



HAL
open science

ÉVALUATION DES PROTEINES MIDKINE ET SURVIVINE SUREXPRIMEES DANS LES CELLULES TUMORALES COMME CIBLES DE L'IMMUNITE CELLULAIRE ANTI-TUMORALE

Kerzerho Jérôme

► **To cite this version:**

Kerzerho Jérôme. ÉVALUATION DES PROTEINES MIDKINE ET SURVIVINE SUREXPRIMEES DANS LES CELLULES TUMORALES COMME CIBLES DE L'IMMUNITE CELLULAIRE ANTI-TUMORALE. Immunologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2009. Français. NNT: . tel-00383751

HAL Id: tel-00383751

<https://theses.hal.science/tel-00383751>

Submitted on 13 May 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD**

ÉCOLE DOCTORALE : SIGNALISATION, ENDOCRINOLOGIE, REPRODUCTION

Année 2009

N° attribué par la bibliothèque :

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

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Spécialité : IMMUNOLOGIE – BIOTECHNOLOGIE

présentée et soutenue publiquement

par

Jérôme KERZERHO

le 24/04/2009

TITRE :

**ÉVALUATION DES PROTÉINES MIDKINE ET SURVIVINE
SUREXPRIMÉES DANS LES CELLULES TUMORALES COMME
CIBLES DE L'IMMUNITÉ CELLULAIRE ANTI-TUMORALE**

Directeur de thèse : M. le Docteur Bernard MAILLÈRE

JURY :

M. le Professeur Jean KANELLOPOULOS	Président du jury
M. le Docteur François LEMONNIER	Rapporteur
M. le Docteur Jérôme GALON	Rapporteur
M. le Docteur Éric TARTOUR	Examineur
M. le Docteur Bernard MAILLÈRE	Examineur

Remerciements

Aux membres du jury

J'adresse mes remerciements les plus sincères au Professeur Jean Kanellopoulos, au Dr François Lemonnier, au Dr Jérôme Galon ainsi qu'au Dr Eric Tartour pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.

Au SIMOPRO, je souhaite remercier

M. le professeur André Ménez, directeur du Département d'Ingénierie et d'Études des Protéines au CEA de Saclay, pour m'avoir accueilli au sein de son département.

Le Dr Vincent Dive, directeur du Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines au CEA de Saclay, où ce travail a été réalisé. Je le remercie pour m'avoir permis de finir mes travaux en soutenant ma prolongation de thèse.

Le Dr Bernard Maillère pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire mais également pour ses conseils et la confiance qu'il m'a accordée. Il m'a permis de grandir tant intellectuellement que socialement. J'ai particulièrement apprécié nos longues discussions, sa grande disponibilité et sa rigueur scientifique. Je le remercie également pour avoir soutenu et encouragé ma curiosité.

Le Dr Florence Castelli-Golfier pour sa gentillesse, sa patience, ses précieux conseils et pour son soutien tout au long de ma thèse. Je la remercie également pour la lourde tâche de relecture de ma thèse et pour m'avoir transmis ses connaissances.

Le Dr Stephanie Delluc-Desroche (Madame petits cailloux) pour m'avoir conseillé, pour avoir écouté mes lamentations et pour m'avoir aidé à l'écriture de ce manuscrit.

Le Dr Stephanie Raffestin pour sa précieuse aide en biologie moléculaire.

Sylvain Pichard pour m'avoir appris la synthèse et la purification des protéines. Je le remercie également pour son soutien moral et sa bonne humeur.

Emmanuel Favry (Papy) et Aurélie Schneider pour leur aide dans l'avancé de mes projets.

Le Dr Xiao-fei Wang pour son aide dans le début de ma thèse.

Je pense aussi à toutes les autres personnes du sous-sol, présentes durant cette période, qui ont participées par leur bonne humeur à maintenir une excellente ambiance : Natacha Szely, Julien Barbier, ma camarade de thèse Anne Chassaing, Marie Galloux, Guillaume Marchand, Guillaume Durand, Alicia Probst, Aurore Besse, Yannick Ferreira, Olivier Bruno, Sandra Moratille et Jennifer Martinez.

J'espère que mes « jéromades » les ont plus fait rire qu'embêtées.

A tous les membres du SIMOPRO qui m'ont directement et indirectement aidés durant ces 3 années de thèse. Je pense notamment à Steven Dubois et au Dr Robert Thai pour le séquençage des protéines mais aussi à Bruno Muller.

Je souhaite également remercier tous les membres du secrétariat.

Aux collaborateurs

J'adresse toute ma gratitude au Dr Olivier Adotevi pour son importante contribution à cette thèse. Mon travail n'aurait pas été aussi abouti sans lui. J'aimerais le remercier pour m'avoir proposé son aide, mais également pour sa gentillesse, la qualité de son travail, ses précieux conseils et sa grande disponibilité. Je remercie également Mlle Magalie Dosset pour son aide dans les études in vivo.

Je souhaite également remercier le Dr François Lang et Mme Karine Bernardeau pour la synthèse des tétramères.

A famille et mes amis

Je les remercie pour leur soutien, leurs encouragements et l'intérêt qu'ils ont portés à mon travail. Je les porte tous dans mon cœur.

A ma compagne, qui m'a supporté pendant l'écriture de cette thèse, qui a écouté mes lamentations passagères et qui m'a toujours soutenu même quand j'étais « malheureux ». Je m'excuse pour ces longues périodes d'absence. J'aimerais simplement lui dire que « toujours moi plus..! ».

Table des matières

Remerciements.....	2
Table des matières.....	4
Liste des Figures.....	8
Liste des Tableaux.....	10
Abréviations.....	11
Introduction générale.....	13

Contexte Scientifique

Chapitre 1 : La signature biologique des cellules tumorales 17

A. Notions générales.....	17
2. Insensibilité aux signaux d'inhibition de prolifération.....	18
3. La voie de régulation par l'apoptose.....	18
4. La voie de régulation par la sénescence.....	18
5. Le maintien de l'angiogénèse.....	19
6. L'invasion tissulaire et la formation de métastases.....	19
B. Facteurs influençant l'évolution du cancer.....	20
C. Micro-environnement : interface hôte et tumeur.....	20

Chapitre 2 : Les mécanismes de la réponse immunitaire anti-tumorale 21

A. Les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles.....	21
1. Les macrophages.....	22
2. Les Lymphocytes B.....	22
3. Les cellules dendritiques.....	23
3.1. Les différents sous-types de DC.....	23
3.2 Maturation des DC et présentation d'antigènes.....	24
B. Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).....	26
1. Organisation générale de la région du CMH.....	26
2. Le polymorphisme des molécules HLA.....	27
2.1. Polymorphisme des molécules HLA de classe I.....	28
2.2. Polymorphisme des molécules HLA de classe II.....	28
3. Les molécules HLA de classe I.....	30
3.1. Structure des molécules HLA de classe I.....	30
3.2. Interaction HLA-I/peptide.....	30
4. Les molécules HLA de classe II.....	31
4.1. Structure des molécules HLA-II.....	31
4.2. Interaction HLA-II/peptide.....	31
4.3. Les différences de spécificité de liaison des molécules HLA de classe II.....	32
5. Distribution histologique et cellulaire des molécules HLA.....	34
C. Les voies de présentation des antigènes.....	35
1. Apprêtement de l'antigène et présentation par les molécules HLA de classe I.....	35
1.1. L'immunoprotéasome.....	36
1.2. Les aminopeptidases.....	36
1.3. les voies alternatives de génération de peptides de classe I.....	37
1.4. La formation du complexe HLA-I/peptide.....	37
2. Apprêtement de l'antigène et présentation par les molécules HLA de classe II.....	38
3. La présentation croisée des antigènes.....	39

4. La présentation d'antigènes cytosoliques par les molécules HLA-II.....	40
D. Structures, fonctions, clivage et apprêtement des peptides signaux.....	41
1. Structure des peptides signaux	41
2. La translocation co-translationnelle d'une protéine sécrétée	42
2.1. Processus général de translocation	42
2.2. Variabilité dans l'efficacité d'interaction entre le peptide signal et le translocon... ..	43
3. Clivage et apprêtement du peptide signal.....	44
3.1. Présentation de fragments de peptides signaux par les molécules HLA-I.....	45
3.2. Présentation de fragments de peptides signaux par les molécules HLA-I non classiques	46
E. Les Lymphocytes T : les effecteurs de la réponse cellulaire anti-tumorale.....	47
1. Les mécanismes d'activation des lymphocytes T.....	47
1.1. L'interaction TCR / HLA-peptide	48
1.2. Les molécules de co-stimulation.....	48
1.3. La synapse immunologique	49
1.4. Les mécanismes de polarisation des cellules T CD4+.....	50
2. Les lymphocytes T : fonctions effectrices et rôle dans la réponse anti-tumorale	52
2.1. Les lymphocytes T CD4+	52
2.2. Les lymphocytes T CD8+	55
2.3. Les lymphocytes T mémoire.....	59

Chapitre 3 : L'immunogénicité des tumeurs..... 61

A. Les antigènes tumoraux.....	61
1. Les systèmes d'identification des antigènes tumoraux	62
1.1. Stratégies basées sur l'identification de TAA à partir de TIL ou de cellules T réactives, ou l'activation de CTL spécifiques de tumeurs.....	62
1.2. L'approche sérologique (SEREX)	65
1.3. Les modèles informatiques de prédiction d'épitopes	65
2. Classification des antigènes tumoraux	67
2.1. Les antigènes tumoraux spécifiques du patient	67
2.2. Les antigènes spécifiques de tumeurs.....	68
2.3. Les antigènes du soi surexprimés dans les cellules tumorales.....	68
2.4. Les antigènes de différenciation, tissu spécifique	70
2.5. Les antigènes tumoraux issus de tumeurs viro-induites	71
B. Échappement des tumeurs aux réactions immunes	72
1. Résistance à l'attaque immune	72
1.1. Altération des mécanismes de présentation des Ag tumoraux	72
1.2. Anomalies fonctionnelles des voies de l'apoptose	73
1.3. Stratégie de contre-attaque tumorale au système immunitaire	74
2. Induction d'une tolérance	75
2.1. Inaccessibilité des cellules tumorales	75
2.2. Présentation inefficace par les DC.....	76
2.3. Les cytokines immunosuppressives.....	76
2.4. L'absence de signaux de danger	77
2.5. Les lymphocytes T régulateurs	78
3. Le concept d' « immunoediting ».....	78
C. L'immunodominance des épitopes T	79
1. Définition de l'immunodominance.....	79
2. Facteurs impliqués dans l'immunodominance	80
2.1. Rôle de l'apprêtement de l'antigène	80
2.2. Rôle du répertoire T	81
D. L'immunothérapie active	82
1. Vaccins peptidiques.....	82

1.2. Essais cliniques de vaccinations peptidiques	83
2. Vaccins à base de protéines	90
3. Vaccins à base d'ADN	91
4. Les approches vaccinales utilisant des cellules	92
4.1 Vaccins utilisant des cellules tumorales	92
4.2 Les vaccins utilisant les DC	94

Résultats

Chapitre 1 : Survivine : une nouvelle cible de thérapie anti-cancéreuse... 100

A. Étude de la réponse T CD4+ induite contre la Survivine.....	101
1. Objectifs du travail	101
2. Présentation de l'article	102
B. Identification d'épitopes T CD8+ dans la séquence de la Survivine.....	115
1. Objectifs du travail	115
2. Résultats	116
2.1. Sélection et synthèse de peptides restreints à la molécule HLA-A2	116
2.2. Génération de lignées de L _T CD8+ contre les peptides de la Survivine.....	116
2.3. Étude de la fonctionnalité des lignées T CD8+ spécifiques de la Survivine	117
C. Conclusion et Discussion.....	120

Chapitre 2 : Le facteur angiogénique et bio-marqueur Midkine est un nouvel antigène tumoral surexprimé dans les tumeurs..... 123

A. Introduction	123
1. Notions générales relatives à la Midkine.....	123
2. Récepteurs et Fonctions physiologiques	124
2.1. Les récepteurs de la Midkine	124
2.2. Fonctions biologiques	125
3. Midkine et cancers.....	127
3.1 Expression dans les tumeurs	127
3.2. La Midkine est un bio-marqueur tumoral	127
3.3. Activités biologiques liées aux cellules tumorales	128
3.4. La Midkine est une cible moléculaire.....	129
B. Étude de la capacité de la Midkine à induire des réponses T CD8+ in vitro et in vivo	130
1. Objectifs	130
2. Présentation de l'article	130
C. Identification d'épitopes T CD4+ dans la Midkine.....	153
1. Objectifs de travail.....	153
2. Résultats	153
2.1 Synthèse de peptides et tests de liaisons aux molécules HLA-II.....	153
2.2. Génération de lignées de L _T CD4+ contre les peptides de la Midkine	155
2.3. Caractérisations de lignées de lymphocytes T CD4+ induites par les peptides.....	156
D. Conclusions et Discussion.....	159

Discussion générale et perspectives 162

Projets en cours

Identification d'épitopes T CD4+ dans la Cycline B1..... 169

A. Objectifs de travail	170
B. Résultats.....	170

1. Synthèse de peptides de la Cycline B1 et tests de liaison aux molécules HLA-II	170
2. Synthèse et purification de la Cycline B1	171
3. Induction de lignées de lymphocytes T CD4+ contre la protéine Cycline B1	172
4. Identification d'épitopes T CD4+ dans la séquence de la Cycline B1	172
C. Discussion et perspectives	173

Identification d'épitopes T CD4+ HLA-DP4 restreints dans les protéines

TERT et Her2/neu 174

A. Objectifs de travail	174
B. Résultats.....	175
1. Prédiction des peptides ligands des molécules HLA-DP4	175
2. Évaluation de la liaison aux molécules HLA-DP4.....	176
3. Induction in vitro de lignées de L _T CD4+ issues de sujets naïfs HLA-DP4.....	176
C. Discussion et perspectives	178

Bibliographie.....179

Liste des Figures

Figure 1 : Événements génétiques impliqués dans le développement d'un cancer.....	20
Figure 2 : Microenvironnement du champ d'invasion de la tumeur.....	20
Figure 3 : La plasticité des cellules dendritiques humaines.....	23
Figure 4 : Maturation des cellules dendritiques.....	24
Figure 5 : Schéma simplifié de l'organisation génétique des complexes majeurs d'histocompatibilité humain et murin.....	26
Figure 6: Organisation de la région HLA de classe II.....	26
Figure 7: Principe de nomenclature des allèles HLA-DRB.....	28
Figure 8 : Représentation schématique des cinq haplotypes HLA-DR.....	29
Figure 9 : Schéma général des molécules HLA-I et HLA-II.....	30
Figure 10 : Structure de la molécule HLA-I.....	30
Figure 11 : Motif consensuel d'ancrage des peptides antigéniques de 10 acides aminés à la molécule HLA-A*0201.....	31
Figure 12: Structure de la molécule HLA-II.....	31
Figure 13: Complexe du HLA-II / peptide.....	32
Figure 14 : Le protéasome et l'immunoprotéasome.....	35
Figure 15 : L'apprêtement des antigènes et leur présentation sur les molécules HLA-I.....	37
Figure 16 : L'apprêtement des antigènes et leur présentation sur les molécules HLA-II.....	38
Figure 17 : Mécanismes de présentation croisée utilisés par les cellules dendritiques.....	39
Figure 18 : Les voies de présentation d'antigènes cytosoliques sur les molécules HLA-II....	40
Figure 19 : Structures, fonctions, clivage et apprêtement des peptides signaux.....	42
Figure 20 : Présentation de fragments de peptides signaux par les molécules de HLA-I.....	46
Figure 21 : Vue générale de la synapse immunologique mature.....	49
Figure 22 : Programme de différenciation des lymphocytes T CD4+.....	50
Figure 23 : Rôle des lymphocytes T CD4+ dans la modulation des réponses immunes anti-tumorales.....	53

Figure 24 : Évolution du modèle de mort cellulaire par la voie perforine/granzyme.....	56
Figure 25 : Les différentes voies de signalisation par le récepteur Fas.....	57
Figure 26 : Mécanismes responsables de la déficience d'expression de molécules HLA-I....	73
Figure 27 : Apoptose des lymphocytes T induite par FasL.....	75
Figure 28 : Principe d'immunoediting.....	79
Figure 29 : Pharmacocinétique des peptides courts et longs utilisés en essais de vaccination.....	86
Figure 30 : Spécificité peptidique des lignées de L _T CD8+ issues de donneurs sains HLA-A2 induits contre des peptides de la Survivine.....	117
Figure 31 : Étude de la restriction à la molécule HLA-A2 de lignées T spécifiques du peptide 5-14 de la Survivine.....	118
Figure 32 : Tests de dose réponse de lignées de L _T CD8+ spécifiques de peptides de la Survivine.....	118
Figure 33 : Reconnaissance directe de cellules tumorales par des L _T CD8+ spécifiques de la Survivine.....	119
Figure 34 : Organisation des domaines et structure tridimensionnelle de la Midkine.....	123
Figure 35 : Représentation schématiques des trois transcrits de la MDK.....	124
Figure 36 : Les récepteurs de la Midkine et leurs mécanismes d'action.....	125
Figure 37 : Spécificité peptidique des lignées de L _T CD4+ induits contre des peptides de la Midkine.....	156
Figure 38 : Restriction HLA-DR et HLA-DP4 de lignées de L _T CD4+ spécifiques de peptides de la Midkine.....	157
Figure 39 : Reconnaissance de lysats de tumeurs par des lignées de LT CD4+ spécifiques de peptides de la Midkine.....	158
Figure 40 : Tests de liaison des peptides CyclineB1 aux molécules HLA-DR et DP4.....	171
Figure 41 : Spécificité peptidique des lignées de L _T CD4+ issues de donneurs sains HLA- DP4 induites contre des peptides TERT.....	177
Figure 42 : Spécificité peptidique des lignées de L _T CD4+ issues de donneurs sains HLA- DP4 induites contre des peptides Her2/neu.....	178

