jiang, V., Pavon-Eternod, M., Prasad, S., McCarthy, B., Pan, T., & Shastri, N. (2012b). Leucine-tRNA Initiates at CUG Start Codons for Protein Synthesis and Presentation by MHC

- Class I. *Science*, 336(6089), 1719-1723. <https://doi.org/10.1126/science.1220270>
- Starck, S. R., Ow, Y., Jiang, V., Tokuyama, M., Rivera, M., Qi, X., ... Shastri, N. (2008). A distinct translation initiation mechanism generates cryptic peptides for immune surveillance. *PLoS ONE*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003460>
- Starck, S. R., & Shastri, N. (2011). Non-conventional sources of peptides presented by MHC class I. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(9), 1471-1479. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0655-0>
- Starck, S. R., Tsai, J. C., Chen, K., Shodiya, M., Wang, L., Yahiro, K., ... Walter, P. (2016). Translation from the 5' untranslated region shapes the integrated stress response. *Science*, 351(6272), aad3867-aad3867. <https://doi.org/10.1126/science.aad3867>
- Stoecklein, N. H., Hosch, S. B., Bezler, M., Stern, F., Hartmann, C. H., Vay, C., ... Klein, C. A. (2008). Direct Genetic Analysis of Single Disseminated Cancer Cells for Prediction of Outcome and Therapy Selection in Esophageal Cancer. *Cancer Cell*, 13(5), 441-453. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.04.005>
- Stoneley, M., & Willis, A. E. (2004). Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene*, 23(18), 3200-3207. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207551>
- Stratton, M. R. (2011). Exploring the Genomes of Cancer Cells: Progress and Promise. *Science*, 331(6024), 1553-1558. <https://doi.org/10.1126/science.1204040>
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Andrew F, P. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719-724. <https://doi.org/10.1038/nature07943>
- Talmadge, J. E., & Fidler, I. J. (2010). AACR centennial series: The biology of cancer metastasis: Historical perspective. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040>
- Tang, L., Zhang, W., Su, B., & Yu, B. (2013). Long noncoding RNA HOTAIR is associated with motility, invasion, and metastatic potential of metastatic melanoma. *BioMed research international*, 2013, 251098. <https://doi.org/10.1155/2013/251098>
- Tautz, D. (2009). Polycistronic peptide coding genes in eukaryotes - How widespread are they? *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 8(1), 68-74. <https://doi.org/10.1093/bfpg/eln054>
- Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Andreev, D. E., & Shatsky, I. N. (2008a). Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nature structural & molecular biology*, 15(8), 836-41. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1445>
- Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Andreev, D. E., & Shatsky, I. N. (2008b). Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nature structural & molecular biology*, 15(8), 836-41. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1445>
- Thakor, N., & Holcik, M. (2012). IRES-mediated translation of cellular messenger RNA operates in eIF2-independent manner during stress. *Nucleic Acids Research*, 40(2), 541-552. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr701>
- Thalmensi, J., Pliquet, E., Liard, C., Escande, M., Bestetti, T., Julithe, M., ... Langlade-Demoyen, P.

- (2016). Anticancer DNA vaccine based on human telomerase reverse transcriptase generates a strong and specific T cell immune response. *Oncot Immunology*, 5(3), e1083670. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1083670>
- The Cancer Genome Atlas Network. (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*, 161(7), 1681-1696. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.044>
- The Cancer Genome Atlas Network, Weinstein, J. N., Collisson, E. A., Mills, G. B., Shaw, K. R. M., Ozenberger, B. A., ... Stuart, J. M. (2013). The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nature Genetics*, 45(10), 1113-1120. <https://doi.org/10.1038/ng.2764>
- The FANTOM consortium, & RIKEN Genome exploration. (2005). The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. *Science*, 309(5740), 1559-1563. <https://doi.org/10.1126/science.1112014>
- Tian, Y., Zhang, X., Hao, Y., Fang, Z., & He, Y. (2014). Potential roles of abnormally expressed long noncoding RNA UCA1 and Malat-1 in metastasis of melanoma. *Melanoma research*, 24(4), 335-41. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000080>
- Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., ... Sznol, M. (2012). Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(26), 2443-2454. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>
- Träger, U., Sierro, S., Djordjevic, G., Bouzo, B., Khandwala, S., Meloni, A., ... Simon, A. K. (2012). The Immune Response to Melanoma Is Limited by Thymic Selection of Self-Antigens. *PLoS ONE*, 7(4), e35005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035005>
- Trautmann, L., Labarrière, N., Jotereau, F., Karanikas, V., Gervois, N., Connerotte, T., ... Bonneville, M. (2002). Dominant TCR V α usage by virus and tumor-reactive T cells with wide affinity ranges for their specific antigens. *European Journal of Immunology*. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200211\)32:11<3181::AID-IMMU3181>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200211)32:11<3181::AID-IMMU3181>3.0.CO;2-2)
- Tripathi, V., Ellis, J. D., Shen, Z., Song, D. Y., Pan, Q., Watt, A. T., ... Prasanth, K. V. (2010). The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Molecular cell*, 39(6), 925-38. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.011>
- Tsao, H., Chin, L., Garraway, L. A., & Fisher, D. E. (2012). Melanoma: From mutations to medicine. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.191999.112>
- Tsao, H., Zhang, X., Fowlkes, K., & Haluska, F. G. (2000). Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer research*, 60(7), 1800-4. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766161>
- Ucar, O., & Rattay, K. (2015). Promiscuous Gene Expression in the Thymus: A Matter of Epigenetics, miRNA, and More? *Frontiers in Immunology*, 6(MAR), 1-7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00093>
- Ueda, T., Sasaki, M., Elia, A. J., Chio, I. I. C., Hamada, K., Fukunaga, R., & Mak, T. W. (2010). Combined deficiency for MAP kinase-interacting kinase 1 and 2 (Mnk1 and Mnk2) delays tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 13984-13990. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008136107>
- Ul-Hussain, M., Olk, S., Schoenebeck, B., Wasielewski, B., Meier, C., Prochnow, N., ... Dermietzel, R.

- (2014). Internal ribosomal entry site (IRES) activity generates endogenous carboxyl-terminal domains of Cx43 and is responsive to hypoxic conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 289(30), 20979-20990. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.540187>
- Ulitsky, I. (2016). Evolution to the rescue: using comparative genomics to understand long non-coding RNAs. *Nature Reviews Genetics*, 17(10), 601-614. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.85>
- Ungureanu, N. H., Cloutier, M., Lewis, S. M., De Silva, N., Blais, J. D., Bell, J. C., & Holcik, M. (2006). Internal ribosome entry site-mediated translation of Apaf-1, but not XIAP, is regulated during UV-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 281(22), 15155-15163. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511319200>
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., ... Allison, J. P. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science (New York, N.Y.)*, 254(5038), 1643-7. <https://doi.org/10.1126/science.1195300>
- van der Houven van Oordt, W., Diaz-Meco, M. T., Lozano, J., Krainer, A. R., Moscat, J., & Cáceres, J. F. (2000). The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. *The Journal of cell biology*, 149(2), 307-16. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10769024>
- Van Rooij, N., Van Buuren, M. M., Philips, D., Velds, A., Toebes, M., Heemskerk, B., ... Schumacher, T. N. (2013). Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 31(32), 47-7521. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.47.7521>
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Vattem, K. M., & Wek, R. C. (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(31), 11269-11274. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400541101>
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., ... Xiao, C. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507), 1304-1351. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>
- Verdegaal, E. M. E., de Miranda, N. F. C. C., Visser, M., Harryvan, T., van Buuren, M. M., Andersen, R. S., ... van der Burg, S. H. (2016a). Neoantigen landscape dynamics during human melanoma-T cell interactions. *Nature*, 536(7614), 91-5. <https://doi.org/10.1038/nature18945>
- Verdegaal, E. M. E., de Miranda, N. F. C. C., Visser, M., Harryvan, T., van Buuren, M. M., Andersen, R. S., ... van der Burg, S. H. (2016b). Neoantigen landscape dynamics during human melanoma-T cell interactions. *Nature*, 536(7614), 91-95. <https://doi.org/10.1038/nature18945>
- Vigneron, N. (2015). Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *BioMed Research International*, 2015, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2015/948501>
- Vitiello, A., & Zanetti, M. (2017). Neoantigen prediction and the need for validation. *Nature Biotechnology*, 35(9), 815-817. <https://doi.org/10.1038/nbt.3932>