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Nombre d'allèles pour les différents locus de la région HLA.....	28
Tableau 2 : Fréquences géniques de différents allèles HLA de classe I.....	28
Tableau 3 : Fréquences géniques de différents allèles HLA-DRB1.....	29
Tableau 4 : Motifs de liaison des molécules HLA-DR.....	33
Tableau 5 : Motifs de liaison des molécules HLA-DP2, DP4 et DP9.....	34
Tableau 6 : Antigènes comportant un épitope T dans leur peptide signal.....	45
Tableau 7 : Les différentes classes d'antigènes tumoraux humains.....	67
Tableau 8 : Méthodes immunologiques de suivi clinique.....	83
Tableau 9 : Essais cliniques de phase I/II de vaccinations peptidiques.....	84
Tableau 10 : Devenir clinique des patients cancéreux vaccinés selon différentes approches.....	97
Tableau 11 : Les épitopes T CD8+ connus de la Survivine.....	115
Tableau 12 : Positions et séquences des peptides de la Survivine synthétisés.....	116
Tableau 13 : Nombre de lignées de L _T CD8+ spécifiques de peptides de la Survivine induites par peptides et par donneurs sains HLA-A2.....	117
Tableau 14 : Résumé de l'étude des réponses cellulaires T dirigées contre la Survivine.....	120
Tableau 15 : Positions et séquences des peptides de la Midkine synthétisés.....	153
Tableau 16 : Tests de liaison des peptides Midkine aux molécules HLA-DR et -DP4.....	154
Tableau 17 : Bilan des lignées de L _T CD4+ induites contre la Midkine.....	155
Tableau 18 : Résumé de l'étude des réponses cellulaires T dirigées contre la Midkine.....	159
Tableau 19 : Bilan des lignées de L _T CD4+ induites contre la Cycline B1.....	172
Tableau 20 : Tests de liaison des peptides sélectionnés dérivés de la Télomérase et de la protéine Her2/neu aux molécules HLA-DP4.....	176

Abréviations

Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Ag	Antigène
β2m	béta 2 microglobuline
CCNB1	Cycline B1
CD	Clusters of Differentiation
CEA	Carcinoembryonic antigen
CLIP	Class II associated invariant chain peptides
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
CTL	Cytotoxic T lymphocytes
DC	Dendritic cells
EBV	Ebstein Baar Virus
FADD	Fas Associated protein with Death Domain
FasL	Fas ligand
Fc	Fragment constant des immunoglobulines
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HHD	Human Human Domain
HLA	Human leukocyte antigens
HPLC	High performance liquide Chromatography
Hsp	Heat shock protein
IDO	Indole amine 2-3 dioxygénase
IFA	Adjuvant incomplet de Freund
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
kDa	KiloDalton
L _T	Lymphocytes T
L _B	Lymphocytes B
LPS	Lipopolysaccharide
LSEC	Liver sinusoidal endothelial cells
mDC	DC myéloïdes
MDK	Midkine
NK	Natural Killer
NKT	Natural killer T cells
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
pDC	DC plasmacytoïde
PMSA	Prostate membrane specific antigen
PSA	Prostate specific antigen
RE	Réticulum Endoplasmique
c-SMAC	central-SupraMolecular Activation Complex
SP	Signal peptidase
SPP	Signal Peptide Peptidase
SRP	Signaux Recognition Particule
STAT	Signal Transduced and Activator of Transcription

TAA	Tumor-associated antigen
TAP	Transporter associated protein
TCR	Récepteur des cellules T
TERT	Téломérase Reverse Transcriptase
TFA	Acide trifluoroacétique
TGF- β	TGF-b « Transforming Growth Factor beta
Th	T helper
TIL	T infiltrating lymphocytes
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
Tregs	Lymphocytes T régulateurs
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Introduction générale

Ces 20 dernières années ont vu l'émergence du concept de vaccination anti-tumorale, cent ans après les premières expériences du Dr Coley qui avait observé quelques régressions de métastases après l'injection à ses patients d'extraits bactériens pyrogènes (Coley, 1891). Avec le recul, l'effet observé à l'époque était vraisemblablement dû à une réaction immune non spécifique médiée par des cytokines de l'inflammation. Depuis, l'identification de nombreux antigènes associés aux tumeurs (TAA, tumor associated antigen) a permis de s'orienter raisonnablement sur des protocoles de vaccination visant à rétablir ou à amplifier une réponse immune cellulaire et spécifique (Boon et al., 1997).

De nombreux essais de vaccination visant des TAA variés ont été développés. Cependant l'efficacité de ces vaccins demeure faible et la régression de tumeurs est rare par rapport au nombre de personnes vaccinées. Ces études ont montré l'importance d'enrichir le pool antigènes (Ag) tumoraux par de nouvelles cibles protéiques ayant à la fois une expression dans de nombreuses cellules tumorales et jouant un rôle vital dans le développement des tumeurs. Une vaccination anti-tumorale visant de tels Ags pourrait être utilisée chez des patients atteints de tumeurs diverses tout en évitant un échappement tumoral aux réactions immunes par perte de l'Ag.

Des Ags tumoraux ayant ces propriétés ont été identifiés. Ils forment un groupe d'Ag « universels » représenté par la Télomérase reverse transcriptase (TERT), qui permet le maintien de la longueur des télomères dans les cellules tumorales, ainsi que par les protéines inhibitrices de l'apoptose, Survivine et Bcl-2. Malheureusement, peu de cibles peptidiques dérivées de tels Ags sont disponibles pour des essais cliniques.

Deux raisons peuvent l'expliquer. Premièrement, peu d'Ags tumoraux font partie de ce groupe. Un moyen pour identifier de nouvelles cibles protéiques pouvant appartenir à ce groupe est de s'intéresser aux études de transcriptomique et de protéomique réalisées à grande échelle. En effet, ces études ont permis d'identifier un grand nombre de protéines exprimées de manière générique dans les tumeurs et jouant un rôle important dans le développement du phénotype malin. Cependant, il reste à déterminer la capacité de ces protéines à induire des réponses T CD8+ et CD4+. Deuxièmement, malgré de nombreuses études montrant qu'une réponse cytotoxique efficace nécessite le développement d'une réponse T CD4+ auxiliaire (Toes et al., 1999), les réponses T CD4+ associées aux Ags appartenant à ce groupe restent largement méconnues.

L'objectif de mon travail de thèse a été d'identifier de nouvelles cibles peptidiques pertinentes, dérivées d'Ags universels impliqués dans des fonctions vitales pour les cellules tumorales, pour des essais cliniques de vaccination anti-tumorale. Pour cela, j'ai étudié l'ensemble des réponses cellulaires T dirigées contre des Ags universels appartenant à ce groupe.

Au cours de la première partie de ma thèse, j'ai identifié des épitopes T CD4+ et confirmé les épitopes T CD8+ dérivés de la Survivine, un Ag tumoral universel permettant la résistance des cellules tumorales à l'apoptose.

Dans une deuxième partie, j'ai identifié un nouvel Ag tumoral universel, ayant de multiples fonctions vitales dans les cellules tumorales, en utilisant une stratégie d'immunologie inverse : la Midkine. L'ensemble des réponses T spécifiques de cette protéine a été étudié *in vitro* et *in vivo* et des épitopes T CD8+ et CD4+ ont été identifiés.

L'utilisation de peptides dans la vaccination nécessite de tenir compte du polymorphisme des molécules HLA afin de couvrir le maximum d'individus. Dans cette optique, nous avons identifié des épitopes CD4+ présentés par les molécules HLA-II les plus représentées dans la population (10 molécules HLA-DR et 2 molécules HLA-DP) et des épitopes CD8+ présentés par la molécule HLA-A2 la plus représentée dans la population.

En parallèle de ces travaux, j'ai travaillé sur un projet en collaboration dirigé par le Dr Eric Tartour ayant pour objectif d'identifier des épitopes T CD4+ restreints aux molécules HLA-DP4, qui sont les molécules HLA de classe II les plus représentées dans la population.

L'ensemble de mon travail a donné lieu au brevet, publications et communications suivants :

Brevet

“Utilisation de la protéine MDK et de peptides dérivés comme vaccin anti-tumoral”

J. Kerzerho, B. Maillere, E. Favry

Juin 2008, Demande N° : 08 03466

Publications

1. "The angiogenic biomarker Midkine is a tumor-shared antigen"
Jerome Kerzerho, Olivier Adotevi, Florence Castelli, Magalie Dosset, Karine Bernardeau, Francois Lang, Eric Tartour, Bernard Maillere
En cours de soumission Cancer Research
2. "Contribution of HLA-DR and HLA-DP4 molecules to the CD4+ T cell response specific for the tumor-shared antigen Survivin"
Xiao-Fei. Wang, **Jerome Kerzerho**, Olivier Adotevi, Hélène Nuyttens, Gaetan Munier, Shuiping Tu, Eric Tartour and Bernard Maill ere
The Journal of Immunology, 2008, 181: 431-439

Communication scientifique

"The angiogenic factor midkine is a tumor-shared antigen"
Jerome Kerzerho, Olivier Adotevi, Florence Castelli, Magalie Dosset, Karine Bernardeau, Francois Lang, Eric Tartour, Bernard Maillere
Présentation orale et poster au congrès de la SFI Novembre 2008

Dans le contexte scientifique, nous parlerons de la signature biologique des cellules tumorales. Nous d evolopperons ensuite les m echanismes de la réponse immunitaire anti-tumorale chez l'homme, et en particulier, les éléments cellulaires et moléculaires mis en jeu pour l'induction d'une réponse immune efficace. Nous aborderons également les étapes de l'identification des Ags associ es aux tumeurs, qui est un pr eamble à la vaccination. Nous évoquerons ensuite les m echanismes de défense mis en place par les tumeurs pouvant perturber cette réponse (échappement tumoral). Enfin, nous parlerons des différentes approches d'immunothérapie active et des résultats obtenus lors d'essais de vaccination.

Contexte Scientifique

Chapitre 1

La signature biologique des cellules tumorales

A. Notions générales

Le cancer est une pathologie des organismes complexes. Il peut apparaître chez les mammifères, mais ne se développe pas chez les organismes plus simples comme la drosophile. En effet, seuls les organismes complexes possèdent des tissus renouvelables, expliquant ainsi leur susceptibilité aux cancers. Ces tissus sont le siège d'une prolifération cellulaire qui permet le renouvellement des cellules qui meurent ou se différencient. Cependant, ce phénomène présente l'inconvénient majeur d'entraîner des mutations au sein du génome, conférant à la cellule un phénotype malin. Le cancer peut donc être défini comme une « maladie des gènes » (Bishop, 1991). Les cellules présentent au sein du clone néoplasique émergent et accumulent une série de changements génétiques aboutissant à la sélection d'un clone phénotypiquement altéré (Ponder, 2001). La population de cellules néoplasiques ainsi sélectionnée ne répond plus aux mécanismes qui contrôlent la croissance cellulaire et évolue en cancer. Hanahan et Weinberg ont identifié six fonctions essentielles au phénotype de cellule cancéreuse. Certaines de ces fonctions se limitent aux tumeurs solides, notamment l'invasion tissulaire et la formation de métastases. En effet, les tumeurs liquides telles les hémopathies malignes ont une capacité invasive beaucoup plus agressive du fait de leur accessibilité accrue aux différents organes qui composent notre corps.

1. L'autonomie de croissance

Parce que les cellules tumorales deviennent insensibles aux signaux de régulation extérieurs et prolifèrent de façon incontrôlée, les tumeurs acquièrent une autonomie de croissance. En surexprimant les récepteurs à activité tyrosine kinase, elles sont stimulées par les facteurs de croissance à des niveaux de concentration inférieurs aux seuils physiologiques de stimulation. De plus, en modifiant les récepteurs de la matrice extra-cellulaire tels que les intégrines, elles sont capables de migrer hors de leur site de résidence. Toutes ces fonctions sont possibles uniquement grâce à des modifications des circuits de signalisation amorcés via la liaison du ligand à son récepteur. C'est le cas de la voie SOS-Ras-Raf-MAPK.

2. Insensibilité aux signaux d'inhibition de prolifération

C'est principalement la voie de la « Retinoblastoma Protein » (pRb) qui est altérée. Cette protéine, lorsqu'elle est hypophosphorylée bloque la fonction de E2F. E2F est le facteur de transcription qui contrôle l'expression d'un ensemble de gènes essentiels à l'évolution du stade cellulaire de la phase G1 vers la phase S. Si le contrôle par pRb est altéré, la libération de E2F induit la prolifération. La voie de pRb est gouvernée par le « Transforming Growth Factor β » (TGF β). L'insensibilité au TGF β , soit par la perte de son expression soit par la mutation du récepteur spécifique, est entre autre, la cause d'une prolifération dérégulée.

3. La voie de régulation par l'apoptose

Une caractéristique commune à toute cellule tumorale concerne la possibilité qu'elles puissent échapper à la mort cellulaire programmée (ou apoptose), ce qui favorise leur développement. La cellule cancéreuse acquiert plusieurs mécanismes de résistance à l'apoptose. Le plus connu est celui de la mutation du gène suppresseur de tumeur p53, impliqué dans la régulation pro-apoptotique. La mutation de ce gène, devenu alors non fonctionnel, est retrouvée dans 50% des cancers. Récemment d'autres voies anti-apoptotiques altérées ont été mises en évidence telle la voie de signalisation impliquant le récepteur Fas et son ligand Fas-L. Dans les cellules tumorales, le récepteur, « Decoy Receptor » est surexprimé. Il a une affinité supérieure à celle de Fas pour le Fas-L telle, que ce dernier est détourné de son récepteur spécifique et donc de sa fonction pro-apoptotique.

4. La voie de régulation par la sénescence

La sénescence est le processus par lequel une cellule s'arrête de proliférer et meurt après un nombre défini de divisions. Ce mécanisme, encore mal connu, est régulé par les télomères (séquences d'ADN répétitives situées à l'extrémité des chromosomes qui sont raccourcis à chaque division). Les télomères, en effet, ne sont pas répliqués de la même façon que le reste du génome. Ils sont synthétisés par la Télomérase, une enzyme qui agit de façon moins précise qu'une polymérase, créant des variations au hasard dans le nombre de répétition de la séquence d'ADN télomérique. La sénescence cellulaire est liée à la réduction progressive du nombre de ces répétitions, suggérant qu'elle pourrait être due à l'échec du maintien de la longueur de ces séquences répétées. C'est peut être parce que les cellules tumorales surexpriment la télomérase qu'elles deviennent immortelles. L'implication de la télomérase dans l'immortalisation des cellules est mise en évidence *in vitro* sur des fibroblastes humains. L'inhibition des fonctions de p53 et pRb ont permis d'immortaliser des fibroblastes. L'immortalisation passe d'abord par un stade

critique caractérisé par une mort cellulaire massive. Seulement quelques cellules (une pour 10 Millions) persistent. Elles sont capables de se répliquer sans limite. L'étude des caractéristiques moléculaires de ces cellules altérées révèle une surexpression de la télomérase assurant le maintien des télomères et permettant une division cellulaire sans limite.

5. Le maintien de l'angiogénèse

La croissance d'une tumeur solide est limitée par sa vascularisation. Si elle n'était pas envahie par les capillaires, elle ne disposerait pour sa croissance que des éléments nutritifs diffusés par l'environnement proche. Elle ne pourrait donc pas grossir au-delà d'un diamètre de quelques millimètres. L'implantation d'un tissu tumoral dans la cornée entraîne la croissance rapide de vaisseaux sanguins depuis la lisière vasculaire vers l'implant. Le taux de croissance de la tumeur augmente fortement dès qu'elle est vascularisée. Les cellules endothéliales envahissantes répondent à un signal produit par le tissu tumoral. La formation d'un réseau sanguin se fait selon quatre étapes comprenant : la rupture de la lame basale du vaisseau sanguin existant, le déplacement des cellules endothéliales vers la source du signal, leur prolifération et enfin la formation des tubes. Il a été démontré que les cellules endothéliales sécrètent des protéases qui leur permettent de se frayer un chemin dans la tumeur. Certains facteurs de croissance ont été identifiés comme étant indispensables pour provoquer l'ensemble des quatre étapes. Le « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF) est la protéine grâce à laquelle les tumeurs acquièrent leur vascularisation.

6. L'invasion tissulaire et la formation de métastases

Pour se propager dans l'organisme, les cellules d'une tumeur solide doivent pouvoir s'échapper du tissu d'origine, creuser au travers d'autres tissus pour rejoindre un vaisseau sanguin ou lymphatique, traverser la lame basale et la paroi endothéliale du vaisseau afin d'entrer dans la circulation, réussir à sortir de la circulation dans une autre région de l'organisme et survivre et proliférer dans leur nouvel environnement. Pour réussir chacune de ces étapes, la cellule et son environnement doivent subir de nombreuses transformations anormales. Entre autres, la perte de l'adhérence intercellulaire intervient à la suite de l'altération de l'expression de la Cadhérine E. La pénétration dans les tissus est le résultat de la surexpression de protéases. Les modifications de l'expression des intégrines favorisent aussi la capacité migratoire des cellules de la tumeur solide.

La plupart de ces caractéristiques fonctionnelles spécifiques des cellules tumorales sont le résultat de modifications des séquences d'ADN du génome. Mais

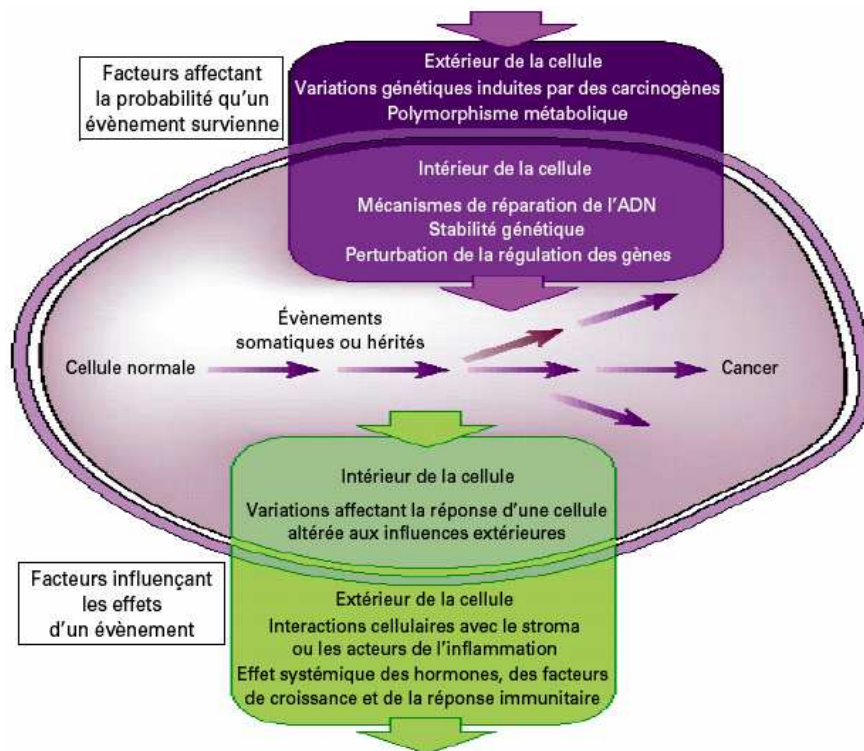


Figure 1: Représentation des événements génétiques impliqués dans le développement d'un cancer. (Ponder et al., 2001)

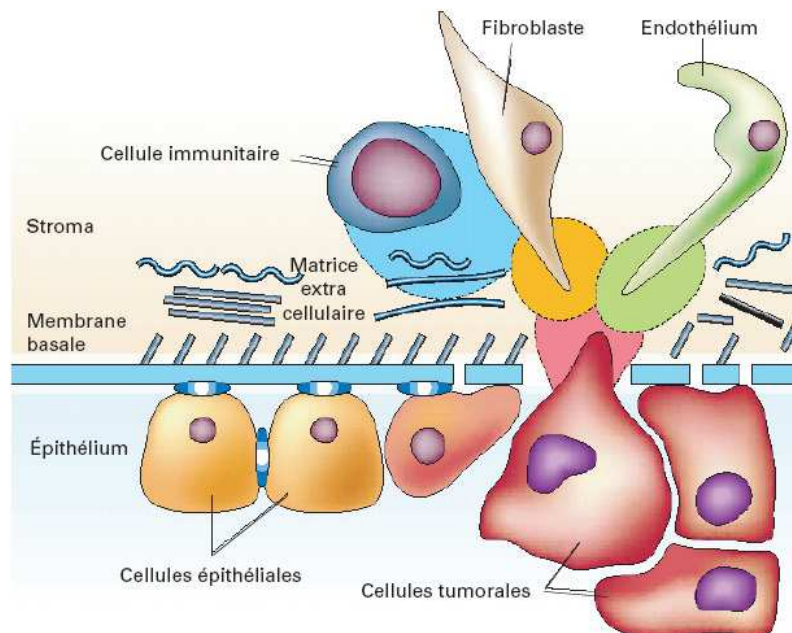


Figure 2 : Microenvironnement du champ d'invasion de la tumeur. (Liotta et al., 2001)

la mutation de certains gènes n'est pas suffisante pour générer une tumeur maligne grâce au contrôle incessant du dispositif d'intégrité du génome et de ses enzymes de réparation. Ainsi les mutations persistantes sont des événements rares. Pourtant de multiples mutations sont identifiées dans le génome des cellules tumorales. Pour qu'un cancer se déclare, il faut que des événements extérieurs augmentent le taux de mutation.

B. Facteurs influençant l'évolution du cancer

De nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer l'évolution d'un cancer (Figure 1). Les événements génétiques responsables de la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse sont le plus souvent d'origine somatique, bien que pour certains cancers les mutations génétiques sont héréditaires. Il est également aujourd'hui admis que certains gènes, appelés proto-oncogènes et présents dans les cellules normales, peuvent être activés en oncogènes et acquérir ainsi le pouvoir de transformer une cellule normale en cellule maligne en stimulant la prolifération cellulaire (Bishop, 1981). De même, il existe au sein de chaque cellule des gènes appelés anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs qui, contrairement aux oncogènes, sont inactivés au cours du processus de tumorigenèse.

C. Micro-environnement : interface hôte et tumeur

Les événements génétiques à la base de la tumorigenèse sont accompagnés d'une dérégulation du micro-environnement à l'interface entre l'hôte et la tumeur. Au cours de ces interactions, l'hôte va participer à l'expansion des cellules néoplasiques qui recrutent son stroma et son système vasculaire pour leur développement et l'invasion des tissus voisins (Liotta and Kohn, 2001). Le passage d'un carcinome au stade invasif est précédé, voire concomitant, à une activation du stroma. Ce stroma comporte de nouveaux vaisseaux (néovaisseaux) qui assurent la vascularisation et l'alimentation du tissu cancéreux, des cellules proinflammatoires (comme les macrophages), des lymphocytes, des fibroblastes à l'origine des fibres de soutien (Figure 2). Par la suite, certaines cellules pourront quitter ce stroma via la vascularisation mise en place, se retrouvant ainsi dans la circulation générale.

Chapitre 2

Les mécanismes de la réponse immunitaire anti-tumorale

Ces dernières années, les progrès de l'immunologie ont permis d'identifier les effecteurs cellulaires impliqués dans les réponses immunitaires anti-tumorales. Ces réponses impliquent l'immunité innée et l'immunité spécifique adaptative.

La réponse immunitaire innée intervient dans la réponse anti-tumorale en précédant et facilitant la réponse immunitaire acquise, spécifique d'Ag. Cette réponse est par définition non spécifique et médiée par différents types cellulaires notamment les cellules NK (NK ; Natural Killer), NKT (NKT ; Natural Killer T cells), les lymphocytes $T\gamma\delta$ et les cellules phagocytaires. Ces cellules sont activées en réponse à certains stimuli inflammatoires locaux et/ou ligands exprimés ou réprimés à la surface des cellules tumorales.

La réponse immunitaire adaptative comprend l'immunité à médiation cellulaire, dans laquelle les lymphocytes T (L_T) jouent un rôle central, et l'immunité à médiation humorale médiée par les lymphocytes B (L_B). Parmi ces différents types cellulaires impliqués, les L_T cytotoxiques (CTL ; cytotoxic T lymphocyte) constituent des effecteurs privilégiés de la réponse immunitaire anti-tumorale.

Les réponses immunitaires anti-tumorales sont la conséquence d'un jeu de communication complexe assuré par des contacts intercellulaires, où les cellules dendritiques (DC ; dendritic cells) jouent un rôle central, et par la production de médiateurs cellulaires tels les cytokines et les chimiokines. Dans ce chapitre, nous décrirons les différents intervenants de la réponse immunitaire anti-tumorale à médiation cellulaire spécifique Ag, leurs modes d'interactions via les molécules d'histocompatibilité humaine (HLA ; Human Leucocyte Antigen) ainsi que leurs mécanismes d'action.

A. Les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles

Trois grands types cellulaires peuvent jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Parmi ces cellules, seules les DC et les L_B sont réellement impliquées dans la réponse anti-tumorale à médiation cellulaire, mais le rôle des macrophages dans l'induction d'une réponse immune innée permet le déclenchement de signaux d'alerte pour la mise en place d'une immunité protectrice plus efficace telle l'immunité à médiation cellulaire. C'est pourquoi je détaillerai dans ce chapitre les trois types cellulaires les plus majoritaires.

1. Les macrophages

Les monocytes originaires de la moelle osseuse sont immatures. Ils circulent dans le sang, et peuvent migrer vers les organes et tissus de l'organisme, où ils deviennent alors des macrophages différenciés. Ces macrophages sont distribués dans tout l'organisme, comme le foie (appelés alors cellules de Kupfer), la rate, les ganglions lymphatiques, le cerveau, les poumons, les cavités séreuses (pleurale et péritonéale), le tractus gastro-intestinal, etc. Ils expriment de façon constitutive les molécules HLA à leur surface et possèdent une activité phagocytaire très importante qui leur permet d'ingérer des micro-organismes ou des débris cellulaires. L'efficacité d'internalisation de substances antigéniques peut être modulée par leur ciblage sur des récepteurs présents à leur surface, ce qui permet, par conséquent, d'accroître leur efficacité de présentation. Parmi ces nombreux récepteurs, nous pouvons citer les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines (Ig) de type G (RFcg) et A (RFca), les récepteurs de polysaccharides (le mannose, par exemple) reconnaissant les glycoprotéines des agents microbiens, et les récepteurs pour les protéines de la famille des $\alpha 2$ -macroglobulines ayant la propriété de fixer de façon covalente d'autres protéines lors de changements conformationnels induits par des enzymes (tels les récepteurs pour les fragments C3 ou C4 du complément)

Les macrophages sont également capables de présenter des Ag exogènes sur leur molécule HLA de classe I (HLA-I) aux $L_T CD8^+$ (Voie de présentation croisée de l'Ag dont nous parlerons plus tard). Pour autant, l'absence ou le faible niveau d'expression de molécules de co-stimulation ne leur permet pas d'activer les lymphocytes naïfs, comme le font les DC. Seule leur contribution à l'activation de CTL spécifiques d'Ag mémoires a été démontrée (Duffield, 2003).

2. Les Lymphocytes B

Les L_B sont assez peu efficaces pour la capture d'Ag par micro-pinocytose. Cependant, elles peuvent les fixer grâce à leurs Ig de surface de type IgM. La spécificité de l'IgM pour un Ag donné permet de concentrer cet Ag et de le présenter aux cellules T à des doses 1000 fois inférieures à celles nécessaires pour activer ces mêmes cellules T lorsque les L_B sont non-spécifiques de l'Ag. Les IgM sont continuellement internalisées, qu'elles soient liées ou non à un Ag. La fixation d'un Ag sur une IgM à la surface du L_B permet le transport de cet Ag vers les compartiments endosomaux et lysosomaux de la cellule B. A ce niveau, l'Ag est dégradé en fragments peptidiques, chargés sur les molécules HLA-II, exportés vers la surface cellulaire pour être présentés aux cellules T auxiliaires. Ce processus est essentiel pour l'interaction entre les cellules T et B conduisant à l'activation et à la différenciation des L_B en plasmocytes, producteurs d'anticorps.

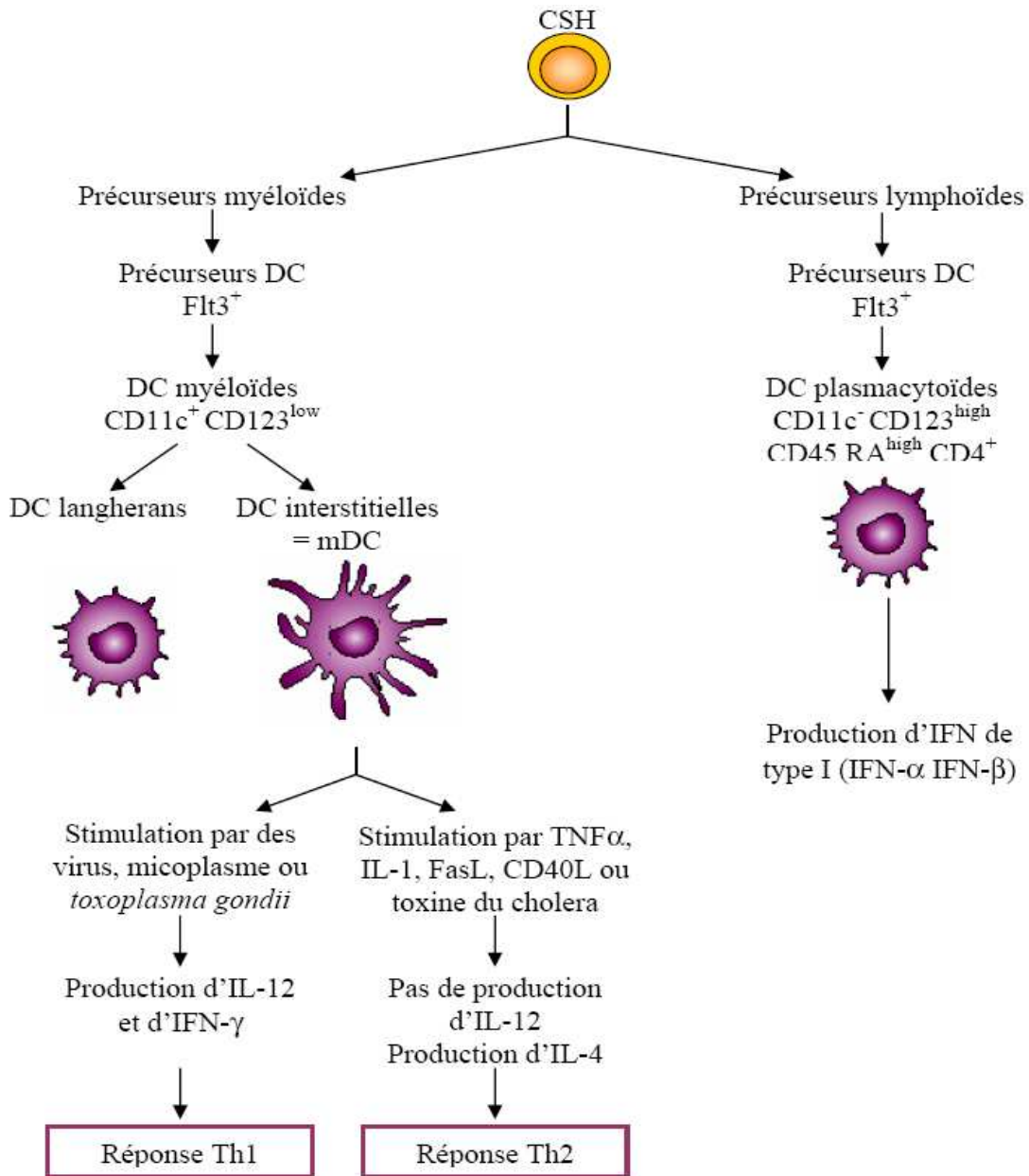


Figure 3 : La plasticité des DC humaines

Les DC humaines peuvent être classées en divers types cellulaires selon les stimuli qu'elles reçoivent. Les précurseurs de la lignée myéloïde (CD11c⁺) et lymphoïde (CD11c⁻) de ces DC expriment le Flt3/ Ainsi, il est possible d'isoler ces précurseurs par traitement au Flt3-L. Il est ensuite possible de générer des mDC homogènes quand les monocytes sont cultivés en présence de GM-CSF et IL-4. Parallèlement, il est possible de différencier des progéniteurs CD34⁺ ou des monocytes du sang périphérique en cellules de Langherans, capables de stimuler des réponses CTL, et en cellules interstitielles, capables de différencier les LB en plasmocytes.

3. Les cellules dendritiques

Contrairement aux macrophages et aux L_B , les DC sont des CPA professionnelles. En effet, elles ont la capacité d'induire l'activation d'une réponse immune primaire *in vivo*, et d'assurer son contrôle; C'est pourquoi elles méritent seules, le titre de CPA professionnelles.

Les DC immatures résident dans les tissus. Issues des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse elles peuvent, selon leur localisation, dériver de la lignée lymphoïde ou de la lignée myéloïde. De façon générale, les DC ont pour fonction d'apprêter et de présenter des Ag aux L_T de façon à activer le système immunitaire adaptatif. Elles deviennent alors des DC dites matures.

Environ 30 ans après leur première description par R. Steinman (Steinman and Cohn, 1973), une grande diversité de populations de DC ont été décrites (Figure 3). Cette diversité leur confère la capacité à intervenir à tous les stades de la réponse immunitaire, que ce soit pour la délétion de thymocytes réactifs aux Ag du soi, pour la génération de cellules effectrices et mémoires, ou pour l'induction d'une tolérance périphérique (Banchereau and Steinman, 1998).

3.1. Les différents sous-types de DC

Les DC sont produites dans la moelle osseuse en réponse à des facteurs de croissance et de différenciation, tels le Flt3-L (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) et le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor). En règle générale, 4 étapes de différenciation sont admises pour tous les sous-types de DC : les précurseurs de DC, les DC immatures, les DC semi-matures et les DC matures. Chez l'homme, on distingue :

- les populations d'origine lymphoïde, appelées DC plasmacytoïdes (pDC) de phénotype CD11c⁻ CD123⁺, exprimant les récepteurs à l'interleukine 3 (IL-3Ra). Ces pDC sont retrouvées dans les organes lymphoïdes et le sang et sont les principales productrices d'interféron (IFN) de type I.

- les populations d'origine myéloïde, de phénotype CD11c⁺ CD123^{+/-}, regroupant les cellules de Langerhans et les DC myéloïdes (mDC). Les cellules de Langerhans sont localisées dans la peau et les épithéliums muqueux. Elles ont pour marqueur spécifique la Langerhine qui est un composant majeur des granules de Birbeck. Les mDC (ou DC interstitielles) sont localisées dans les tissus interstitiels, dont notamment le derme, et expriment le marqueur DC-SIGN.