- Voelter, V., Rufer, N., Reynard, S., Greub, G., Brookes, R., Guillaume, P., ... Appay, V. (2008). Characterization of Melan-A reactive memory CD8+ T cells in a healthy donor. *International Immunology*, 20(8), 1087-1096. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxn066>
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz Jr., L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science*, 339(6127), 1546-1558. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>
- Wagner, W. M., Ouyang, Q., & Pawelec, G. (2003). The abl/bcr gene product as a novel leukemia-specific antigen: peptides spanning the fusion region of abl/bcr can be recognized by both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 52(2), 89-96. <https://doi.org/10.1007/s00262-002-0362-7>
- Wall, M. L., & Lewis, S. M. (2016). Methylarginines within the RGG-motif region of hnRNP A1 affect its IRES trans-acting factor activity and are required for hnRNP A1 stress granule localization and formation. *Journal of Molecular Biology*, 429(2), 295-307. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.12.011>
- Walters, B., & Thompson, S. R. (2016). Cap-Independent Translational Control of Carcinogenesis. *Frontiers in Oncology*, 6(May), 128. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00128>
- Wan, P. T. C., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., ... Marais, R. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116(6), 855-867. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00215-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00215-6)
- Wang, H. Y., & Wang, R.-F. (2007). Regulatory T cells and cancer. *Current Opinion in Immunology*, 19(2), 217-223. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.02.004>
- Wang, M., & Kaufman, R. J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 14(9), 581-597. <https://doi.org/10.1038/nrc3800>
- Wang, R. F., Johnston, S. L., Zeng, G., Topalian, S. L., Schwartzenuber, D. J., Rosenberg, S. A., ... Rosenberg, S. A. (1998). A Breast and Melanoma-Shared Tumor Antigen: T Cell Responses to Antigenic Peptides Translated from Different Open Reading Frames. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(7), 3598-606. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759882>
- Wang, R. F., Parkhurst, M. R., Kawakami, Y., Robbins, P. F., & Rosenberg, S. A. (1996). Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. *The Journal of experimental medicine*, 183(3), 1131-40. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8642255>
- Wang, S., Fan, W., Wan, B., Tu, M., Jin, F., Liu, F., ... Han, P. (2017). Characterization of long noncoding RNA and messenger RNA signatures in melanoma tumorigenesis and metastasis. *PLoS ONE*, 12(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172498>
- Warburg, O. (1956). Origin of cancer cells. *Oncologia*, 9(2), 75-83. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.4082.694-a>
- Warner, J. R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences*. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01460-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01460-7)

- Washietl, S., Kellis, M., & Garber, M. (2014). Evolutionary dynamics and tissue specificity of human long noncoding RNAs in six mammals. *Genome Research*, 24(4), 616-628. <https://doi.org/10.1101/gr.165035.113>
- Weber, J., Salgaller, M., Samid, D., Johnson, B., Herlyn, M., Lassam, N., ... Rosenberg, S. A. (1994). Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer research*, 54(7), 1766-71. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7511051>
- Weingarten-Gabbay, S., Elias-Kirma, S., Nir, R., Gritsenko, A. A., Stern-Ginossar, N., Yakhini, Z., ... Segal, E. (2016). Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science*, 351(6270), 1-24. <https://doi.org/10.1126/science.aad4939>
- Weinhouse, S., Warburg, O., Burk, D., & Schade, A. L. (1956). On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science*, 124(3215), 267-272. <https://doi.org/10.1126/science.124.3215.267>
- Weinstein, J. N., Collisson, E. A., Mills, G. B., Mills Shaw, K. R., Ozenberger, B. A., Ellrott, K., ... Stuart, J. M. (2013). The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nature Publishing Group*, 45. <https://doi.org/10.1038/ng.2764>
- Weinzierl, A. O., Maurer, D., Altenberend, F., Schneiderhan-Marra, N., Klingel, K., Schoor, O., ... Stevanović, S. (2008). A cryptic vascular endothelial growth factor T-cell epitope: Identification and characterization by mass spectrometry and T-cell assays. *Cancer Research*, 68(7), 2447-2454. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2540>
- Wendel, H. G., Silva, R. L. A., Malina, A., Mills, J. R., Zhu, H., Ueda, T., ... Lowe, S. W. (2007). Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes and Development*, 21(24), 3232-3237. <https://doi.org/10.1101/gad.1604407>
- Weon, J. L., & Potts, P. R. (2015). The MAGE protein family and cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 37, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.08.002>
- Wethmar, K., Smink, J. J., & Leutz, A. (2010). Upstream open reading frames: Molecular switches in (patho)physiology. *BioEssays*, 32(10), 885-893. <https://doi.org/10.1002/bies.201000037>
- Whittaker, S. R., Theurillat, J. P., Van Allen, E., Wagle, N., Hsiao, J., Cowley, G. S., ... Garraway, L. A. (2013). A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer discovery*, 3(3), 350-362. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0470>
- Wicki, A., & Christofori, G. (2008). The angiogenic switch in tumorigenesis. In *Tumor Angiogenesis: Basic Mechanisms and Cancer Therapy* (p. 67-88). https://doi.org/10.1007/978-3-540-33177-3_4
- Wilhelm, M., Schlegl, J., Hahne, H., Gholami, A. M., Lieberenz, M., Savitski, M. M., ... Kuster, B. (2014). Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature*, 509(7502), 582-587. <https://doi.org/10.1038/nature13319>
- Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wölfel, C., Klehmann-Hieb, E., ... Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5228), 1281-4. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7652577>
- Wu, C.-F., Tan, G.-H., Ma, C.-C., & Li, L. (2013). The Non-Coding RNA linc23 Drives the Malignant

- Property of Human Melanoma Cells. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(4), 179-188. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.03.001>
- Xia, X., & Holcik, M. (2009). Strong eukaryotic IRESs have weak secondary structure. *PLoS ONE*, 4(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004136>
- Xie, H., & Simon, M. C. (2017). Oxygen availability and metabolic reprogramming in cancer. *Journal of Biological Chemistry*, jbc.R117.799973. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.799973>
- Xiong, Z., Liu, E., Yan, Y., Silver, R. T., Yang, F., Chen, I. H., ... Yang, X. F. (2006). An unconventional antigen translated by a novel internal ribosome entry site elicits antitumor humoral immune reactions. *J Immunol*, 177(7), 4907-4916. <https://doi.org/10.1172/jci17774907> [pii]
- Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., ... Iacobuzio-Donahue, C. A. (2010). Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*, 467(7319), 1114-1117. <https://doi.org/10.1038/nature09515>
- Yadav, M., Jhunjunwala, S., Phung, Q. T., Lupardus, P., Tanguay, J., Bumbaca, S., ... Delamarre, L. (2014). Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature*, 515(7528), 572-576. <https://doi.org/10.1038/nature14001>
- Yamaguchi, S., Ishihara, H., Yamada, T., Tamura, A., Usui, M., Tominaga, R., ... Oka, Y. (2008). ATF4-Mediated Induction of 4E-BP1 Contributes to Pancreatic β Cell Survival under Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Metabolism*, 7(3), 269-276. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.01.008>
- Yan, Y., Cooper, C., Hamedani, M. K., Guppy, B., Xu, W., Tsuyuki, D., ... Leygue, E. (2015). The steroid receptor RNA activator protein (SRAP) controls cancer cell migration/motility. *FEBS Letters*, 589(24PartB), 4010-4018. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.11.007>
- Yang, F., Zhang, H., Mei, Y., & Wu, M. (2014). Reciprocal Regulation of HIF-1 α and LincRNA-p21 Modulates the Warburg Effect. *Molecular Cell*, 53(1), 88-100. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.004>
- Yang, L., Pang, Y., & Moses, H. L. (2010). TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.04.002>
- Yang, S. H., Sharrocks, A. D., & Whitmarsh, A. J. (2013). MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene*, 513(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.10.033>
- Yee, C., Thompson, J. A., Roche, P., Byrd, D. R., Lee, P. P., Piepkorn, M., ... Greenberg, P. D. (2000). Brief Definitive Report Melanocyte Destruction after Antigen-specific Immunotherapy of Melanoma: Direct Evidence of T Cell-mediated Vitiligo. *J. Exp. Med*, 120700(11), 1637-1643. <https://doi.org/10.1084/jem.192.11.1637>
- Yewdell, J. W. (2006, octobre). Confronting Complexity: Real-World Immunodominance in Antiviral CD8+ T Cell Responses. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.09.005>
- Yewdell, J. W., Anton, L. C., & Bennink, J. R. (1996). Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J Immunol*, 157(5), 1823-1826. <https://doi.org/10.1093/jimmunol.157.5.1823>
- Yewdell, J. W., & Nicchitta, C. V. (2006). The DRiP hypothesis decennial: support, controversy,

- refinement and extension. *Trends in Immunology*, 27(8), 368-373. <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.06.008>
- Yuan, T. L., & Cantley, L. C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27(41), 5497-5510. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.245>
- Yuan, T. L., Choi, H. S., Matsui, A., Benes, C., Lifshits, E., Luo, J., ... Cantley, L. C. (2008). Class 1A PI3K regulates vessel integrity during development and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(28), 9739-9744. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804123105>
- Zanetti, M., Hernandez, X., & Langlade-Demoyen, P. (2005). Telomerase reverse transcriptase as target for anti-tumor T cell responses in humans. *Springer Seminars in Immunopathology*. <https://doi.org/10.1007/s00281-004-0197-8>
- Zhang, K., Shi, Z. M., Chang, Y. N., Hu, Z. M., Qi, H. X., & Hong, W. (2014). The ways of action of long non-coding RNAs in cytoplasm and nucleus. *Gene*, 547(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.06.043>
- Zhou, X. P., Gimm, O., Hampel, H., Niemann, T., Walker, M. J., & Eng, C. (2000). Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. *American Journal of Pathology*, 157(4), 1123-1128. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64627-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64627-5)
- Zippelius, A., Pittet, M. J., Batard, P., Rufer, N., de Smedt, M., Guillaume, P., ... Romero, P. (2002). Thymic selection generates a large T cell pool recognizing a self-peptide in humans. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(4), 485-494. <https://doi.org/10.1084/jem.20011658>

Annexes

The Melanoma Antigens MELOE-1 and MELOE-2 Are Translated from a *Bona Fide* Polycistronic mRNA Containing Functional IRES Sequences

Delphine Carbonnelle^{1,2,3}, Virginie Vignard^{1,2,3,4}, Delphine Sehedic^{1,2,3}, Agnes Moreau-Aubry^{1,2,3}, Laetitia Florenceau^{1,2,3}, Maud Charpentier^{1,2,3}, Wolfgang Mikulits⁵, Nathalie Labarriere^{1,2,3}, François Lang^{1,2,3*}

1 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U892, Nantes, France, **2** University of Nantes, Nantes, France, **3** Centre national de la recherche scientifique, UMR 6299, Nantes, France, **4** CHU Nantes, Nantes, France, **5** Institute of Cancer Research, Comprehensive Cancer Center, Vienna, Austria

Abstract

Our previous studies on melanoma antigens identified two new polypeptides, named MELOE-1 and MELOE-2, that are involved in immunosurveillance. Intriguingly, these antigens are coded by distinct open reading frames (ORF) of the *meloe* mRNA which is significantly expressed only in the melanocytic lineage. In addition, MELOE-1 and -2 specific T cell clones recognized melanoma cells but very poorly normal melanocytes suggesting differential translation of *meloe* in normal vs tumor cells. This prompted us to elucidate the mechanisms of translation of these antigens in melanoma cells. We first demonstrated that no splicing event or cryptic promoter could generate shorter *meloe* transcripts containing only one of the two ORFs. Triggering *meloe* RNA degradation with a siRNA close to the ORF coding for MELOE-2 abrogated expression of both MELOE-1 and MELOE-2, thus confirming that the two ORFs are always associated. Next we showed, in a bicistronic reporter system, that IRES activities could be detected upstream of MELOE-1 and MELOE-2 and finally confirmed their translation from full length *meloe* cDNA in melanoma cells with eGFP constructs. In conclusion, *meloe* is a polycistronic mRNA that generates both MELOE-1 and MELOE-2 antigens through IRES-dependent translation in melanoma cells and that may explain their tumor specificity.

Citation: Carbonnelle D, Vignard V, Sehedic D, Moreau-Aubry A, Florenceau L, et al. (2013) The Melanoma Antigens MELOE-1 and MELOE-2 Are Translated from a *Bona Fide* Polycistronic mRNA Containing Functional IRES Sequences. PLoS ONE 8(9): e75233. doi:10.1371/journal.pone.0075233

Editor: Andrzej T. Slominski, University of Tennessee, United States of America

Received: June 19, 2013; **Accepted:** August 8, 2013; **Published:** September 25, 2013

Copyright: © 2013 Carbonnelle et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grant #5F120111203534 from the Association pour la Recherche sur le Cancer. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: francois.lang@univ-nantes.fr

Introduction

Several clinical trials have suggested that T cell immunotherapy may be worthwhile in cancer and particularly in metastatic melanoma [1]. In this respect, tumor antigens that can be recognized by T lymphocytes have been classified into mutated, differentiation, tumor-specific and over-expressed antigens [2]. Regardless of this classification, most of the tumor antigens and especially melanoma antigens are translated from the main large open reading frame (ORF) of their mRNA by a classical translation pathway i.e. cap-dependent ribosome scanning and translation at an initiation codon within a Kozak sequence. However, alternative translation mechanisms that can generate neo antigens and cryptic T cell epitopes have been described [3]. The most frequent occurrence is the initiation of translation from an alternative start codon located within the main ORF of a previously identified antigen. In melanoma, this was reported within ORFs coding for gp75 [4], NY-ESO-1 [5], LAGE-1 [6] and BING-4 [7]. In addition, translation of a short ORF from a processed pseudogene (i.e. in which the main ORF is invalidated) can lead to T cell epitope generation in melanoma as we previously reported [8]. More recently, it was reported in prostate cancer and chronic myeloid leukemia, that a short ORF located

downstream of the main ORF coding for myotrophin was translated by an IRES (Internal Ribosomal Entry Sequence)-dependent mechanism to generate the novel MPD6 antigen [9].

Our group has been working for many years on the characterization of melanoma antigens relevant for adoptive T cell therapy. In the course of our studies, we identified a novel melanoma antigen, named MELOE-1, that was recognized by tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) infused to patients who remained relapse-free after adoptive cell transfer in an adjuvant setting [10]. Surprisingly, MELOE-1 was translated from a small ORF of the *meloe* mRNA that contained only multiple short ORFs. Later on, we demonstrated that another ORF from the same mRNA could be translated into a second antigen, coined MELOE-2, that also triggered T cell responses in melanoma patients [11]. This raised several questions concerning the mechanisms of MELOE-1 and 2 production: is *meloe* a true polycistronic mRNA or do shorter transcripts of *meloe* mRNA exist in melanoma cells that could allow independent translation of each ORF? If *meloe* is polycistronic, what is the mechanism of ORF translation?

Analysis of the transcriptomes in eukaryotes revealed a significant number of polyA containing transcripts lacking long ORFs [12,13] and were thus considered as non coding RNA.

However, more recent studies, notably in insects, have provided evidence that a mRNA with short ORFs could be translated into physiologically relevant peptides [14,15,16,17,18].

In the present work, we used various approaches to demonstrate that *meloe* mRNA is truly polycistronic and that the translation of at least two of its ORFs in melanomas (MELOE-1 and 2) is dependent on IRES sequences.

Materials and Methods

Cell Lines and T Cell Cultures

Melanoma cell lines established from fragments of metastatic tumors are registered in the Biocollection PC-U892-NL (CHU Nantes). The colon carcinoma cell line, SW480, was purchased from ATCC (CCL228). All cell lines were maintained in RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum (FCS) (Sigma, Lyon, France). The two CD8+ T cell clones specific for MELOE-1 and MELOE-2 [10,19] were grown in RPMI 1640 8% HS supplemented with 150 IU/ml of IL-2 (Chiron, France).

Plasmid Constructions

For transfection into melanoma and SW480 cells, full length *meloe* cDNA intact or modified with enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) cDNA (made by GenArt, Life Technologies, St-Aubin, France) was cloned into a pcDNA3 expression vector (Invitrogen, Life Technologies). Bicistronic expression vectors containing Renilla and Firefly luciferase ORFs (pRF) with or without the IRES from EMCV virus (pR-EMCV-F) were previously described (Petz *et al.*, 2007). To look for IRES activity, cDNA sequences located between ORF₅₄₆₋₆₆₅ and ORF₁₄₉₁₋₁₆₃₁ or before the ORF₅₄₆₋₆₆₅ (figure 1c) were cloned into pRF. For cryptic promoter assays, the SV40 promoter of the PGL4 vector (Promega, Charbonnières, France) was replaced by the Intercistronic Region (IR) or MELOE-2 Upstream Region (UR) (figure 1C). The 600 pb melanA promoter [20] was used as positive control.

Transient Transfection and Reporter Analyses

Melanoma or colon carcinoma cells at 50–70% confluency were transfected with plasmids (4 µg/10⁶ cells) and LTX lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. For luciferase reporter assays, cells were lysed 48 h post-transfection and luminescence was measured with a VICTOR X3 (Perkin Elmer, Courtabouef, France) and expressed in arbitrary units. eGFP fluorescence was examined 48 h post transfection with an automated fluorescence High Content Screening (HCS) microscopic system (Array Scan VTI, ThermoScientific, Courtabouef, France). Nuclear staining was performed with 20 µM Hoechst 33342 (Sigma). Overlay fluorescent images of Hoechst-stained nuclei and GFP labelled cells were acquired using 386/420 nm and 485/515 nm excitation/emission filters with a 10X objective. Forty-nine fields per well were imaged resulting in the counting of over 8000 cells per condition (Cellomics® View software, Thermo Fisher Scientific).

RT-PCR Analysis

Total RNA was extracted from melanoma or colon carcinoma cell lines after transfection with NucleoSpin RNAII kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Prior to reverse transcription, DNA was removed from each sample with Turbo DNase (Ambion, Life Technologies). Retrotranscription was performed using 1 µg of total RNA, oligo dT, and Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). A negative control was included that contained no reverse transcriptase to check for absence of residual plasmid. All

samples were amplified with the Phusion Hot Start Polymerase (Thermo Scientific) using *meloe* forward (5'-ATCCCCACC-CACCCGGCTCC-3') and reverse (5'-CATGACATGCCCG-CATTTCC-3') primers. PCR conditions were 98°C for 30 s, followed by 30 or 35 cycles of 98°C for 10 s, 70°C for 30 s, 72°C for 2 min, followed by additional 72°C for 10 min.

SiRNA Transfection

A siRNA (5'-GAGUUUCACGUGGCAGUCCGGUAAA-3') targeting *meloe* mRNA was designed to hybridize 55 bp upstream of MELOE-2 ORF₅₄₆₋₆₆₅ (Ambion). A universal control siRNA (Sigma) was used as a negative control. SiRNAs (50 nM) were transfected into melanoma cells using lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. A reporter plasmid coding for eGFP protein (pEGFP-N3, Clontech, Ozyme, St-Quentin-en-Yvelines, France) was co-transfected with the siRNAs to select transfected cells. After 48 h, eGFP positive cells were sorted with a FACS ARIA III (BD Biosciences, Le-Pont-de-Claix, France) and used for qPCR or T cell stimulations.