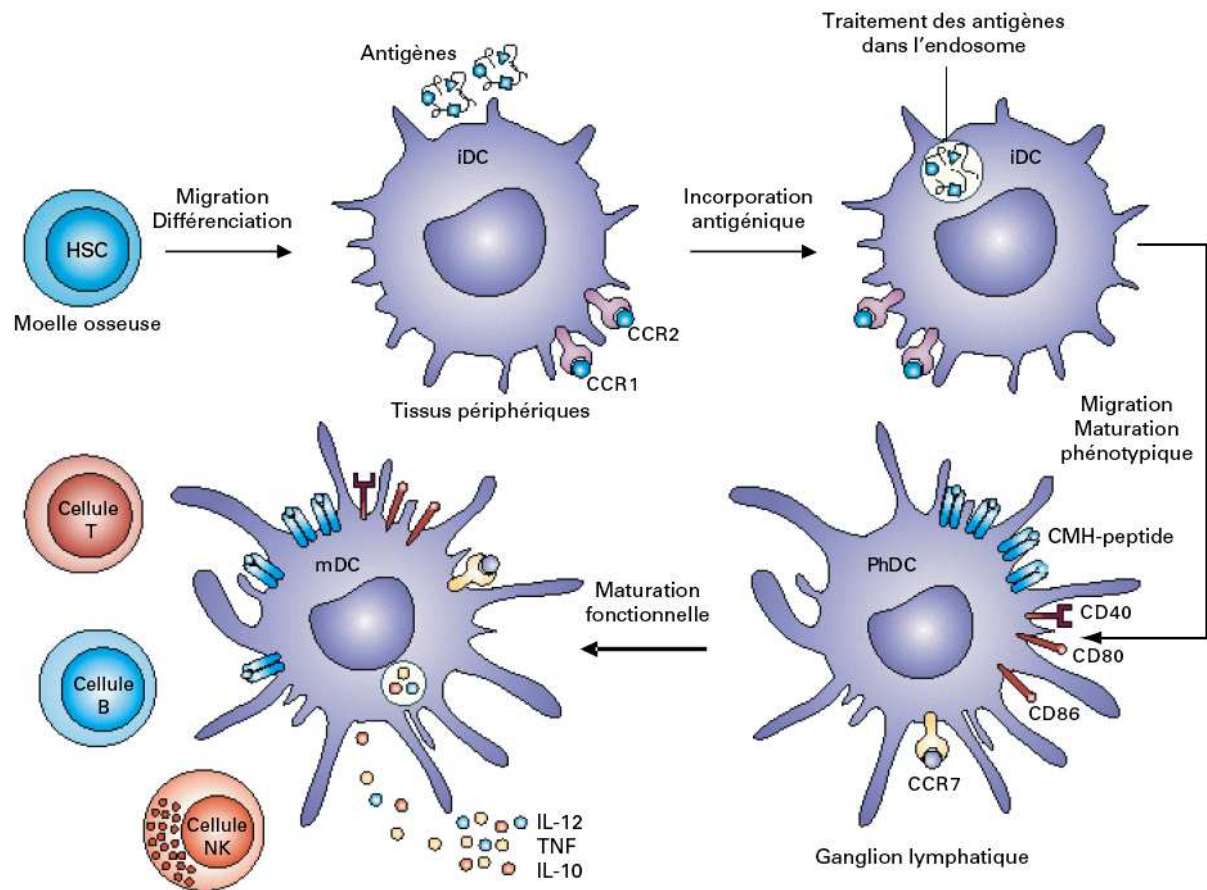


Figure 4 : Maturation des cellules dendritiques (Hackstein et al., 2004)

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) se différencient en cellules dendritiques immatures (iDC), présentes au niveau des tissus périphériques, où elles internalisent et traitent des antigènes. Ce phénomène va permettre l'activation des iDC qui vont surexprimer des marqueurs de surface (CD40, CD80, CD86), des récepteurs aux chimiokines (CCR7) et des molécules du CMH (stade intermédiaire de maturation phénotypique (PhDC)). Dans les organes lymphoïdes secondaires, elles vont activer les lymphocytes T et B via les molécules HLA, et les cellules NK. Elles acquièrent le stade de maturation fonctionnelle (mDC) et sécrètent des cytokines inflammatoires.

3.2 Maturation des DC et présentation d'antigènes

Les mDC immatures jouent le rôle de sentinelles dans les tissus périphériques et alertent le système immunitaire d'un danger (pathogènes, signaux inflammatoires...) en initiant après maturation une réponse immunitaire innée et /ou adaptative dans les organes lymphoïdes secondaires. En revanche, les pDC se localisent principalement dans le sang et les ganglions drainants. Ces dernières joueraient plutôt un rôle dans la réponse anti-virale en modulant la réponse immunitaire induite par les mDC immatures, notamment en influant sur les cellules T, B et NK selon les cytokines et les chimiokines qu'elles sécrètent.

Lorsqu'elles se trouvent dans les tissus périphériques, les DC «immatures», sont capables d'ingérer les Ag par des mécanismes de phagocytose, de macropinocytose ou d'endocytose médiés par des récepteurs, tels les RFc γ ou le mannose (Regnault et al., 1999). Leur capacité à phagocyter des Ag particuliers reste assez controversée, et ceci pourrait s'expliquer par la très grande hétérogénéité morphologique et fonctionnelle de ces cellules en fonction de leur état de différenciation, en particulier après les multiples étapes nécessaires à leur isolement et leur culture *in vitro*. Ainsi, rapidement après leur isolement de la peau, les cellules de Langerhans sont capables de phagocyter des levures, des bactéries ou des particules de latex (Schnorrer et al., 2006). Cette aptitude de phagocytose est fortement diminuée au cours de leur maturation *in vitro*, tandis qu'elles acquièrent des propriétés de costimulation importantes. Par ailleurs, des précurseurs de DC issus de la moelle osseuse phagocytent des bactéries comme le BCG ou des particules de latex alors que des DC provenant du thymus ou du sang périphérique humain en sont incapables. La capacité de capture de l'Ag semble également régulée par les cytokines employées *in vitro* pour la culture des DC. En effet, la culture de cellules mononuclées humaines CD14⁺, CD19⁻, CD2⁻, provenant du sang périphérique, en présence de GM-CSF et d'IL4 leur confère la capacité d'internaliser des substances exogènes par un processus de macropinocytose. Quoiqu'il en soit, la présence dans leur environnement de composants microbiens, de molécules associées à l'inflammation ou issues de l'endommagement de tissus, sont autant de signaux de danger qui entraînent leur activation (ou maturation) se traduisant par (Figure 4) :

- * L'atténuation de leur capacité de phagocytose
- * L'amplification de leur capacité à apprêter les Ag
- * L'augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation CD40 et CD86, de molécules d'adhésion (CD54, CD58), de molécules de maturation CD83 et la sécrétion de cytokines (IL-12, IL4), impliquées dans la formation de la synapse immunologique et régulant la nature des réponses immunes induites (Th1 *vs* Th2)
- * Leur migration dans les organes lymphoïdes secondaires, au niveau de la zone

des L_T , *via* la régulation différentielle de récepteurs de chimiokines tels CCR1, CCR5 et CCR7

- * La sécrétion de chimiokines qui recrutent les monocytes, les DC et les L_T dans l'environnement local
- * La formation de dendrites due à une réorganisation du cytosquelette, favorisant les contacts intercellulaires par augmentation considérable de leur surface membranaire.

Après avoir capté un Ag, les DC sont donc capables de migrer vers les zones T des organes lymphoïdes pour activer les cellules T spécifiques de l'Ag. Les DC sont impliquées aussi bien dans la présentation d'Ag aux cellules T CD4+ restreintes par les molécules HLA de classe II (HLA-II) que dans la présentation aux cellules T CD8+ potentiellement cytotoxiques, et restreinte par les molécules HLA-I. L'excellente efficacité de présentation de l'Ag par les DC est attribuée notamment par le niveau d'expression élevé des molécules HLA-I et HLA-II et des molécules de co-stimulation à leur surface.

La maturation des DC conduit donc à une diminution de leur capacité à capter des Ag, au profit d'une meilleure aptitude à présenter des épitopes (ou peptides) issus de la dégradation de ces Ag.

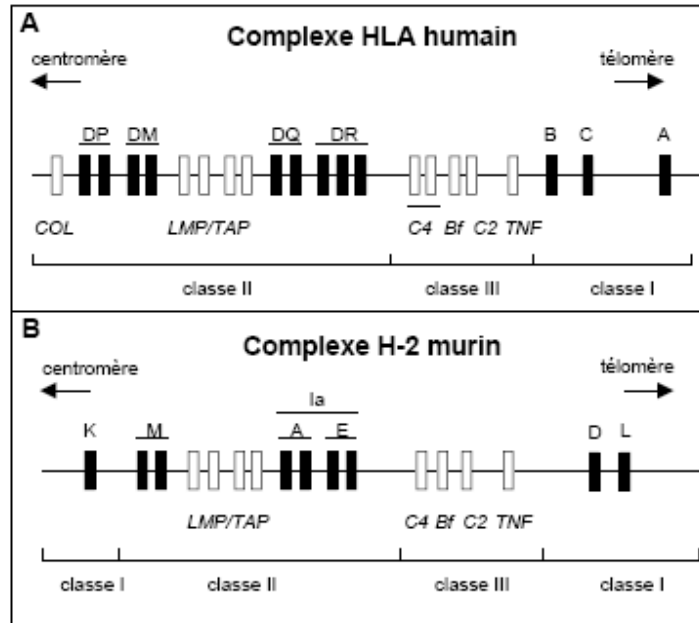


Figure 5 : Schéma simplifié de l'organisation génétique des complexes majeurs d'histocompatibilité humain (A) et murin (B)

Les gènes représentés par des rectangles noirs correspondent aux gènes exprimés. Ceux schématisés par des rectangles blancs sont des pseudogènes défectifs associés à la région CMH. Les gènes ne sont pas représentés à l'échelle.

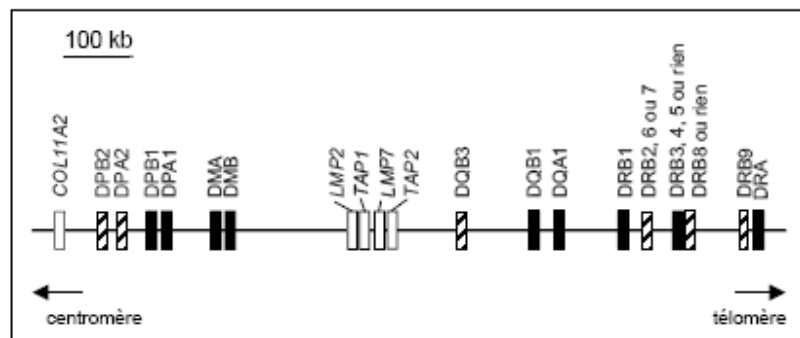


Figure 6: Organisation de la région HLA de classe II

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

B. Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Les molécules du CMH « Complexe Majeur d'Histocompatibilité » ont pour fonction principale de signaler aux L_T la présence de structures étrangères ayant réussi à pénétrer à l'intérieur de nos cellules. Pour cela, elles prennent en charge des peptides provenant de la dégradation de protéines endogènes ou de cellules mortes, ou des peptides issus de la dégradation de micro-organismes. Elles les acheminent à la surface des cellules pour y accomplir leur fonction de signalisation à l'égard des L_T . A l'origine, elles furent identifiées comme l'un des principaux facteurs responsables des rejets de greffe. Sa découverte fut saluée par le Prix Nobel de Médecine 1980 décerné aux docteurs Dausset, Snell et Benacerraf. Chez l'homme et la souris, le CMH prend respectivement le nom de HLA et H-2 « Histocompatibility 2 ». Ils existent deux grandes classes de molécules HLA, les molécules HLA de classe I (HLA-I) (HLA A, B, C) et les molécules HLA de classe II (HLA-II) (HLA DP, DQ, DR) qui présentent des peptides antigéniques aux L_T CD8+ et CD4+ respectivement. Bien qu'elles montrent une forte convergence structurale globale du site de liaison des peptides, ces molécules se différencient cependant à plusieurs niveaux : structure fine, mode de liaison des peptides et distribution histologique (Madden, 1995).

1. Organisation générale de la région du CMH

Le CMH a une organisation relativement bien conservée dans toutes les espèces. Chez l'homme, le système HLA est un ensemble de gènes localisés sur un segment du bras court du chromosome 6 (Morton et al., 1984) et s'étend sur 2 à 3 centimorgans d'ADN soit environ 4.10^6 paires de bases. Quarante-six gènes y sont répertoriés (Trowsdale et al., 1991). Ils sont répartis en trois régions : les régions de classes I, II et III. Cependant, seule une minorité de ces gènes correspond à des gènes ou des pseudogènes de classe I (13 gènes) ou de classe II (23 gènes). Les organisations génomiques des gènes du CMH de l'homme et de la souris sont schématisées Figure 5.

La région de classe I chez l'homme contient une vingtaine de gènes dont trois uniquement (HLA-A, -B et -C) sont exprimés. Le gène HLA-E n'est que faiblement exprimé et le gène HLA-H est un pseudogène. L'expression du gène HLA-G est restreinte aux cellules NK et du placenta. Les équivalents chez la souris des gènes HLA-I sont K, D et L.

Chez l'homme, la région de classe II contient 23 à 25 gènes et pseudogènes. Elle comprend 6 à 7 locus efficacement exprimés en molécules HLA-II (Figure 6) : deux ou trois codant les molécules HLA-DR (DRA et un ou deux DRB), deux codant les molécules HLA-DQ (DQA et DQB) et deux codant les molécules HLA-DP (DPA et DPB). Les gènes A et B correspondent respectivement à chacune des chaînes α et β

des molécules HLA-II. Il existe plusieurs gènes DRB exprimés : DRB1 pour la première molécule DR qui est toujours présente, et l'un des gènes DRB3, DRB4 ou DRB5 (mutuellement exclusifs) pour la deuxième molécule qui n'est pas nécessairement présente. De plus, 5 pseudogènes DRB (DRB2, DRB6 à 9) ont été décrits dans cette région.

La région de classe II contient également les gènes DMA et DMB qui codent pour la molécule HLA-DM et les gènes DOA et DOB qui codent pour la molécule HLA-DO. Ces molécules sont des molécules de classe II dites « non classiques ». Elles sont absentes de la surface cellulaire et ne fixent pas de peptides dans leur propre niche mais jouent un rôle dans le chargement des Ag sur les molécules classiques afin de donner naissance à des complexes stables. La région de classe II contient également six gènes peu ou pas transcrits et onze gènes non apparentés dont la fonction n'est pas liée à la présentation des peptides par les molécules HLA-II. Il s'agit en particulier des gènes codant pour le collagène (gène COL11A2), pour les deux chaînes du transporteur de peptides TAP (TAP1 et TAP2) et pour les deux unités du protéasome (LMP2 et LMP7). Bien que ces gènes soient localisés à proximité de ceux codant pour les molécules de classe II, l'ensemble protéasome-transporteur constitue un élément majeur de la machinerie alimentant en peptides les molécules de classe I néosynthétisées.

Les équivalents chez la souris des gènes HLA-DR et HLA-DQ sont les gènes I-E et I-A respectivement.

Enfin, la région de classe III comporte des gènes dont la fonction n'intervient pas dans la présentation des peptides et codant pour des protéines du complément (C2, C4A, C4B et facteur B), pour les cytokines TNF- α et β , pour la 21-hydroxylase (enzyme impliquée dans la synthèse des stéroïdes), et pour des protéines de choc thermique (Hsp70 1H et Hsp70 2).

2. Le polymorphisme des molécules HLA

Les gènes codant pour les molécules HLA sont les plus polymorphes du génome humain. A cause de l'implication de ces molécules dans la transplantation d'organes, leur polymorphisme a été décrit très en détail. La variabilité correspond au degré de différence entre deux gènes (ou molécules). Elle est mesurée par le pourcentage de nucléotides (ou acides aminés) différents entre les objets considérés. Le polymorphisme se définit, quant à lui, au niveau d'une population. Un locus est polymorphe lorsqu'il présente au moins deux allèles dans la population avec une fréquence d'au moins 0,01. Bien qu'elle soit le support du polymorphisme, la variabilité ne le définit pas. Le nombre d'allèles existants pour les différentes classes de molécules HLA ainsi que leurs partenaires sont représentés dans le Tableau 1.

Alleles	populations aucasiennes				Autres		
	France	Allemagne	USA Caucasien	USA noir	Senegal	Indes	Japon
HLA-A1	14,6	17	16,6	5,3	4,9	11,1	0,7
HLA-A2	20,9	26,6	27,9	17,3	18,6	12,1	24,1
HLA-A3	9,2	14,2	11,4	8,9	5,8	7,9	0,6
HLA-A11	5,7	5,5	5,3	2,6		15,9	10,4
HLA-B7	7,4	11,1	9,8	8	4,4	9,5	5
HLA-B8	7,6	9,4	10	3,1	6	3,8	
HLA-B18	5,2	3,7	4,7	3,2	4,5	2,5	
HLA-B27	3,4	3,9	3,9	1,8	1,9	2,8	0,4
HLA-B35	8,2	9	8,6	8,3	13,9	12	8,1
HLA-C2	5,1	7,7	5,4	10,1	7,6	2,5	12,2
HLA-C4	10,9	11,8	9,6	21,2	18,1	14	4,3
HLA-C7	20,9	28,6	21,6	18,2	12,5	11,2	1,1

Tableau 2: Fréquences géniques (en %) de différents allèles HLA-I

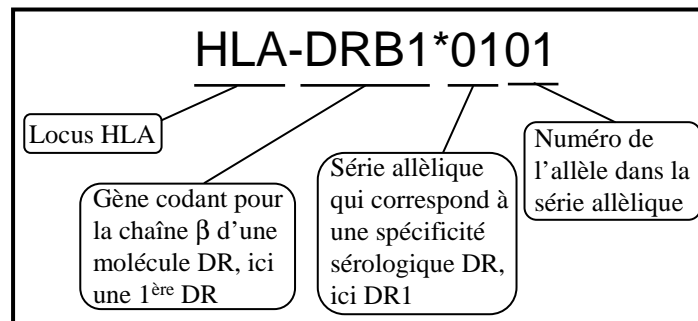


Figure 7: Principe de nomenclature des allèles HLA-DRB

La nomenclature des allèles HLA-DRB repose sur la correspondance établie entre les spécificités sérologiques HLA-DR et les allèles HLA-DRB (voir tableau 8). Le nom de chaque allèle indique 1) le locus DRB (DRB1, DRB3, DRB4 ou DRB5), 2) la série allélique, qui correspond en fait à une spécificité sérologique, et 3) le numéro de l'allèle dans la série allélique.