Real-time PCR Analysis

Total RNA was extracted with NucleoSpin RNAII kit and retrotranscription was performed as above. Relative quantification of *meloe*, and housekeeping genes *rplpo* and *cyclophilin-A* expression was performed using Brilliant SYBR Green QPCR (Stratagene, Agilent technologies, Les-Ulis, France). 20 ng of cDNA was added to 200 nM of SYBR green Mix in 25 µL. Primers were: 5'-ATCCCCACCCACCCGGCTCC-3' and 5'-CATGACATGCCCGCATTTCC-3' for MELOE-1 primers and 5'-GTCTCCCCAGCACCAGAGT-3' and 5'-AGCCTGCCATCTGCAATCCT-3' for 3'DR primers. *RPLPO* primers were: 5'-GTGATGT GCAGCTGATCAAGACT-3' and 5'-GATGACAGCCCAAAGGAGA-3'; and *cyclophilin-A* primers were: 5'-CCACCGTGTTCTTCGACAT-3' and 5'-CCAGTGCTCAGAGCAGAAA-3. Thermal cycling was one step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 1 min, and 72°C for 1 min. Mean threshold cycle (*CT*) values from duplicate PCR reactions were normalized to mean *CT* values for two housekeeping genes (*cyclophilin-A* and *RPLPO*) from the same cDNA preparations. The relative expression ratio of a target gene was calculated as follows considering the PCR efficiency (*E*) and the *CT* deviation between a given cell line (*x*) and a reference cell line (*calibrator*):

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CT_{\text{target(calibrator-x)}}}}{\text{mean} \left((E_{\text{housekeeping}})^{\Delta CT_{\text{housekeeping(calibrator-x)}}} \right)}$$

Immunoprecipitation and Western Blot

Transfected cells were lysed with Tris pH 7,6 10 mM, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Triton X100 1% with protease inhibitors. Protein content of lysates was quantified by BCA assay. Total lysates (1,5 mg) were denaturated by incubation with 2% SDS for 10 min at 70°C, diluted in PBS and precipitated overnight with mouse anti-eGFP mAb (Clontech, Ozyme, France) at 4°C. Protein G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) was added (30 µl/tube), and the mixture was incubated under rotation for 2 h at 4°C. After washes, bound proteins were eluted by incubation for 10 minutes at 70°C in 30 µL of 2×Laemmli sample buffer. Whole IP samples and 5 µL of control eGFP-transfected cells were run on a 12% SDS-PAGE

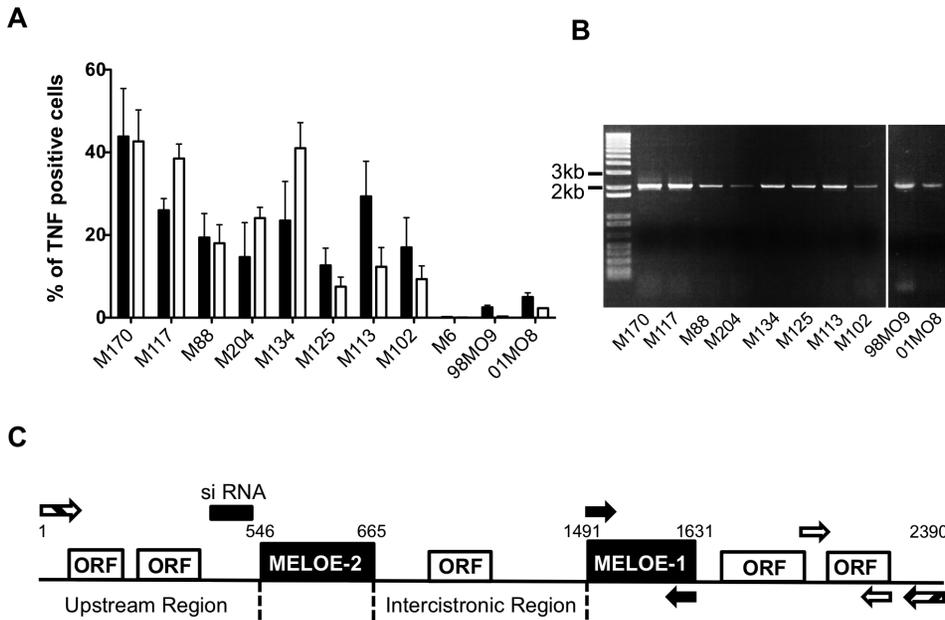


Figure 1. Expression of MELOE-1 and MELOE-2 antigens and *meloe* mRNA in the melanocytic lineage. A. TNF secretion by MELOE-1 (black bars) and MELOE-2 (white bars) T cell clones in response to HLA-A2 positive melanoma cells, melanocytes (98MO9, 01MO8) or the HLA-A2 negative M6 cell line. Cells were co-cultured at a 1:2 clone:cell ratio and TNF- α responses were assessed by intracellular staining. Bars represent mean \pm SEM of three independent experiments. B. Full length RT-PCR products amplified from cell lines RNA samples with *meloe* 5' and 3'primers. C. Structure of *meloe* cDNA. Boxes represent ORFs. Arrows indicate primer sets: *meloe* 5'-3'endpoint PCR (hatched) or qPCR in the MELOE1 region (black) or in the 3' downstream region (white). The siRNA, Upstream and Intergenic regions are illustrated. doi:10.1371/journal.pone.0075233.g001

gel and blotted onto Immobilon®-P PVDF membranes (Millipore, Molsheim France). Membranes were probed with the same anti-eGFP mAb and HRP-conjugated secondary antibody followed by ECL detection (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Membrane staining was analysed with ChemiDoc™ MP ImagingSystem apparatus (BioRad).

Functional Analysis of T Cells

Lymphocytes were stimulated for 5 h in the presence of brefeldin A (10 μ g/mL, Sigma) with tumor cell lines at an E:T ratio of 1:2. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma), permeabilised with saponine 0.1% and stained with an APC-conjugated anti-TNF- α specific antibody (Miltenyi Biotec, Paris, France) as previously described [10] and analyzed by flow cytometry.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. All results were compared using ANOVA analysis and a Dunnett post-test.

Results

Expression of MELOE-1 and MELOE-2 in Melanoma and Melanocyte Cell Lines

Expression of MELOE-1 and MELOE-2 at the protein level was evaluated indirectly with two T cell clones, clone M170.48 [10] and clone M170.51 [11] that are specific for a HLA-A2-restricted MELOE-1 and MELOE-2 epitope, respectively. We tested the capacity of eight HLA-A0201+ melanoma cell lines and two HLA-A0201+ melanocyte cell lines to stimulate TNF α production by the two clones. As shown, each of the 8 melanoma cell lines stimulated both clones, with variable intensities in TNF responses while normal melanocytes were poorly stimulatory

(figure 1A). The HLA-A2-negative melanoma cell line M6 was not stimulatory. These data therefore suggested the simultaneous expression of both antigens in all melanoma cell lines and a very low expression in normal melanocytes.

RT-PCR amplification using primers located at the 5' end and 3' end of the *meloe* transcript showed that melanocytes also expressed detectable levels of *meloe* (figure 1B). Considering that these two co-expressed antigens are coded by distinct ORFs within *meloe* mRNA (figure 1C), we also looked for the presence of alternate *meloe* transcripts that may contain only one of the two ORFs. As shown on figure 1B, in our PCR conditions, no other amplicon than the full length 2091 bp fragment could be detected neither in melanoma cell lines nor in melanocytes.

Expression of MELOE-1 and MELOE-2 in the Colon Carcinoma SW480 Cell Line Transfected with the Full Length *meloe* cDNA

To buttress the hypothesis that both MELOE-1 and MELOE-2 can be translated from the full-length *meloe* transcript, we transfected the SW480 colon carcinoma cell line with the full-length *meloe* cDNA and tested its recognition by MELOE-1/A2 and MELOE-2/A2 specific T cell clones. As previously described [10], SW480 cells expressed very low levels of the *meloe* transcript. After transfection, the level of *meloe* mRNA expression in SW480 cells, estimated by quantitative PCR using 3'DR primers (figure 1C), was greater than that of the M113 melanoma cell line (figure 2A). Again, in both untransfected and transfected SW480 cells, no other transcript than the full length *meloe* could be detected (figure 2B).

As shown on figure 2C, untransfected SW480 cells were not stimulatory for neither MELOE-1 nor MELOE-2 specific T cell clones. In contrast, SW480 cells transfected with *meloe* cDNA were recognized by both T cell clones (figure 2C). This further

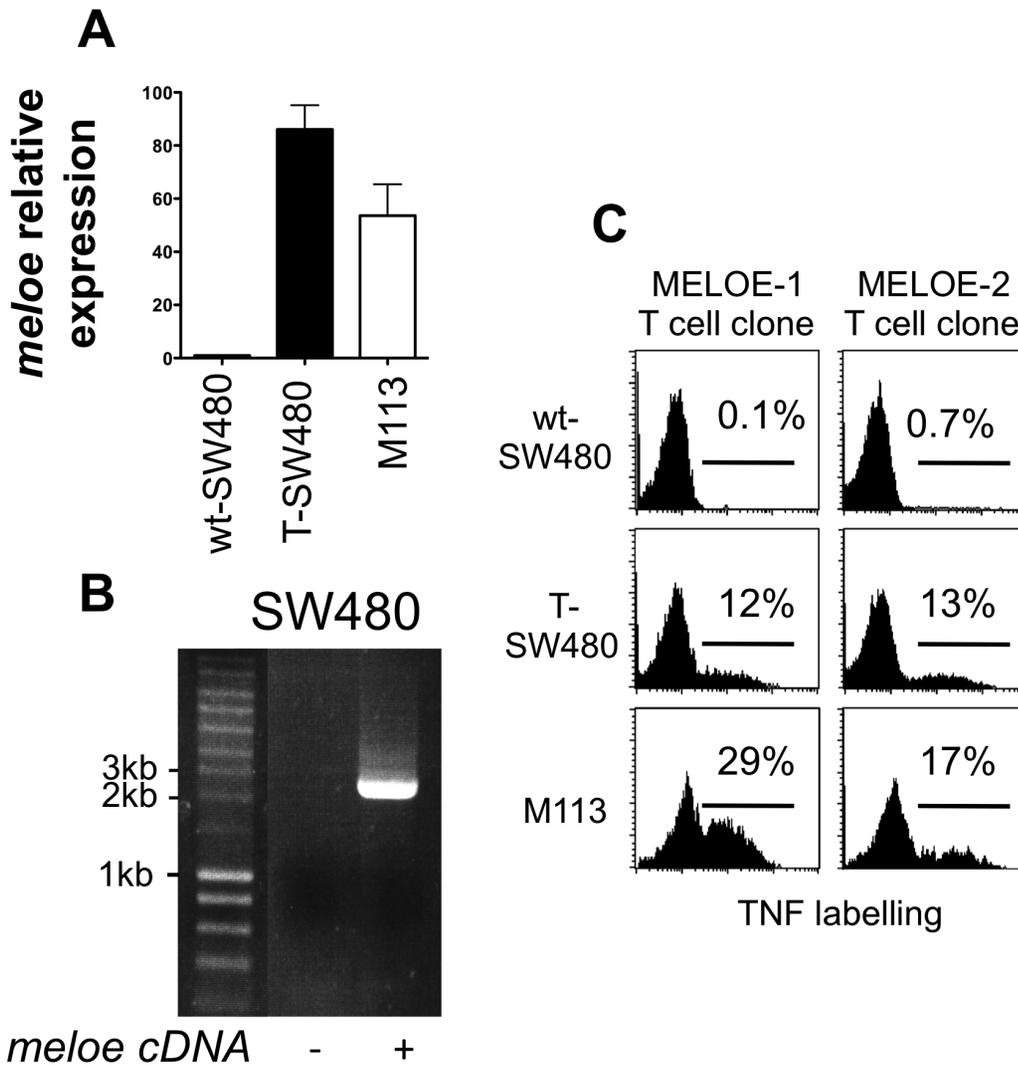


Figure 2. Expression of *meloe* mRNA and MELOE antigens in SW480 line transfected with full-length *meloe* cDNA. A. *Meloe* relative expression measured by RT-qPCR using 3' DR primers on SW480 cells wild type (wt-SW480) or transfected (T-SW480) with full-length *meloe* cDNA. M113 cells were used as positive control. B. RT-PCR products amplified from RNA of SW480 cells transfected or not with full-length *meloe* cDNA. Reverse transcriptions were performed on total RNA samples followed by PCR using 5' end and 3' end primers described on Figure 1C. C. TNF secretion by MELOE-1 (M170.48) and MELOE-2 (M170.51) T cell clones in response to SW480 cell line. Co-cultures were performed at 1:2 clone:SW480 cells ratio and responses were assessed by TNF- α intracellular staining. doi:10.1371/journal.pone.0075233.g002

supported that both MELOE-1 and MELOE-2 antigens can be translated from *meloe* mRNA in transfected SW480 cells.

Absence of Cryptic Promoter Activity Upstream of MELOE-1 and MELOE-2 ORFs

Despite the absence of detectable splicing events, the possibility remained that cryptic promoter sequences may exist upstream of ORF₅₄₆₋₆₆₅ or ORF₁₄₉₁₋₁₆₃₁ generating shorter transcripts in melanoma cells that would not be detected by 5' end-3' end PCR. To investigate this hypothesis, we cloned the regions upstream of each ORF in front of the reporter Firefly luciferase cDNA and transfected them into M113 melanoma cell line. We used the previously described Melan-A promoter region, exclusively active in melanoma cells [20] as a positive control. As shown in figure 3, no promoter activity could be detected neither upstream of ORF₅₄₆₋₆₆₅ nor upstream of

ORF₁₄₉₁₋₁₆₃₁. Thus shorter *meloe* transcripts could not be generated by cryptic promoter activities.

Silencing of *meloe* Expression with a siRNA Located Upstream of the MELOE-2 ORF

Finally, we transfected the M88 melanoma cell line with a siRNA hybridizing upstream of ORF₅₄₆₋₆₆₅ (figure 1C). We figured that if the two ORFs were always associated in melanoma cells, then this siRNA should silence the expression of both MELOE-2 and MELOE-1. Alternatively, if shorter transcripts bearing only ORF₁₄₉₁₋₁₆₃₁ are present in melanoma cells then they should escape this siRNA silencing. We used the M88 melanoma cell line instead of the previously used M113 cell line because *meloe* mRNA levels were somewhat lower in M88 cells thus optimizing the efficiency of RNA silencing.

Because the efficiency of transfection of M88 cells was only around 50%, we selected transfected M88 cells by co-transfecting

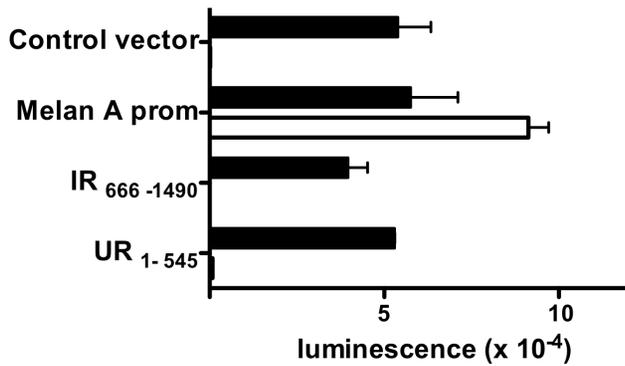


Figure 3. Detection of putative cryptic promoter activity in intergenic region (IR) and upstream region (UR) of *meloe*. The SV40 promoter region of PGL4-13 vector was replaced by fragments of interest, i.e intergenic region (IR₆₆₆₋₁₄₉₀) between MELOE-1 and MELOE-2, MELOE-2 Upstream Region (UR₁₋₅₄₅), or the 600 bp melanA promoter as positive control. PGL4-13 without the SV40 promoter was used as negative control. A Renilla luciferase expression plasmid was co-transfected as a positive control of transfection. Renilla luciferase (black bars) and Firefly luciferase (white bars) activities were measured after 48 h and expressed as arbitrary units. Data are expressed as mean \pm SEM from four distinct experiments. doi:10.1371/journal.pone.0075233.g003

a reporter GFP plasmid along with the siRNAs (see m&m) and then sorting GFP+ cells by flow cytometry. The efficiency of *meloe*-specific siRNA silencing was evaluated on sorted GFP+ M88 cells by quantitative PCR using primers located either in the MELOE-1 ORF (i.e. closer to the siRNA hybridization site) or in the 3' region. As shown on figure 4A, using MELOE-1 primers, the specific siRNA (at 50 nM) significantly decreased the expression of *meloe* mRNA in transfected cells while the control siRNA had no effect. Identical results were obtained with qPCR using primers in the 3' region (not shown).

In parallel, GFP+ M88 cells were used to stimulate our two specific T cell clones. Transfection with the *meloe*-specific siRNA at 50 nM dramatically decreased recognition of M88 cells by both MELOE-2 and MELOE-1 specific T cell clones while the control siRNA had no effect on T cell recognition (figure 4B). Thus, silencing MELOE-2 expression with this siRNA resulted in concomitant silencing of MELOE-1 expression. These data further supported the hypothesis that MELOE-1 and MELOE-2 were translated from the same mRNA.