Classe I					
A	B	C	E	F	G
429	748	217	8	20	23
Classe II					
DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1
3	511	32	69	23	121
Machinerie d'Apprêtement					
TAP1	TAP2	DMA	DMB	DOA	DOB
7	4	4	7	12	9

Tableau 1 : Nombre d'allèles pour les différents locus de la région HLA. Janvier 2006, 2153 allèles différents ; HLA de Classe I : 1394 et HLA de Classe II : 759 (*Présentation de Mme Hélène Moins-Teisserenc, 2006*)

2.1. Polymorphisme des molécules HLA de classe I

Le polymorphisme de la région HLA de classe I est lié aux différents allèles. Les fréquences géniques des principaux groupes d'allèles codés par les gènes HLA-I sont présentées dans le Tableau 2. On remarque que leur distribution n'est pas uniforme et varie d'une population à une autre. On peut également noter que les molécules HLA-A2 font partie des molécules HLA-I les plus fréquentes dans les populations caucasiennes.

2.2. Polymorphisme des molécules HLA de classe II

Le polymorphisme de la région HLA-II est également lié aux différents allèles mais aussi à l'association des gènes codant pour ces molécules formant des haplotypes. La description de ce polymorphisme est le résultat de l'application successive de diverses techniques sur 20 ans de recherche. Aujourd'hui, la nomenclature repose sur les allèles définis par leur séquence nucléotidique. L'attribution d'un nom à un allèle repose sur la correspondance spécificités - allèles (Figure 7).

a) Fréquences des allèles dans la population

Les fréquences géniques des différents allèles codés par les gènes HLA-II ont été mesurées dans différentes populations à travers le monde. La distribution des différents allèles de classe II n'est pas uniforme dans la population mondiale et varie d'une population à l'autre. Le Tableau 3 est un extrait des résultats obtenus pour les allèles DRB1. En France, seuls sept allèles dépassent les 5%. Il s'agit des allèles DRB1*0101, *0301, *0401, *0701, *1101, *1301 et *1501. Ils représentent à eux seuls 63% de la fréquence génique, autrement dit 86% des individus possèdent au moins un de

ALLELES	POPULATIONS CAUCASIENNES								AUTRES	
	FRA	DAN	GER	ITA	ROUS	SPA	US	CAN	SEN	JAP
DRB1*0101	9,3	13,0	6,7	6,5	7,6	6,6	7,3	5,6	0,6	4,9
DRB1*0301	10,9	10,2	9,4	10,5	11,4	6,7	9,5	12,3	10,2	0,4
DRB1*0401	5,6	17,6	8,1	2,3	4,2	5,6	6,7	9,5	-	1,8
DRB1*0701	14,0	14,8	12,3	12,5	8,3	18,9	14,4	9,4	7,8	0,6
DRB1*1101	9,2	0,9	9,2	12,4	7,3	1,0	4,4	2,6	9,3	2,0
DRB1*1301	6,0	8,3	4,5	4,8	4,4	4,5	5,1	4,7	4,7	0,7
DRB1*1501	8,0	17,6	7,8	5,6	6,2	9,4	10,3	10,4	-	6,8
TOTAL	63,0	82,0	58,0	55,0	49,0	53,0	58,0	55,0	33,0	17,0
DRB1*1304	-	-	-	0,2	-	-	-	-	25,3	-
DRB1*0405	1,6	-	0,6	-	0,7	2,1	0,7	-	0,6	12,3

Tableau 3 : Fréquences géniques (en %) de différents allèles HLA-DRB1

Valeurs tirées de Colombani, 1993. Abréviations : FRA: France, DAN: Danemark, GER: Allemagne, ITA: Italie, ROU: Roumanie, SPA: Espagne, US: États-Unis, CAN: Canada, SEN: Sénégal, JAP: Japon.

ces sept allèles. Ces mêmes allèles sont aussi les plus abondants dans les autres populations caucasiennes. Leurs fréquences géniques cumulées varient en effet de 53% (en Espagne) à 82% (au Danemark), avec respectivement 58 et 55% pour les Etats-Unis et le Canada.

b) Les haplotypes DR et DR-DQ forment des unités de polymorphisme

La distance entre les locus dans une région génomique peut affecter de manière importante la distribution des allèles dans la population. Les locus compris dans de telles régions sont dits en déséquilibre de liaison, ce qui signifie que la transmission à la descendance d'un locus n'est pas indépendante de celle des autres. Les locus contenus dans la région DRA-DRB1 sont soumis à ce phénomène car, comme le montre la Figure 6, cette région est très peu étendue sur le chromosome 6. Les locus ainsi associés forment des blocs ou haplotypes (Andersson et al., 1994). Cinq structures différentes du segment chromosomique DRA-DRB1 ont été décrites et forment les haplotypes DR (Figure 8). Les locus présents dans la région chromosomique DRA-DQB1 sont également en fort déséquilibre de liaison, ce qui définit des haplotypes plus étendus DR-DQ. Au contraire, le déséquilibre de liaison entre DPB1 et le segment DQB1 et DRB1 est faible et très peu d'associations DR-DQ-DP sont significatives.

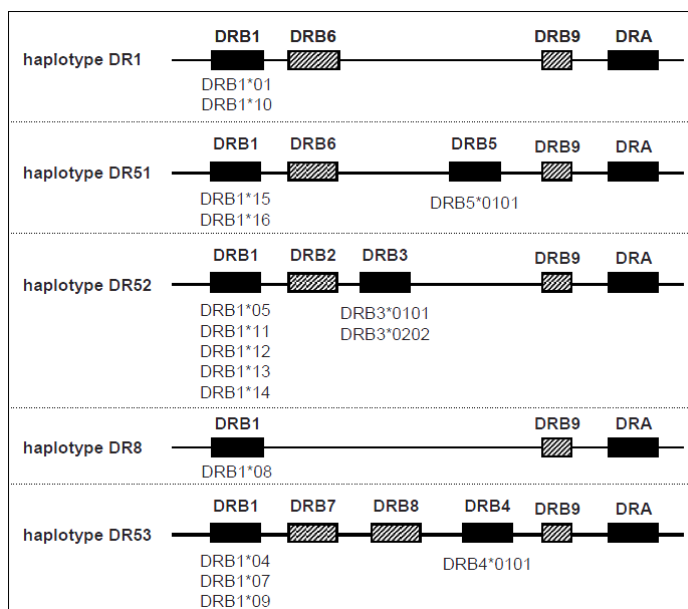


Figure 8 : Représentation schématique des cinq haplotypes HLA-DR

Les gènes exprimés sont représentés par des rectangles noirs, les pseudogènes par des rectangles hachurés. Pour tous les haplotypes, l'allèle DRA exprimé est l'allèle DRA*0101.

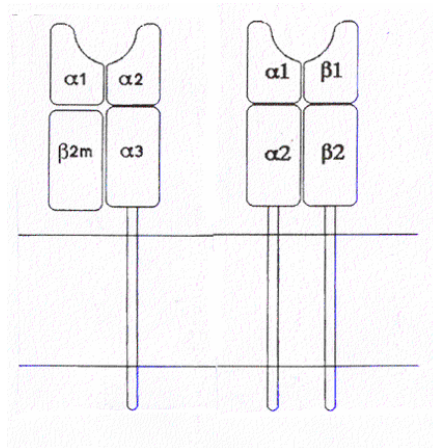


Figure 9 : Schéma général des molécules HLA-I et HLA-II

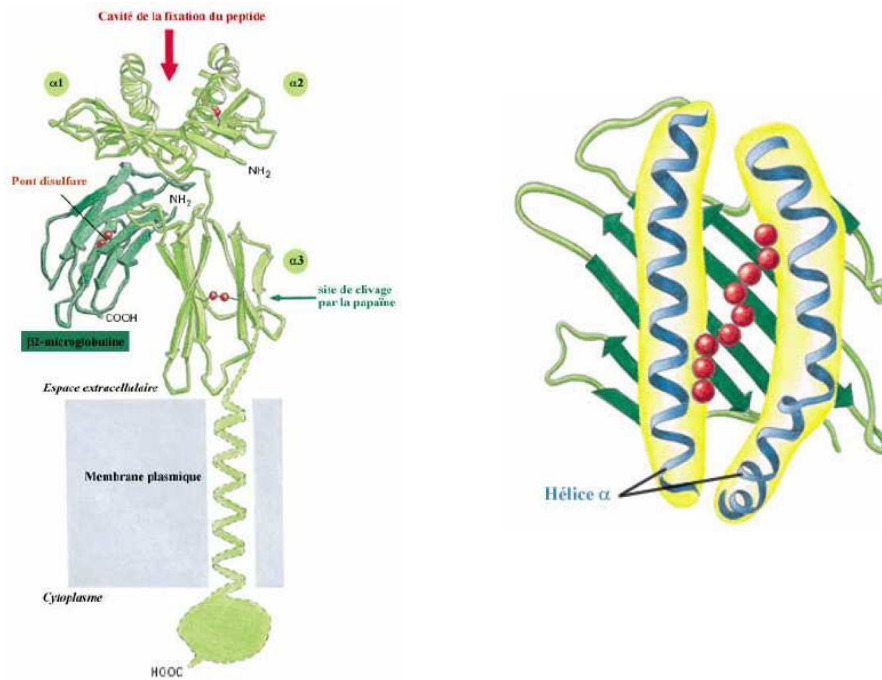


Figure 10 : Structure de la molécule HLA-I et Structure du complexe HLA-I/Peptide (Bjorkman et al., 1985)

La molécule est composée :

- d'une partie intra membranaire et d'une courte queue cytoplasmique
- une chaîne légère invariante $\beta 2$ microglobuline
- une chaîne lourde qui porte la variabilité allélique composée de 3 domaines extracellulaires $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$

La fente de liaison de la molécule CMH I est fermée, les peptides de liaisons sont courts et chaque extrémité du peptide est enfouie dans une poche profonde

3. Les molécules HLA de classe I

3.1. Structure des molécules HLA de classe I

Les molécules du CMH sont des protéines transmembranaires appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Les structures sont schématisées par la Figure 9.

La Figure 10 décrit la structure des molécules du CMH de classe I. Les molécules de classe I sont composées d'une chaîne lourde de 44kDa porteuse de la variabilité allélique. La molécule est organisée en 3 domaines extra-cellulaires $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ associés à la partie intra-membranaire. Elle comporte une courte extension cytoplasmique. Une chaîne légère invariante la $\beta 2$ microglobuline ($\beta 2m$) est associée de façon non covalente à la chaîne lourde. Chez l'homme, l'ensemble des gènes codant pour les molécules HLA sont localisés sur un segment du bras court du chromosome 6 (Morton and Barth, 1996) alors que la chaîne légère $\beta 2m$ est codée par un gène non inclus dans le CMH localisé sur le chromosome 15. Les données radiocristallographiques obtenues sur de nombreux haplotypes de CMH montrent que les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forment un sillon fermé dans lequel vient se lier le peptide antigénique (Sliz et al., 2001). Les peptides accommodés sont courts (8 à 11 aminoacides mais le plus souvent 9).

La stabilité de l'interaction CMH- $\beta 2M$ dépend de la présence du peptide dans le sillon d'ancrage. Au niveau de ce sillon d'ancrage des zones de la chaîne lourde définissent des poches de liaisons (A à F) qui vont conditionner la nature des peptides susceptibles de se lier au CMH (Matsumura et al., 1992).

3.2. Interaction HLA-I/peptide

Le polymorphisme des allèles HLA-I se traduit au niveau fonctionnel par des molécules ayant chacune ses propres propriétés de liaison. L'étude des peptides associés au CMH I a permis de mettre en évidence l'existence de motifs d'ancrage, spécifiques d'un CMH donné, définis par la nature de certains résidus au sein de la séquence peptidique (Rammensee et al., 1995). D'autres résidus du peptide jouent un rôle positif ou négatif sur la liaison du peptide et sont considérés comme des résidus d'ancrage secondaire (Hudrisier et al., 1996).

Le motif d'ancrage défini pour la molécule HLA-A*0201, qui nous intéresse plus particulièrement, est reporté Figure 11 (Ruppert et al., 1993). L'affinité du peptide pour la molécule HLA est assurée par des liaisons hydrogènes engagées entre les chaînes latérales de résidus conservés du CMH au niveau du sillon d'ancrage et les extrémités amino et carboxyterminales du peptide (Matsumura et al.,

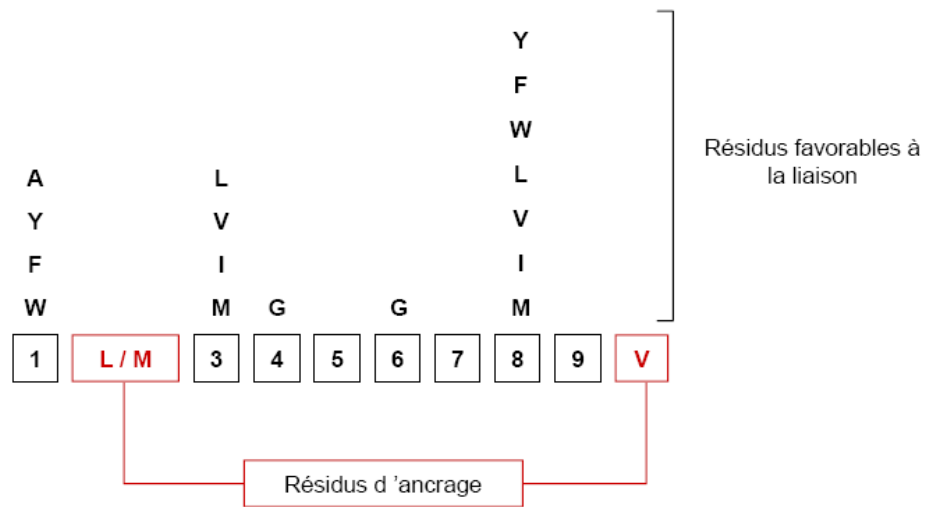


Figure 11 : Motif consensuel d'ancrage des peptides antigéniques de 10 acides aminés à la molécule HLA-A*0201. (*Ruppert et al., 1993*)

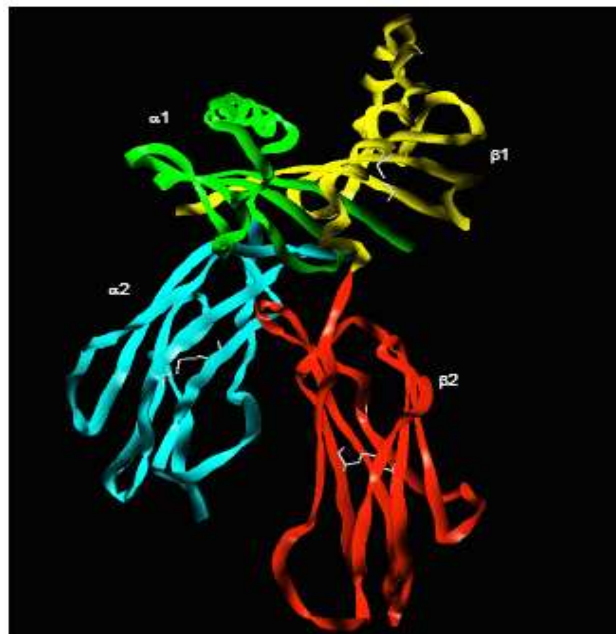


Figure 12: Structure de la molécule HLA-II

La molécule HLA-II est formée de deux chaînes de deux domaines chacune: -chaîne α : $\alpha 1$ (vert), $\alpha 2$ (bleu) -chaîne β : $\beta 1$ (jaune), $\beta 2$ (rouge). Les ponts dissulfures sont indiqués en blanc. (*Figure réalisée par C. Texier avec SYBYL*)

1992). Des liaisons hydrogènes peuvent être engagées entre les chaînes latérales des résidus du peptide, mais aussi avec le squelette peptidique de l'Ag et des résidus du CMH. D'autres types d'interactions intermoléculaires comme les liaisons hydrophobes ou les interactions de van der Waals peuvent être impliqués (Bouvier and Wiley, 1994).

4. Les molécules HLA de classe II

4.1. Structure des molécules HLA-II

Les molécules de classe II sont des glycoprotéines transmembranaires de 55 à 60 kDa composées de deux chaînes associées de façon non covalente : une chaîne lourde α (31 - 34 kDa) et une chaîne légère β (26 - 29 kDa). Chacune des chaînes comporte deux domaines extracellulaires N-terminaux (notés $\alpha1/\alpha2$ et $\beta1/\beta2$) d'environ 90 résidus, chacun suivi d'une région transmembranaire d'une trentaine de résidus puis d'un domaine C-terminal intra-cytoplasmique de 10 à 15 acides aminés (Figures 6 et 12). Chaque domaine $\alpha2$ et $\beta2$ juxta-membranaire se replie en deux feuillets β antiparallèles associés par un pont disulfure. Les deux domaines ainsi formés interagissent entre eux par leur feuillet β et supportent les domaines N-terminaux $\alpha1$ et $\beta1$. Ces derniers, structurellement très proches et symétriques, se replient chacun en un feuillet β antiparallèle surmonté d'une longue région en hélice α d'environ 30 résidus. Ces deux feuillets β , l'un appartenant au domaine $\alpha1$ et l'autre à $\beta1$, s'associent par des liaisons hydrogène pour former un unique feuillet β à huit brins surmonté des 2 hélices α des domaines $\alpha1$ et $\beta1$. De cette dimérisation naît un profond sillon (longueur $\sim 2,5$ nm ; largeur ~ 1 nm) entre les 2 hélices α , ayant comme plancher les chaînes latérales des brins centraux du feuillet β né de l'association $\alpha1$ - $\beta1$ (Jardetzky et al., 1994). Cette cavité, ouverte à ses extrémités, présente 5 poches de taille et de nature physico-chimique différentes selon la protéine de CMH. C'est le site fonctionnel de la molécule de CMH II où se fait la liaison des peptides présentés.

4.2. Interaction HLA-II/peptide

Les molécules HLA-II sont capables de lier un grand nombre de peptides différents, avec toutefois une spécificité qui se manifeste par des préférences ou des incompatibilités pour certains types de chaînes latérales à des positions données du peptide (Rammensee et al., 1995).

Les peptides naturellement présentés par les molécules de classe II ont une longueur qui varie de 12 à 25 résidus, avec une préférence pour 15 acides aminés (Chicz et al., 1993; Rudensky et al., 1991). Des peptides de cette longueur peuvent se fixer car les extrémités du site de liaison sont ouvertes et permettent au peptide de s'étendre de part et d'autre de la cavité. Cependant les études cristallographiques

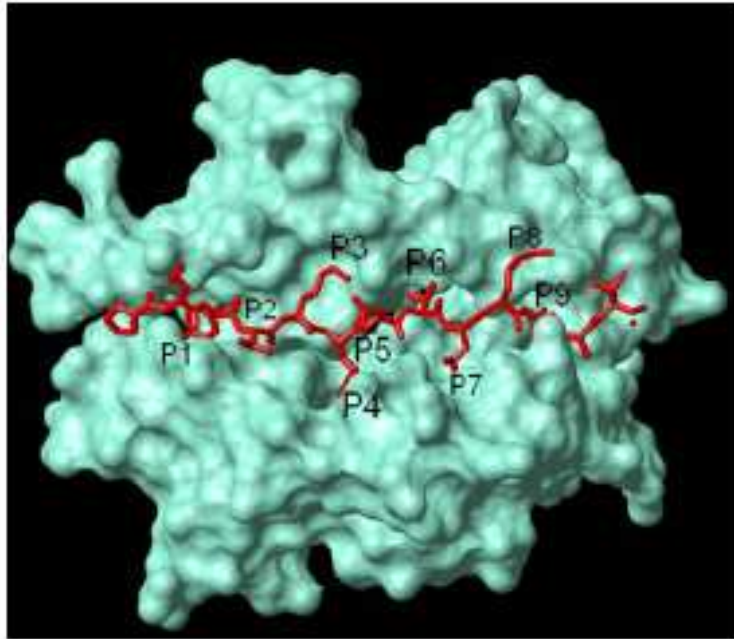


Figure 13: Complexe HLA-II / peptide

Le complexe présenté est celui de DRA / DRB1*0101 (représentée en vert clair par une surface de Van Der Waals) avec le peptide HA 306-318 (en rouge). Les positions du peptide interagissant avec des poches du sillon sont P1, P4, P6, P7 et P9. Les résidus dont les chaînes latérales pointent vers l'extérieur sont P2, P5 et P8. L'acide aminé en P3 présente une situation intermédiaire. (*Figure réalisée par C. Texier avec Molmol*)

rèvelent que seuls 12 à 13 acides aminés bien ordonnés au niveau du site de liaison interagissent avec la molécule (Figure 13). Sur cette zone le peptide adopte une conformation étendue où les chaînes latérales forment successivement un angle d'environ 130°. Cette conformation est caractéristique de l'hélice polyproline de type II (Jardetzky et al., 1996). Elle est maintenue par un réseau de liaisons hydrogène (recouvrant toute la longueur du peptide) entre la chaîne principale du peptide et des résidus - majoritairement conservés - de la molécule HLA. Ce réseau de liaisons non spécifiques maintient le peptide en contact étroit avec le HLA-II. Il est indépendant de la séquence du peptide ainsi que du polymorphisme des molécules de classe II et permet d'expliquer pourquoi une molécule de HLA-II peut lier une grande diversité de peptides différents.

La formation du complexe HLA/peptide met également en jeu des interactions entre certaines chaînes latérales du peptide et les poches du sillon. Les acides aminés du peptide ont été numérotés de P1 à P9 par Stern *et al.* (Stern et al., 1994) en fonction de leur position par rapport aux poches du site de liaison. Ainsi, le résidu en position P1 a sa chaîne latérale enfouie dans la profonde poche hydrophobe située à l'une des extrémités du sillon. Les autres résidus enfouis, ou résidus d'ancrage, sont en position P4, P6, P7 et P9. Les résidus P2, P5 et P8 pointent vers le solvant. Le résidu P3 présente une position intermédiaire. Chaque poche, en fonction de ses caractéristiques (taille, hydrophobicité, charge) accepte certaines chaînes latérales et pas d'autres, ce qui est à l'origine de la spécificité de liaison des molécules HLA-II. La détermination des acides aminés acceptés ou repoussés par chacune des 5 poches de spécificité (P1, P4, P6, P7 et P9) d'une molécule HLA-II donnée permet de définir son motif de liaison.

C'est le polymorphisme des molécules HLA-II qui permet d'avoir des molécules ayant chacune leurs propres propriétés de liaison (motif de liaison). En effet, les acides aminés polymorphes sont concentrés au niveau du site de liaison des peptides.

4.3. Les différences de spécificité de liaison des molécules HLA de classe II

Des différences de spécificité de liaison sont observées entre des molécules d'une même série (allèles différents) mais aussi entre séries comme l'ont décrit Raddrizzani *et al.* en comparant les molécules HLA-DR et HLA-DQ (Raddrizzani et al., 1997).

Pour les molécules HLA-DR, les acides aminés polymorphes sont principalement localisés sur les deux premiers brins β du feuillet $\beta 1$ et sur la première moitié de l'hélice α de ce même domaine. Dix-huit résidus polymorphes

Motifs de liaison des molécules HLA-DR avec une glycine en position β 86

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
DRB1*0101	YFW			LAIV		AGS			
	LIMV			MNQ		TP			
DRB1*0401	YFW			ILVA					
	LIMV			DE		NST			
				no RK		Q			
DRB1*1101	YFW			LVMAF		RKH			AG
	LIMV			Y					SP
DRB1*0701	YFW			DEHK					VIL
	LIMV			NQRS					YF
				TY					

Motifs de liaison des molécules HLA-DR avec une valine en position β 86

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
DRB1*0301	LIF			D		KRTV			
	MV								
DRB1*1301	LIF			LVMA		RK			
	MV			WY					
DRB1*1501	LIF			FYI		ILV			
	MV					MF			

Tableau 4 : Motifs de liaison des molécules HLA-DR

Les résidus des molécules HLA localisés dans les poches P1 (β 86), P4 (β 71) et P6 (β 11) sont indiqués pour chacune des molécules HLA-DR. Les acides aminés des peptides ligands impliqués dans ces deux poches sont encadrés en rouge.

participent directement à l'architecture des poches du sillon qui accommodent les chaînes latérales du peptide ligand. Ils en déterminent les caractéristiques physico-chimiques. Certains de ces résidus ont à eux seuls un effet drastique sur la spécificité de liaison (Tableau 4). Ainsi, la taille de la poche P1 est sous le contrôle du résidu dimorphique $\beta 86$ (glycine/valine) (Davenport et al., 1995). Lorsqu'il y a une glycine à cette position, la poche accepte les chaînes latérales de gros résidus aromatiques (tyrosine et tryptophane) (motif DRB1*0101, DRB1*0401, DRB1*1101 et DRB1*0701). Ces molécules HLA-DR partagent donc un motif de liaison commun au niveau de la poche P1 qui est très impliquée dans la liaison des peptides. Au contraire, lorsque le résidu $\beta 86$ est une valine (motif DRB1*0301, DRB1*01301 et DRB1*1501) la poche P1 accepte plutôt des résidus aliphatiques. Pour ces molécules, l'influence de la poche P1 est moindre quand à leur spécificité de liaison. D'autres résidus polymorphes présents dans d'autres poches interviennent. Au niveau de la poche P4, la liaison d'un résidu chargé négativement est favorisée par la présence d'un résidu avec une charge positive en position $\beta 74$ (DRB1*0301). Au contraire, un résidu apolaire comme une alanine à cette position favorise la liaison d'un résidu aromatique (DRB1*1501) (Ghosh et al., 1995). Pour sa part, la nature du résidu $\beta 11$ contrôle lui la taille et la polarité de la poche P6 (Hammer et al., 1993). Une sérine à cette position favorise la liaison de résidus chargés positivement tel que l'arginine ou la lysine (DRB1*0301, DRB1*01301 et DRB1*1101).

Cependant, c'est principalement une combinaison de résidus polymorphes qui contrôle la spécificité de liaison de chaque poche. Ainsi, pour chaque poche d'une molécule HLA-II donnée, des acides aminés pouvant s'y accommoder ou étant strictement incompatibles, définissent des motifs de liaison qui caractérisent sa spécificité de liaison.

Les spécificités de liaison des molécules HLA-DQ sont différentes de celles des molécules HLA-DR. Par exemple, aucun résidu polymorphe de la poche P1 ne détermine de motif de liaison. De plus, l'équipe de Raddrizzani a montré en 1997 que les molécules HLA-DQ sont moins dépendantes que les molécules HLA-DR de l'interaction avec les chaînes latérales des peptides (Raddrizzani et al., 1997). Les molécules HLA-DQA1*0501/HLA-DQB1*0201 et HLA-DQA1*0302/HLA-DQB1*0301 ont des motifs de liaison principalement composés de résidus inhibiteurs, avec une exception pour le résidu d'ancrage chargé négativement dans la poche P9 (Hammer et al., 1997). Les molécules HLA-DQA1*0301/HLA-DQB1*0301 ont pour principale caractéristique la capacité d'accueillir deux résidus petits et/ou hydrophobes dans les poches P3 et P5 (Sidney et al., 1994).

Les protéines HLA-DP possèdent également des caractéristiques de liaison qui sont différentes de celles de HLA-DR, même si elles suivent des principes similaires. Comme pour les molécules HLA-DR, les résidus polymorphes impliqués dans le site de liaison du peptide sont principalement portés par la chaîne β (Gaston et al., 1997).

(A) DP2 : β 86G β 11G [Chicz et al., 1997]				
Source protein	Residue	P _{ion}	Peptide sequence	Length
Ig λ			1 2345 6 789	
	44-59	1992	DTLR S Y A D W Y Q K P G	16
	188-204	937	Q S NN K Y A ASS Y L S L T P E	17
	189-205	1857	S NN K Y A ASS Y L S L T P E Q	17
	189-204	874	S NN K Y A ASS Y L S L T P E	16
Apolipoprotein A-II	190-204	1659	N N K Y A ASS Y L S L T P E	15
	12-27	1834	L Q S L V S Q Y F Q T V A D Y A	16
	12-26		L Q S L V S Q Y F Q T V A D Y	15
Interferon-induced protein 1-8D	53-65	1528	V P D H V V W S L F N T L	13
Cathepsin S	182-197	1780	G G F M T T A F Q Y I D N K G	16
LR11 mosaic protein	1869-1885	2041	V Y G I F Y A T S F L D L Y R N P	16
HLA-DP α -chain	37-46	1285	D K K E T V W H L E	10
HLA-DP β -chain	40-52	1081	S D V G E F R A V T E L G	13

(B) DP4 : β 86G β 11G [Castelli et al., 2002]								
Résidus	DP401				DP402			
	P1	P4	P6	P9	P1	P4	P6	P9
Favorable	F Y	F Y	F Y W	F Y	F Y	F Y	F Y W	F
	L	L	L	L V M	L	L	L	L V M
		STA		D	A	STA		N
		N				N		
		ED		A		ED		E D
Non-favorable	T A	K R	T A	N	T		T A	Y
	N		N	E	N		N	K R
	E		E	K R	E		E	
	K		K		K		K	

(C) DP9 : β 86D β 11L [Dong et al., 1995]		
Peptide	Position	Sequence
MP-10R11	118-128	G RE V HA A D L L R
MP-10D13	113-125	K DI Q F G RE V HA A D
MP-35Q12	431-442	K LE A E A K A L K E Q
MP-35A18	421-438	T E K E K A E L Q A K L E A E A K A
MP-36L12	442-453	Q L A K Q A E E L A K L

Tableau 5 : Motifs de liaison des molécules HLA-DP2, DP4 et DP9

Les résidus des molécules HLA localisés dans les poches P1 (β 86) et P6 (β 11) sont indiqués pour chacune des trois molécules HLA-DP. Les acides aminés des peptides ligands impliqués dans ces deux poches sont encadrés en rouge. DP2 et DP4, qui possèdent les mêmes acides aminés en β 86 et en β 11 ont des motifs de liaison très proches à l'inverse de DP9 qui a des résidus de nature différente à ces deux positions. Ces observations soulignent l'importance des poches P1 et P6 dans la liaison des peptides aux molécules HLA-DP et l'existence de supertypes de liaison regroupant plusieurs allèles DP partageant une large part de leur répertoire de peptides ligands.

Dix positions polymorphes participent à l'architecture des poches qui accommodent les chaînes latérales du peptide ligand et en déterminent les caractéristiques physico-chimiques. Comme montré dans le Tableau 5, les poches P1 et P6 semblent être les plus impliquées dans la liaison des peptides. P1 et P6 ne contiennent que deux positions polymorphes $\beta 86$ et $\beta 11$ qui sont dimorphiques : $\beta 86$ est soit une glycine soit un aspartate ; $\beta 11$ est soit une glycine soit une leucine. Les molécules possédant une glycine en position $\beta 86$ acceptent dans leur poche P1 de gros résidus aromatiques (DP2 et DP4), contrairement à celles pourvues d'un aspartate (DP9) qui y accommodent des résidus basiques. La chaîne latérale du résidu polymorphe $\beta 11$ est, quant à elle, impliquée dans le contrôle de la taille et de la polarité de la poche P6. Selon le résidu qu'elle possédera à cette position la molécule accommodera soit un gros résidu hydrophobe en présence d'une glycine (DP4) soit un acide aminé aliphatique ou de petite taille si la poche est encombrée par la chaîne latérale de la leucine (DP9).

En conséquence, les acides aminés interagissant dans les poches P1 et P6 sont contrôlés par des combinaisons limitées d'acides aminés. Les deux molécules HLA-DP4 (HLA-DPB1*0401 et HLA-DPB1*0402) ne diffèrent que par trois acides aminés engagés dans la poche P9 mais qui n'influencent pas la sélection de la chaîne latérale de l'acide aminé qui se fixe dans cette poche. Par conséquent, ces deux molécules partagent un motif de liaison très similaire. HLA-DPB1*0201 et HLA-DPB1*0402 ne diffèrent que par un acide aminé impliqué dans la poche P4, ce qui n'influence pas le motif contrôlé par les poches P1 et P6. Ces molécules devraient avoir un répertoire de peptides largement partagé et former un supertype de molécules de HLA-II comme suggéré par Castelli *et al.* (Castelli et al., 2002). Par contre, HLA-DP9 appartient à un autre supertype parce qu'un résidu positivement chargé et un petit résidu hydrophobe servent de résidu d'ancrage dans les poches P1 et P6. En conséquence, Castelli *et al.* proposent que les molécules HLA-DP sont distribuées en trois supertypes majeurs définis par trois combinaisons d'acide aminé : $\beta G11 \beta G86$, $\beta G11 \beta D86$, et $\beta L11 \beta D86$ (Castelli et al., 2002).

5. Distribution histologique et cellulaire des molécules HLA

Les molécules HLA-I (A, B et C) ont une distribution tissulaire et cellulaire quasi-ubiquitaire puisqu'elles sont exprimées à la surface de quasiment toutes les cellules nucléées de l'organisme (sauf au niveau du système nerveux central et des trophoblastes villosités du placenta).