Evidence for IRES Activities Upstream of MELOE-2 and MELOE-1 Coding Sequences

To define the mechanisms governing MELOE-1 and MELOE-2 translation, we looked for IRES activity upstream of their coding sequences. To this end, we used the previously described Renilla/Firefly bicistronic vector, pRF [21]. After transfection into M113 melanoma cells, we measured the luminescence of each luciferase. As expected, transfection of M113 with the control pRF plasmid resulted in Rluc activity with no Fluc activity while introduction of the well-characterized viral EMCV IRES sequence [22] allowed efficient translation of Fluc (94106 \pm 10339 units vs 3030 \pm 466 units for EMCV vs control respectively, n = 4) (figure 5). Cloning of the 5' region of *meloe* upstream of MELOE-2 coding sequence into pRF resulted in significant luciferase activity (50093 \pm 3091 units vs 3030 \pm 466 units for UR₁₋₅₄₅ vs control, n = 4, p<0.001). When the shorter region UR₂₆₂₋₅₄₅ was cloned into the pRF vector, the efficiency of Fluc translation was significantly decreased (19983 \pm 1546 vs 50093 \pm 3091 units for UR₂₆₂₋₅₄₅ vs UR₁₋₅₄₅,

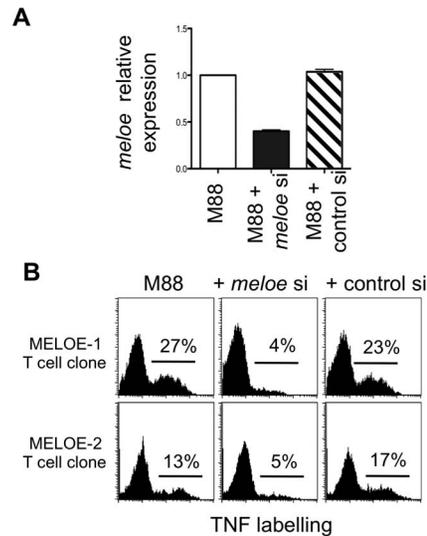


Figure 4. *Meloe* silencing in melanoma cells with a short interfering RNA (siRNA) localized upstream of MELOE-2 ORF. A. M88 melanoma cells were transfected with 50 nM of irrelevant siRNA (control si) or siRNA hybridizing 55 bp upstream of MELOE-2 ORF (*meloe* si) along with a GFP reporter plasmid. Relative expression levels of *meloe* mRNA were evaluated on GFP+ sorted cells by qPCR with MELOE-1 primers. B. TNF secretion by MELOE-1 (M170.48) and MELOE-2 (M170.51) T cell clones in response to GFP+ sorted M88 cells transfected with the different siRNAs. Co-cultures with specific clones were performed at 1:2 clone to melanoma cell ratio and response of each clone was assessed by TNF- α intracellular staining. doi:10.1371/journal.pone.0075233.g004

n = 4, p<0.001) although still significantly higher than the control vector (figure 5). These data strongly suggested the presence of an IRES sequence in front of the coding sequence of MELOE-2.

Similar experiments were performed to explore the intergenic region between MELOE-2 and MELOE-1 (figure 1C). However, when we subcloned the entire region (IR₆₆₆₋₁₄₉₀) into pRF and transfected it into M113 cells, we evidenced a splicing event that took place between a donor site within the Renilla luciferase sequence and an acceptor site located within the IR region (data not shown). Such splicing events have been previously reported with this pRF vector [23]. Thus, we tested shorter fragments covering the entire region. Absence of splicing with these shorter fragments was ascertained by RT-PCR showing a unique amplicon at the expected size (data not shown). The fragment IR₆₆₆₋₁₂₁₅ induced no Firefly activity while fragment IR₁₂₆₈₋₁₄₉₀ did (17285 \pm 1668 units for IR₁₂₆₈₋₁₄₉₀ vs 2007 \pm 220 units for control, n = 6, p<0.001) (figure 5) thus strongly suggesting the presence of an active IRES sequence in this latter fragment. This IRES activity was abrogated when we shortened the fragment (IR₁₃₉₁₋₁₄₉₀). Altogether, these results documented the presence of IRES activities upstream of the sequences coding for MELOE-2 and MELOE-1.

Detection of Proteins Translated from the Full Length *meloe* RNA

To provide further evidence that the IRES were also functional in the full length *meloe* mRNA, we used eGFP fused to MELOE-1 or MELOE-2 as previously described [16] to allow direct detection of translation in melanoma cells. We designed cDNA constructs in which the sequence coding for fluorescent eGFP was inserted just before MELOE-1 or MELOE-2 ORFs while the rest of *meloe* cDNA was unchanged (figure 6A). We transfected the melanoma

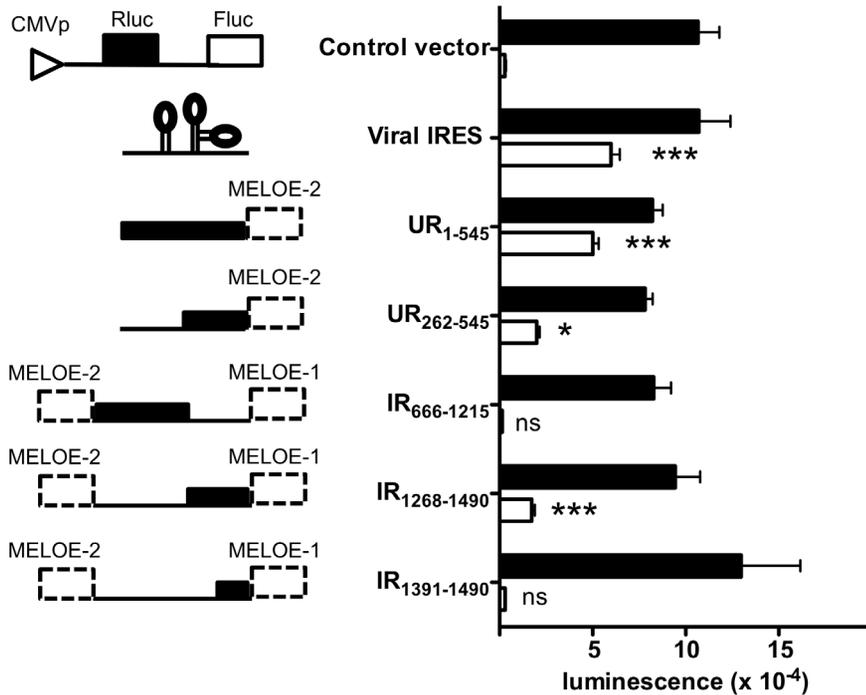


Figure 5. Analysis of IRES activity in upstream region and within the intercistronic region of *meloe* mRNA. M113 melanoma cells were transfected with the pRF bicistronic vector either empty (control vector) or containing the viral EMCV IRES (positive control) or various fragments of *meloe* mRNA: UR₁₋₅₄₅, UR₂₆₂₋₅₄₅, IR₆₆₆₋₁₂₁₅, IR₁₂₆₈₋₁₄₉₀, IR₁₃₉₁₋₁₄₉₀. Renilla luciferase (black bars) and Firefly luciferase (white bars) activities were determined 48 h after transfection and expressed as arbitrary units. Data are expressed as mean \pm SEM from four distinct experiments. ***p < 0.001, *p < 0.05, ns (non significant) by ANOVA and Dunnett post-test. doi:10.1371/journal.pone.0075233.g005

M113 cell line with eGFP-MELOE-1 or eGFP-MELOE-2 constructs or with native *meloe* cDNA used as negative control and counted fluorescent cells with an array scan HCS reader. As shown on figure 6B, some melanoma cells became fluorescent after transfection with eGFP-MELOE-1 and eGFP-MELOE-2 but not after transfection with the negative control. The small percentage of fluorescent cells resulted at least in part from a low efficiency of transfection due to the large size of the plasmid constructs (around 8.3 kb) but nevertheless, a clear difference could be seen between control (13/9900 cells with background autofluorescent activity), eGFP-MELOE-1 (473/9600 positive cells) and eGFP-MELOE-2 (144/9500 positive cells) on the 49 image scans performed. (figures S1, S2, S3). Similar results were obtained in two additional experiments. Finally, to confirm expression of eGFP-MELOE-1 and -2 fusion proteins, we performed immunoprecipitations followed by Western blot analyses using a anti-eGFP mAb. A typical experiment is shown in figure 6C: melanoma cells transfected with the eGFP control vector expressed high levels of eGFP protein (27 kD) while melanoma transfected with eGFP-MELOE-1 (lane 1) or eGFP-MELOE-2 (lane 2) expressed the fusion proteins at the expected size i.e. 31.9 kD for eGFP-MELOE-1 and 30.8 kD for eGFP-MELOE-2.

Altogether, these data provided further evidence that ORF₅₄₆₋₆₆₅ and ORF₁₄₉₁₋₁₆₃₁ can both be translated from *meloe* full length mRNA in melanoma cells.

Discussion

Although *meloe* mRNA was described in our earlier publications as the source of two melanoma antigens, MELOE-1 and MELOE-2 that could generate a T cell response [10,19], we did not explore the mechanisms governing its translation.

In the first part of this report, we present several experimental data to rule out the existence of shorter *meloe* transcripts that could account for the translation of ORF₅₄₆₋₆₆₅ (MELOE-2) and ORF₁₄₉₁₋₁₆₃₁ (MELOE-1) in a classical cap-dependent fashion. Indeed, a report pointed out a number of unjustified claims of non classical translation mechanisms due to undetected levels of splicing or cryptic promoters [24]. We first showed that only the full length *meloe* mRNA could be amplified by a 5'-3' end PCR from either melanoma cell lines, melanocytes or the SW480 cell line transfected with *meloe* cDNA. We also did not detect any cryptic promoter activity upstream of MELOE-2 ORF or upstream of MELOE-1 ORF. Finally, silencing of *meloe* mRNA in the melanoma cell line M88 with a siRNA that hybridized upstream of MELOE-2 ORF led to almost complete abrogation of recognition by both MELOE-2 and MELOE-1 specific T cell clones. We thus concluded that both ORFs were translated from the same mRNA and that *meloe* is at least a bicistronic mRNA. Several examples of polycistronic mRNA have been previously described in insects [16,25,26,27,28] and in fewer instances in mammals [29,30,31,32]. In these examples, two translation mechanisms have been described to allow expression of downstream ORFs: defective ribosome scanning [27,33] or internal ribosomal entry sequence (IRES)-dependent translation [32,34]. Our experiments with bicistronic reporters strongly supported the existence of IRES sequences upstream of both MELOE antigens. For MELOE-2, our data indicated that the full upstream region (UR) was necessary for optimal translation although the shorter UR₂₆₂₋₅₄₅ region still retained significant activity. The precise localization of the putative IRES is further complicated by the existence of two potential ORFs (ORF₁₃₂₋₂₉₆ and ORF₁₉₇₋₃₇₀) in the UR whose translation is currently being investigated. For