Les molécules HLA-II sont exprimées de façon constitutive, principalement à la surface des CPA. Elles sont également exprimées par les cellules épithéliales du cortex et de la médulla du thymus, mais aussi par les mastocytes et des précurseurs érythrocytaires et granulocytaires. Leur expression est induite chez de nombreuses

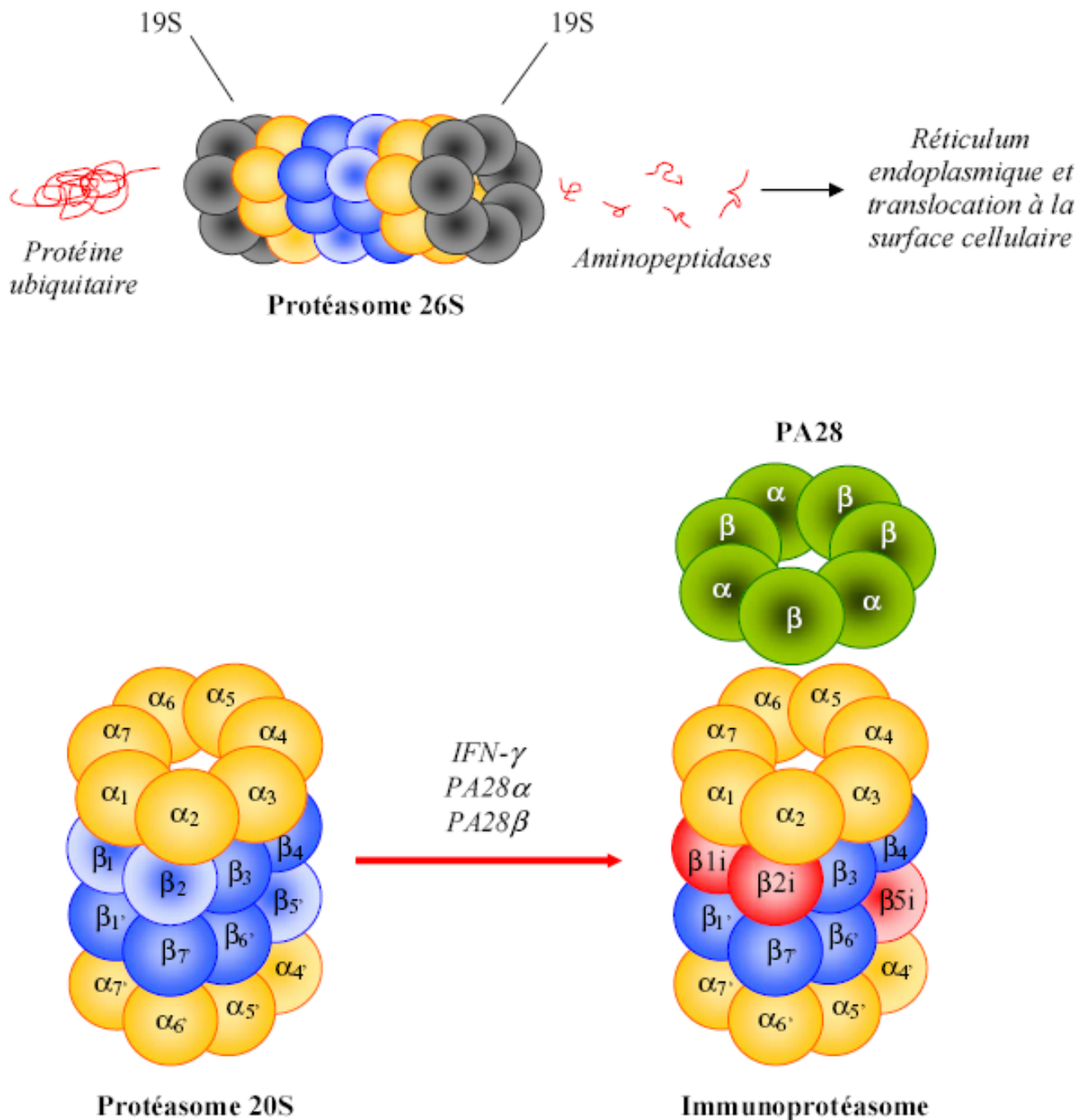


Figure 14 : Le protéasome et l'immunoprotéasome

Le protéasome 26S se compose du protéasome 20S qui porte l'activité catalytique et de deux complexes régulateurs 19S qui permettent la liaison des substrats ubiquitylés, et leur déploiement. L'activité protéolytique est portée par 3 sous-unités β situées dans la lumière du cylindre avec chacune une activité protéolytique distincte : coupure après des résidus hydrophobes (chymiotrypsine), coupure après des résidus basiques (trypsine), et coupure après des résidus acides (caspases). Les complexes régulateurs 19S se composent de 6 sous-unités ATPases et de 9 à 10 sous-unités non-ATPases. Sous l'effet de l'IFN-g, les trois sous-unités catalytiques sont remplacées par trois sous-unités appelées « immuno-sous-unités » : LMP2, LMP7, et MECL-1 (Figure réalisée par S. Delluc)

cellules après leur activation, c'est le cas en particulier des L_B et des L_T chez l'homme. Enfin, certains tissus non lymphoïdes comme les endothéliums capillaires, de nombreux épithéliums (langue, duodénum, épидидyme, sein, trachée...), les glomérules rénaux et la dure-mère ainsi que certaines cellules du foie (LSEC) expriment également les produits de classe II. Il semblerait que leur expression dans ces types cellulaires soit constitutive. Les cellules humaines homozygotes pour chaque locus HLA-II expriment trois ou quatre molécules de classe II selon leur haplotype DR : une ou deux molécules DR, une molécule DQ et une molécule DP (soit un maximum de 6 à 8 molécules exprimées pour les hétérozygotes).

L'induction ou l'augmentation de l'expression des molécules HLA-I et II peuvent être régulées par de nombreux facteurs. L'IFN- γ est une cytokine qui induit leur expression sur un grand nombre de cellules. L'IL-4 et l'IL-13 sont également capables d'augmenter leur expression sur certaines cellules. Lors du processus de maturation des DC sous l'action du CD40L, du LPS et/ou du TNF- α , les molécules HLA voient leur expression augmenter. A l'inverse, il existe des facteurs qui régulent négativement leur expression : le TGF- β et l'IL-10.

C. Les voies de présentation des antigènes

Après la capture d'Ag par les CPA, ces derniers doivent être apprêtés pour être présentés à la surface cellulaire sur les molécules HLA de classes I et II. Cette étape est primordiale dans la nature des réponses immunes induites car elle oriente la reconnaissance des Ag par les L_T CD8 $^+$ et CD4 $^+$, respectivement.

1. Apprêtement de l'antigène et présentation par les molécules HLA de classe I

Les molécules HLA-I sont exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées. Elles présentent des peptides antigéniques, issus de la dégradation intracellulaire des protéines endogènes normales ou pathologiques (protéines mutées ou protéines virales), qui peuvent être reconnus spécifiquement par des L_T CD8 $^+$. Ces cellules T peuvent alors détecter d'autres cellules qui expriment ces peptides pour les éliminer de l'organisme.

Ce système de surveillance sophistiqué dépend de l'activité du protéasome 26S (Figure14), responsable de la dégradation des protéines polyubiquitinylées au niveau du cytoplasme. Cette diversité des peptides ainsi générés se combine avec le polymorphisme marqué des molécules HLA-I. Cette voie de dégradation cytosolique est la voie majeure de présentation des Ag par les molécules HLA-I (Figure 14). Le protéasome 26S n'est toutefois pas le seul système peptidase qui contribue à la production du mélange peptidique dans le cytosol. En effet, l'IFN- γ altère qualitativement l'activité du protéasome en remplaçant les sous-unités $\beta 1$ (δ), $\beta 2$

(MB1) et $\beta 5$ (Z) par les sous-unités LMP2, LMP7 et MECL-1, successivement, pour former l'immunoprotéasome.

1.1. L'immunoprotéasome

Des études menées *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'immunoprotéasome pourrait être plus efficace pour la présentation des peptides d'origine virale et qu'il pourrait influencer la spécificité de la réponse immunitaire (van Hall et al., 2000). Toutefois, l'immunoprotéasome pourrait affecter négativement l'apprêtement d'épitopes dérivés d'Ag associés aux tumeurs (TAA ; Tumor associated antigen). En effet, une étude a montré qu'il est possible d'induire l'activation de CTL spécifiques d'Ag de tumeur rénale *in vitro*, mais que ces CTL sont incapables de lyser des L_B autologues transformés avec l'Ebstein Baar virus (EBV) qui expriment la protéine cible native. Cette inefficacité de lyse serait liée à une absence de clivage de certaines protéines tumorales par l'immunoprotéasome présent dans ces cellules B-EBV. De la même façon, les DC, qui expriment également l'immunoprotéasome, pourraient ne pas présenter les peptides d'intérêt aux CTL. Ces résultats ont des implications majeures pour les approches immunothérapeutiques, la vaccination peptidique pouvant être privilégiée comparée à la vaccination avec des protéines devant être apprêtées par les CPA (Morel et al., 2000).

L'IFN- γ induit aussi la synthèse du complexe heptamérique PA28 qui se lie à l'extrémité du protéasome 20S et augmente l'activité d'hydrolyse des peptides (Figure14). Des études à partir de modèles murins ont montré que la surexpression de cette protéine augmente la présentation des épitopes par les molécules HLA-I, en influençant l'accessibilité du substrat protéique au site actif du protéasome (Sun et al., 2002). L'IFN- γ est également responsable de la dissociation du protéasome 26S en déphosphorylant la sous-unité $\alpha 7$, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'ensemble de protéasomes 20S libres qui ne semble pas avoir de fonctions (Bose et al., 2004).

1.2. Les aminopeptidases

Le protéasome représente un complexe enzymatique majeur pour générer des peptides avec une extrémité carboxy-terminale. Cependant, la majorité des peptides est produite avec une extension amino-terminale, nécessitant leur clivage par des aminopeptidases. Quatre aminopeptidases cytosoliques sont connues à ce jour : la peptidase LAP (Leucine AminoPeptidase), la bleomycine hydrolase (BH), l'aminopeptidase sensible à la puromycine (PSA) et la peptidase TOP (Thimet oligoendopeptidase). Cette dernière semblerait être un facteur limitant de l'apprêtement des peptides car sa surexpression réduit la présentation des peptides

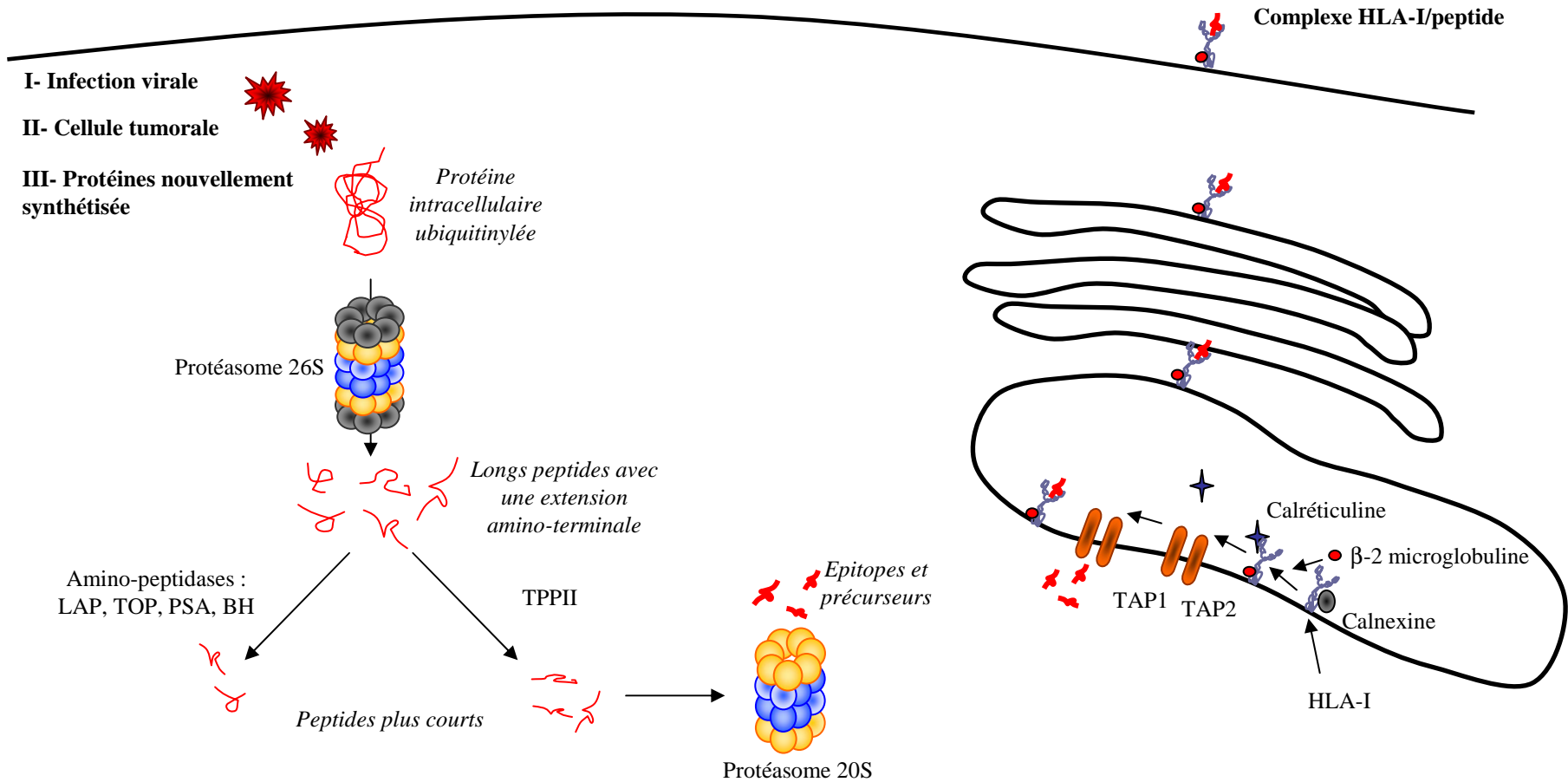


Figure 15 : L'apprêtement des antigènes par les molécules HLA- I

Les antigènes issus de protéines virales, de cellules transformées ou de protéines endogènes sont continuellement dégradés et apprêtés par les molécules HLA-I. (D'après Bowers, *Microbiology and Immunology on line*, 2004)

par les molécules HLA-I (York et al., 2003). Une autre peptidase présente dans la lumière du RE, appelée ERAAP (aminopeptidase associated with Ag processing in the endoplasmic reticulum) est capable de cliver les extrêmités amino-terminales de ces peptides pour qu'ils puissent correctement s'associer aux molécules HLA-I (Serwold et al., 2002).

1.3. les voies alternatives de génération de peptides de classe I

Des expériences d'inhibition des protéasomes ont montré qu'il existait des voies alternatives pour générer des peptides restreints par les molécules HLA-I, ainsi appelés peptides de classe I. Une peptidase candidate, appelée tripeptidyl peptidase II (TPPII) est capable de générer des peptides présentés par les molécules HLA-A3, HLA-A11, et HLA-B35, indépendamment du protéasome (Tomkinson et al., 1987). La TPPII a une activité tripeptidyl aminopeptidase quand elle est multimérisée et une activité endoprotéolytique quand elle est sous forme oligomérique. Elle est essentielle pour couper les extrêmités N-terminales des peptides et pourrait ainsi générer certains épitopes indépendamment du protéasome. Cependant, elle peut aussi agir en aval du protéasome 26S pour modifier les intermédiaires générés par ce dernier, ceci afin d'assurer l'apprêtement des peptides par les molécules HLA-I.

1.4. La formation du complexe HLA-I/peptide

Les peptides générés au niveau cytoplasmique sont pris en charge par des protéines «heat shock » (HSP70 et HSP90) dont le rôle est de transporter les peptides et de les protéger d'une dégradation supplémentaire (Figure 15) (Srivastava et al., 1994). Les peptides sont ensuite transportés de façon active dans le RE par les protéines transporteurs TAP (Transporters Associated with antigen Processing). Les transporteurs TAP sont formés d'un hétérodimère TAP1 et TAP2 et possèdent une spécificité de liaison pour les peptides de 8 à 16 acides aminés présentant des résidus particuliers au sein de la séquence peptidique (Uebel and Tampe, 1999; van Endert et al., 1995). En arrivant dans le RE, les peptides rencontrent les molécules HLA partiellement repliées. Initialement, les chaînes α des molécules HLA-I s'associent à la protéine chaperone calnexine pour se fixer ensuite à la β 2-microglobuline (β 2m). Ensuite, le complexe molécule HLA-I et β 2m est libéré de la calnexine, se lie à un complexe de protéines chaperones (calréticuline et Erp57) et s'associe à TAP via la tapasine. C'est sur la molécule HLA partiellement repliée encore complexée aux chaperonnes et à TAP, que va se charger le peptide. Ce n'est seulement que lorsque le peptide est fixé que la molécule achève son repliement. Enfin, la molécule se libère de TAP avant d'être acheminée vers la membrane de la cellule (York and Rock, 1996).