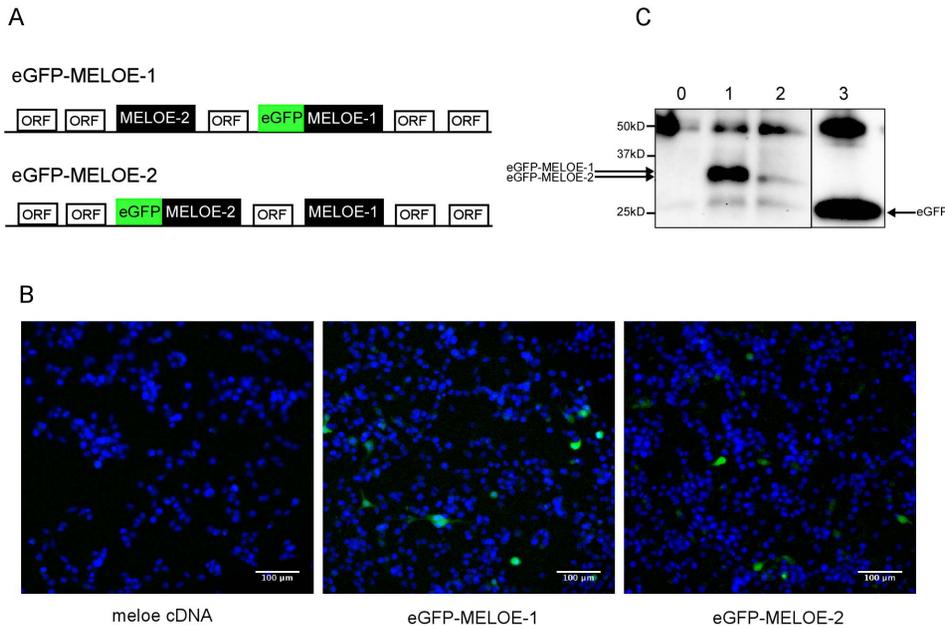


Figure 6. Analysis of MELOE-1 and MELOE-2 expression in melanoma cells with reporter EGFP constructs. A. Schematic representation of eGFP-MELOE-1 and eGFP-MELOE-2 constructs. B. M113 melanoma cells were transfected either with the full length *meloe* transcript (depicted in figure 1C) or with the modified *meloe* constructs shown in A and fluorescence was analyzed 48 h after transfection. Nuclei were stained with Hoescht before analysis. A single representative panel out of the 49 panels analyzed (available as supplemental figures) is shown in each condition. C. Immunoprecipitation with anti-eGFP monoclonal antibody of untransfected M113 cells (lane 0) or transfected with eGFP-MELOE1 (lane 1) or eGFP-MELOE2 (lane 2) or control eGFP vector (lane 3). The same membrane was exposed for 180 s to reveal lanes 0, 1 and 2 and for only 20 s for lane 3. Similar results were obtained in three distinct experiments. doi:10.1371/journal.pone.0075233.g006

MELOE-1, IRES activity was present within the 223 bp sequence upstream of MELOE-1 ORF (IR₁₂₆₈₋₁₄₉₀) and abrogated if the fragment was shortened to a 100 bp sequence (IR₁₃₉₁₋₁₄₉₀) (figure 5B). We provided additional evidence on the functionality of these IRES sequences within full length *meloe* mRNA by showing that GFP could be translated in melanoma cells when fused with either MELOE-1 or MELOE-2 coding sequences.

Cellular IRES are usually very poorly active *in vitro* because RNA secondary structures are not sufficient to allow recruitment of the 40S ribosomal subunit. They require help from IRES transacting factors (ITAF) [35]. We demonstrated that MELOE-1 and MELOE-2 translation occurred in melanoma cell lines and in *meloe*-transfected SW480 since these cells could present epitopes to T cell clones while normal melanocytes were poor stimulators. In addition, we previously showed that these melanocyte cell lines could be recognized by a Melan-A/HLA-A2 specific T cell clone and thus are not defective in antigen processing and presentation [10]. It is thus tempting to speculate that the ITAFs governing this translation may be specifically activated in cancer cells and silent in melanocytes. Indeed, a number of alterations of translation control including IRES activation have been reported in various cancers (for review [36]): for example, the group of Mikulits has shown that the ITAF La was activated during epithelial to mesenchymal transition in hepato-carcinoma allowing IRES-driven translation of laminin B1 [37]. Likewise, in melanoma, hypoxia-induced upregulation of cathepsin L was shown to be regulated post-transcriptionally by an IRES sequence [38].

Our current working hypothesis is thus that the expression of MELOE-1 and MELOE-2 antigens is under a double control, at the transcriptional and translational level. The transcriptional control confers specificity for the melanocyte lineage (Bobinet *et al.*, submitted) whereas the IRES dependent translation confers

specificity for melanoma cells. Future characterization of ITAFs involved in the translation of MELOE antigens will be required to confirm this hypothesis. Antigens produced from IRES-dependent translation of the polycistronic *meloe* mRNA (MELOE-1, -2 and possibly others) may thus represent a new class of tumor antigens in that they seem to be both tumor-specific and lineage specific and thus ideal targets for immunotherapy of melanoma.

Supporting Information

Figure S1 Montage of the 49 fields analysed in each transfection conditions shown in figure 6. Melanoma cells transfected with full length *meloe* without eGFP (S1). Fluorescence was analyzed with an automated fluorescence High Content Screening (HCS) microscopic system (Array Scan VTI, ThermoScientific) and Orca ER camera (Hamamastu). Nuclear staining was performed with 20 μM Hoeschst 33342 (Sigma). Overlay fluorescent images of Hoechst-stained nuclei and GFP labelled cells were acquired using 386/420 nm and 485/515 nm excitation/emission filter couplings, with a 10X objective. (TIF)

Figure S2 Montage of the 49 fields analysed in each transfection conditions shown in figure 6. Melanoma cells transfected with full length *meloe* without eGFP. Fluorescence was analyzed with an automated fluorescence High Content Screening (HCS) microscopic system (Array Scan VTI, ThermoScientific) and Orca ER camera (Hamamastu). Nuclear staining was performed with 20 μM Hoeschst 33342 (Sigma). Overlay fluorescent images of Hoechst-stained nuclei and GFP labelled cells were acquired using 386/420 nm and 485/515 nm excitation/emission filter couplings, with a 10X objective. (TIF)

Figure S3 Montage of the 49 fields analysed in each transfection conditions shown in figure 6. Melanoma cells transfected with eGFP-MELOE-2 construct. Fluorescence was analyzed with an automated fluorescence High Content Screening (HCS) microscopic system (Array Scan VTI, ThermoScientific) and Orca ER camera (Hamamatsu). Nuclear staining was performed with 20 μ M Hoechst 33342 (Sigma). Overlay fluorescent images of Hoechst-stained nuclei and GFP labelled cells were acquired using 386/420 nm and 485/515 nm excitation/emission filter couplings, with a 10 \times objective. (TIF)

References

- Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature reviews Immunology* 12: 269–281.
- van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B (2013) Peptide database: T cell-defined tumor antigens. *Cancer Immunol* available from: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>.
- Starck SR, Shastri N (2011) Non-conventional sources of peptides presented by MHC class I. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68: 1471–1479.
- Wang RF, Parkhurst MR, Kawakami Y, Robbins PF, Rosenberg SA (1996) Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. *The Journal of experimental medicine* 183: 1131–1140.
- Wang RF, Johnston SL, Zeng G, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, et al. (1998) A breast and melanoma-shared tumor antigen: T cell responses to antigenic peptides translated from different open reading frames. *Journal of immunology* 161: 3598–3606.
- Aarnoudse CA, van den Doel PB, Heemskerk B, Schrier PI (1999) Interleukin-2-induced, melanoma-specific T cells recognize CAMEL, an unexpected translation product of LAGE-1. *International journal of cancer Journal international du cancer* 82: 442–448.
- Rosenberg SA, Tong-On P, Li Y, Riley JP, El-Gamil M, et al. (2002) Identification of BING-4 cancer antigen translated from an alternative open reading frame of a gene in the extended MHC class II region using lymphocytes from a patient with a durable complete regression following immunotherapy. *Journal of immunology* 168: 2402–2407.
- Moreau-Aubry A, Le Guiner S, Labarrière N, Gesnel MC, Jotereau F, et al. (2000) A processed pseudogene codes for a new antigen recognized by a CD8(+) T cell clone on melanoma. *The Journal of experimental medicine* 191: 1617–1624.
- Xiong Z, Liu E, Yan Y, Silver RT, Yang F, et al. (2006) An unconventional antigen translated by a novel internal ribosome entry site elicits antitumor humoral immune reactions. *J Immunol* 177: 4907–4916.
- Godet Y, Moreau-Aubry A, Guilloux Y, Vignard V, Khammari A, et al. (2008) MELOE-1 is a new antigen overexpressed in melanomas and involved in adoptive T cell transfer efficiency. *J Exp Med* 205: 2673–2682.
- Godet Y, Moreau-Aubry A, Mompelat D, Vignard V, Khammari A, et al. (2010) An additional ORF on meloc cDNA encodes a new melanoma antigen, MELOE-2, recognized by melanoma-specific T cells in the HLA-A2 context. *Cancer Immunol Immunother* 59: 431–439.
- Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, et al. (2004) Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* 36: 40–45.
- Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, et al. (2005) The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309: 1559–1563.
- Savard J, Marques-Souza H, Aranda M, Tautz D (2006) A segmentation gene in *tribolium* produces a polycistronic mRNA that codes for multiple conserved peptides. *Cell* 126: 559–569.
- Galindo MI, Pueyo JI, Fouix S, Bishop SA, Couso JP (2007) Peptides encoded by short ORFs control development and define a new eukaryotic gene family. *PLoS Biol* 5: e106.
- Kondo T, Hashimoto Y, Kato K, Inagaki S, Hayashi S, et al. (2007) Small peptide regulators of actin-based cell morphogenesis encoded by a polycistronic mRNA. *Nat Cell Biol* 9: 660–665.
- Tautz D (2009) Polycistronic peptide coding genes in eukaryotes—how widespread are they? *Briefings in functional genomics & proteomics* 8: 68–74.
- Kondo T, Plaza S, Zanet J, Benrabah E, Valenti P, et al. (2010) Small peptides switch the transcriptional activity of Shavenbaby during *Drosophila* embryogenesis. *Science* 329: 336–339.
- Godet Y, Desfrancois J, Vignard V, Schadendorf D, Khammari A, et al. (2010) Frequent occurrence of high affinity T cells against MELOE-1 makes this antigen an attractive target for melanoma immunotherapy. *Eur J Immunol* 40: 1786–1794.
- Butterfield LH, Stoll TC, Lau R, Economou JS (1997) Cloning and analysis of MART-1/Melan-A human melanoma antigen promoter regions. *Gene* 191: 129–134.
- Petz M, Kozina D, Huber H, Siwiec T, Seipelt J, et al. (2007) The leader region of Laminin B1 mRNA confers cap-independent translation. *Nucleic Acids Res* 35: 2473–2482.
- Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, et al. (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *Journal of virology* 62: 2636–2643.
- Holecik M, Graber T, Lewis SM, Lefebvre CA, Lacasse E, et al. (2005) Spurious splicing within the XIAP 5' UTR occurs in the *Rluc/Fluc* but not the *betagal/CAT* bicistronic reporter system. *RNA* 11: 1605–1609.
- Kozak M (2007) Lessons (not) learned from mistakes about translation. *Gene* 403: 194–203.
- Andrews J, Smith M, Merakovsky J, Coulson M, Hannan F, et al. (1996) The stoned locus of *Drosophila melanogaster* produces a dicistronic transcript and encodes two distinct polypeptides. *Genetics* 143: 1699–1711.
- Brogna S, Ashburner M (1997) The *Adh*-related gene of *Drosophila melanogaster* is expressed as a functional dicistronic messenger RNA: multigenic transcription in higher organisms. *The EMBO journal* 16: 2023–2031.
- Kanamori Y, Hayakawa Y, Matsumoto H, Yasukochi Y, Shimura S, et al. (2010) A eukaryotic (insect) tricistronic mRNA encodes three proteins selected by context-dependent scanning. *J Biol Chem* 285: 36933–36944.
- Liu H, Jang JK, Graham J, Nycz K, McKim KS (2000) Two genes required for meiotic recombination in *Drosophila* are expressed from a dicistronic message. *Genetics* 154: 1735–1746.
- Gray TA, Saitoh S, Nicholls RD (1999) An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 5616–5621.
- Lee SJ (1991) Expression of growth/differentiation factor 1 in the nervous system: conservation of a bicistronic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 4250–4254.
- Reiss J, Dorche C, Stallmeyer B, Mendel RR, Cohen N, et al. (1999) Human molybdopterin synthase gene: genomic structure and mutations in molybdenum cofactor deficiency type B. *American journal of human genetics* 64: 706–711.
- Bahar Halpern K, Veprik A, Rubins N, Naaman O, Walker MD (2012) GPR41 gene expression is mediated by internal ribosome entry site (IRES)-dependent translation of bicistronic mRNA encoding GPR40 and GPR41 proteins. *The Journal of biological chemistry* 287: 20154–20163.
- Wall AA, Phillips AM, Kelly LE (2005) Effective translation of the second cistron in two *Drosophila* dicistronic transcripts is determined by the absence of in-frame AUG codons in the first cistron. *The Journal of biological chemistry* 280: 27670–27678.
- Ramanathan P, Guo J, Whitehead RN, Brogna S (2008) The intergenic spacer of the *Drosophila Adh-Adhr* dicistronic mRNA stimulates internal translation initiation. *RNA biology* 5: 149–156.
- Spriggs KA, Bushell M, Mitchell SA, Willis AE (2005) Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors. *Cell death and differentiation* 12: 585–591.
- Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ (2010) Translational control in cancer. *Nature reviews Cancer* 10: 254–266.
- Petz M, Them N, Huber H, Beug H, Mikulits W (2012) La enhances IRES-mediated translation of laminin B1 during malignant epithelial to mesenchymal transition. *Nucleic Acids Res* 40: 290–302.
- Jean D, Rousset N, Frade R (2008) Cathepsin L expression is up-regulated by hypoxia in human melanoma cells: role of its 5'-untranslated region. *The Biochemical journal* 413: 125–134.

Acknowledgments

We wish to thank the CytoCell cytometry facility and the MicroPICell imaging facility of the SFR Santé for expert technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FL DC NL. Performed the experiments: DC VV DS AMA LF MC. Analyzed the data: FL NL WM DC. Contributed reagents/materials/analysis tools: WM. Wrote the paper: FL DC.

Thèse de Doctorat

Maud CHARPENTIER

Caractérisation et contrôle de l'expression des antigènes de mélanome issus de la traduction de l'ARN *meloe*.

Characterization and control of the expression of *meloe* RNA derived melanoma antigens.

Résumé

Mis en évidence par notre équipe, les antigènes de mélanome MELOE-1 et MELOE-2 présentent un profil d'expression original qui en fait des cibles de choix pour l'immunothérapie anti-cancéreuse. Ils sont en effet issus d'un lncRNA polycistronique, *meloe*, transcrit uniquement dans les cellules de la lignée mélanocytaire et leur traduction est restreinte aux cellules de mélanome. Cette traduction restreinte repose sur l'activation de séquences IRES exclusivement dans les cellules tumorales.

Nous présentons ici l'identification d'un ORF supplémentaire de l'ARN *meloe* qui à la différence des deux précédents est traduit de façon strictement coiffe dépendante pour générer un polypeptide appelé MELOE-3. L'étude de son profil d'expression montre que contrairement à MELOE-1 et -2, il est exprimé non seulement dans les cellules de mélanome mais aussi dans les mélanocytes normaux. Nous documentons que MELOE-3 est très peu immunogène contrairement à MELOE-1 et 2. Cette observation est cohérente avec une tolérance immunitaire vis à vis d'une protéine exprimée physiologiquement par les mélanocytes.

De plus, nos travaux sur les conditions d'activation de l'IRES de MELOE-1 dans les cellules de mélanome indiquent que des inducteurs de stress du réticulum augmentent significativement l'expression de MELOE-1. Cela pourrait refléter les conditions de stress dans l'environnement tumoral in vivo.

En conclusion, les antigènes issus de la traduction IRES-dépendante de *meloe* sont les cibles thérapeutiques les plus pertinentes et notre hypothèse actuelle est que de tels antigènes IRES-dépendants existent probablement dans d'autres types de cellules cancéreuses à partir d'autres lncRNA.

Mots clés

Antigènes spécifiques de tumeur, Contrôle traductionnel, IRES, lncRNA, Immunothérapie, Mélanome

Abstract

MELOE-1 and MELOE-2 are two melanoma antigens previously identified by our team whose expression profile is attractive for their use as anti-tumor immunotherapy targets. They are indeed encoded by *meloe*, a polycistronic lncRNA only transcribed in cells of the melanocytic lineage and MELOE-1 and MELOE-2 translation is restricted to melanoma cells. This specific translation relies on the exclusive activation of IRES sequences in tumor cells.

In the present study, we identified an additional *meloe* derived protein named MELOE-3 that unlike the two others is translated through the classical cap dependent pathway. Whereas MELOE-1 and -2 were melanoma specific, MELOE-3 expression profile showed that it is expressed in both melanoma cells and normal melanocytes. We documented that in opposition to MELOE-1 and -2, MELOE-3 is poorly immunogenic, an observation that is consistent with an immune tolerance towards a protein physiologically expressed by melanocytes.

Furthermore, our work on the conditions of MELOE-1 IRES activation in melanoma cells shows that ER stress inducers significantly increase MELOE-1 expression. These conditions could reflect the cellular stress experienced by cells in the tumor microenvironment.

In conclusion, *meloe* derived antigens translated through IRES sequences are the most relevant therapeutic targets for immunotherapy. Our current hypothesis is that IRES dependent antigens encoded by cryptic transcripts such as lncRNAs probably exist in other tumor types and should be taken into account when studying anti-tumor immune responses.

Key Words

Tumor antigens, Translational control, IRES lncRNA, Immunotherapy, Melanoma