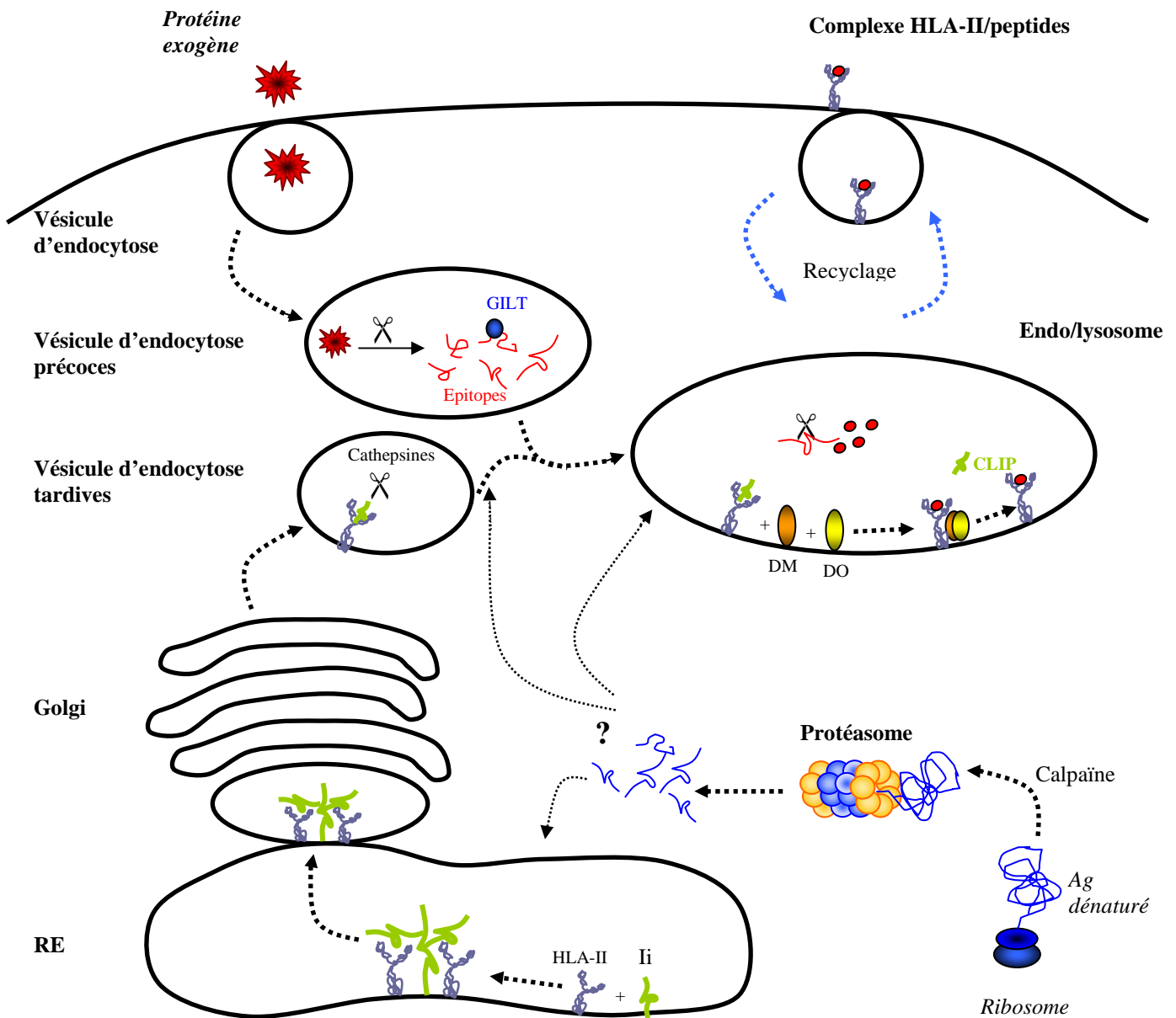


Figure 16 : L'apprêtement des antigènes et leur présentation sur les molécules HLA-II

Dans le réticulum endoplasmique (RE), les molécules HLA-II, nouvellement synthétisées, s'associent à la chaîne invariante Ii. Ce complexe va être importé dans l'appareil de Golgi, puis dans des vésicules d'endocytose variées. La liste des enzymes protéolytiques impliquées dans la dégradation des Ag est très grande, parmi lesquelles on retiendra les cathepsines, l'AEP (*Asparaginyl EndoProtease*) ou encore l'enzyme non protéasique GILT (gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase). Dans les endo/lysosomes, le peptide CLIP va être progressivement remplacé par des peptides issus de dégradation protéique. Ce remplacement est assuré par les dimères non polymorphiques (DM-DO). Les molécules HLA-II chargées en peptide relevant sont alors externalisées. Bien que les peptides présentés par les molécules HLA-II sont classiquement issus de la dégradation de protéines exogènes, des études ont montré que des peptides issus de la dégradation d'Ag endogènes pouvaient également être présentés selon cette voie, mais les mécanismes exacts de cette voie ne sont pas encore définis (*D'après Bowers, Microbiology and Immunology on line, 2004*)

2. Apprêtement de l'antigène et présentation par les molécules HLA de classe II

Comme pour les molécules HLA-I, le polymorphisme marqué des molécules HLA-II permet au système immunitaire de reconnaître les différents Ag qu'il est susceptible de rencontrer à la surface d'une CPA. En règle générale, les molécules HLA-II présentent des peptides issus de la dégradation de protéines exogènes qui ont été internalisées par endocytose, mais des études ont montré que des produits de dégradation de protéines endogènes peuvent également être présentés par ces molécules (Figure 16) (Lechler et al., 1996).

Les CPA peuvent capter les Ag exogènes selon plusieurs processus comme décrits précédemment (Chapitre 2). Tous ces modes d'internalisation d'Ag conduisent à la formation d'endosomes (ou phagosomes) qui rejoignent la voie d'endocytose classique composée d'une succession de vésicules (endosomes précoces, endosomes tardifs et lysosomes) ayant une acidité croissante depuis la membrane plasmique vers le centre de la cellule. Ces endosomes contiennent une grande variété d'enzymes protéolytiques impliquées dans la dégradation des Ag. Parmi ces enzymes, on retrouve les cathepsines et l'enzyme non protéasique GILT (gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase). Les cathepsines sont des protéases à cystéine de la famille de la papaïne, à l'exception des cathepsines D et E, qui sont des protéases à aspartate et de l'*Asparaginyl EndoProtease* (AEP).

Les molécules HLA-II sont synthétisées dans le RE où elles s'associent à la chaîne invariante Ii pour être exportées vers les endosomes *via* l'appareil de Golgi. La chaîne invariante Ii est une protéine chaperonne qui contribue à l'assemblage et à la stabilisation des chaînes α et β de la molécule HLA-II, qui empêche la liaison de peptides endogènes à la molécule HLA et qui est impliquée dans son transport.

Dans les endosomes, alors que la chaîne invariante est progressivement dégradée par les protéases, des peptides temporaires, appelés CLIP (class II associated invariant chain peptides), restent associés. La dissociation du peptide CLIP par les molécules HLA-DM et HLA-DO permet de démasquer le site de liaison des molécules HLA-II au peptide et supprime le signal de rétention dans les endosomes. La molécule peut alors s'associer à un peptide antigénique et migrer vers la membrane cellulaire (Figure 16).

A ce jour, plusieurs compartiments cellulaires semblent être impliqués dans l'association du peptide à la molécule HLA- II. Le site d'assemblage dépend de l'affinité du peptide et de la complexité de la protéine à dégrader, les divers compartiments cellulaires ayant des pH acides variés. Ainsi, selon les études, l'assemblage des peptides aux molécules HLA-II a lieu dans le RE, dans les endosomes précoces, dans les endosomes tardifs, dans les phagosomes ou encore directement à la surface de la membrane cellulaire.

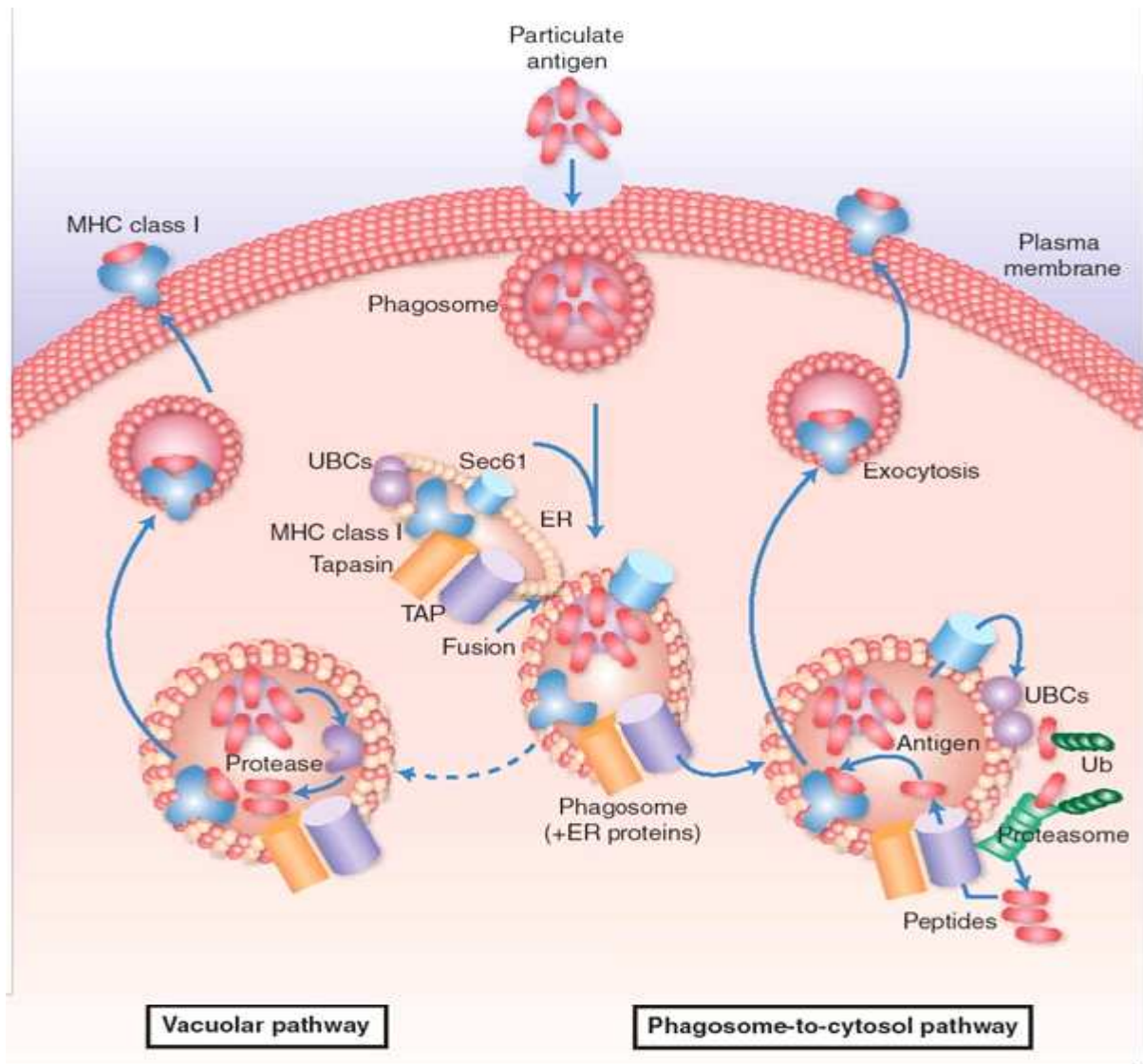


Figure 17 : Mécanismes de présentation croisée utilisés par les cellules dendritiques

Rapidement après internalisation, les phagosomes et leur contenu peuvent fusionner avec le reticulum endoplasmique (ER) pour former un complexe contenant toute la machinerie permettant l'association des peptides aux molécules HLA-I. Selon la voie dite vacuolaire de présentation croisée, les protéines contenues dans les phagosomes peuvent être dégradées en peptides directement dans le complexe phagosome-réticulum endoplasmique par des protéases phagosomiques avant d'être associées aux molécules du HLA-I. Selon la voie cytosolique, les protéines phagosomiques sont dirigées vers le protéasome où elles sont dégradées en peptides. Ceux-ci sont ensuite transportés par les molécules TAP vers le complexe phagosome-réticulum endoplasmique où ils sont associés aux molécules HLA-I. Les complexes HLA-I / peptide sont ensuite exportés à la surface cellulaire.

(Rock et al., 2003)

3. La présentation croisée des antigènes

Classiquement, et comme décrit ci-dessus, les protéines endogènes (à l'exception des protéines sécrétées et des protéines membranaires) sont dégradées dans le cytosol et assemblées aux molécules HLA-I dans le RE pour être ensuite présentées à la surface cellulaire aux CTL. Les protéines exogènes sont, quant à elles, phagocytées et chargées sur les molécules HLA-II dans divers compartiments cellulaires pour être directement présentées à la surface cellulaire aux L_T CD4+ auxiliaires. Ce schéma de présentation peptidique par les molécules HLA n'est toutefois pas rigoureusement exact car il est admis que des CPA sont capables de présenter des peptides, issus de la dégradation de protéines exogènes, par les molécules HLA-I. Ce phénomène, appelé « présentation croisée », semble jouer un rôle important pour l'induction de réponses CTL vis-à-vis de certains Ag exogènes provenant notamment de tumeurs d'origine virale (Roy, 2003). Trois voies ont été décrites pour la présentation croisée d'Ag phagocytés (Figure 17).

Dans la voie cytosolique, les Ag sont transloqués du phagosome vers le cytosol par les protéines de transport TAP, pour subir la voie de dégradation et de chargement classique des peptides sur les molécules HLA-I (Kovacsovic-Bankowski and Rock, 1995).

Dans la voie vacuolaire, l'apprêtement des Ag se fait par des enzymes protéolytiques et les peptides sont chargés sur les molécules HLA-I recyclées à partir de la membrane cellulaire (Rock, 2003).

Une troisième voie de présentation croisée, dite du phagosome, a été décrite dans les DC et les macrophages (Guermontprez et al., 2003; Houde et al., 2003). En effet, des protéines que l'on pensait exclusives au RE, telles la calréticuline et la calnexine, ont été retrouvées dans les phagosomes, suggérant que les membranes du phagosome ont pour origine la membrane cellulaire mais aussi la membrane du RE. Ce phénomène découlerait d'une fusion membranaire entre le RE et le phagosome, permettant l'échange de matériels protéiques avec, en particulier, le complexe de translocation Sec61. Ce complexe permet le transport des protéines exogènes vers le cytosol puis le transport des peptides issus de leur dégradation cytosolique vers le phagosome qui contient des molécules HLA-I et des protéines de transport TAP. Les phagosomes se définissent alors comme un compartiment cellulaire compétent pour l'apprêtement des Ag par les molécules HLA-I. Cependant, le mécanisme par lequel des composants du RE gagnent le phagosome reste encore controversé (Burgdorf et al., 2008).

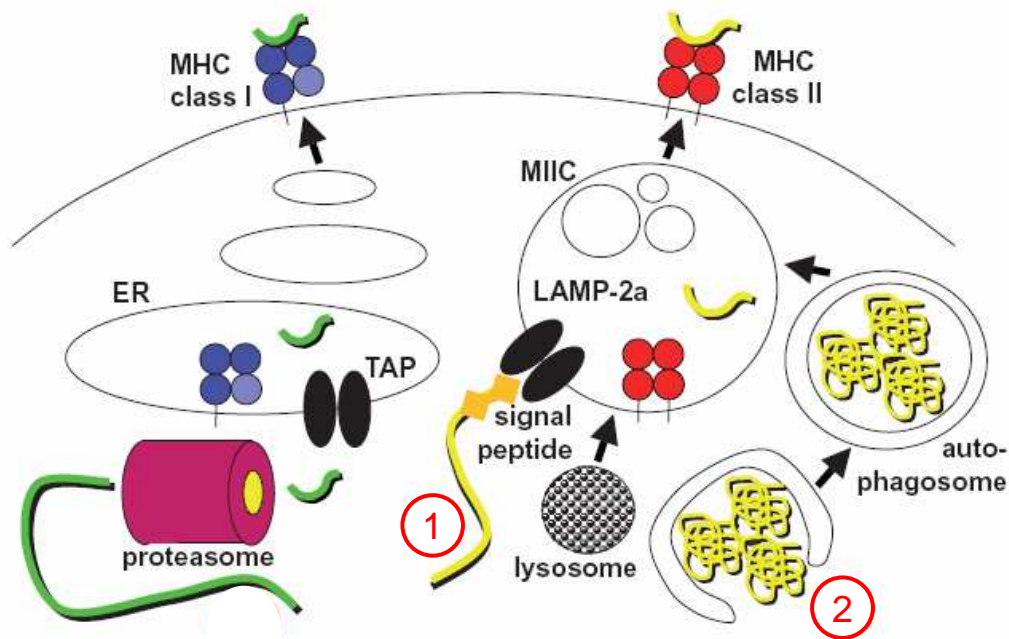


Figure 18 : Les voies de présentation d'antigènes cytosoliques sur les molécules HLA-II (Münz, 2006)

1. L'autophagie médiée par des protéines chaperonnes : Des protéines solubles ou des peptides, contenant un signal d'adressage aux lysosomes, peuvent être importées dans le compartiment de chargement des molécules HLA-II (MIIC) via le transporteur LAMP-2a assisté des protéines cytosoliques et lysosomiales Hsc70. Dans le MIIC, elles sont dégradées par les protéases lysosomiales et leurs fragments sont chargés sur les molécules HLA-II, qui migrent ensuite à la surface cellulaire pour la stimulation de lymphocytes T CD4+.

2. Des protéines cytosoliques à longue durée de vie ou des agrégats, peuvent être incorporées dans des autophagosomes, lesquels fusionnent ensuite avec les MIICs. Leur contenu est aussi dégradé par les hydrolases et les peptides dérivés sont chargés sur les molécules HLA-II.

4. La présentation d'antigènes cytosoliques par les molécules HLA-II

Comme nous venons de le voir, des protéines exogènes normalement présentées sur les molécules HLA-II, peuvent être également présentées sur les molécules HLA-I. Cependant, l'inverse existe. En effet, des peptides issus de la dégradation de protéines endogènes peuvent être présentés sur les molécules HLA-II. Cette voie de présentation est appelée "la voie de présentation endogène des molécules HLA-II". L'idée de l'existence d'une telle voie provient d'études montrant que 20% des peptides présentés par les molécules HLA-II à la surface des cellules sont issus de la dégradation de protéines endogènes (Rammensee et al., 1999), qui peuvent être d'origines cytosolique, nucléaire, mitochondriale ou membranaire (Qi et al., 2000; Suri et al., 2006). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ce mode particulier de présentation. Le plus privilégié est celui de l'autophagie (Dengjel et al., 2005), mais la macrophagie est également une des voies de présentation proposée (Figure 18).

La macrophagie consiste en la formation d'une vésicule de 0.5-1.5µm (autophagosome) qui englobe du matériel cytosolique. Cette vésicule fusionne ensuite avec les lysosomes et les compartiments de chargement des molécules HLA-II (MIIC). L'ensemble migre ensuite à la surface cellulaire. Cette voie a été mise en cause pour la présentation de peptides dérivés de protéines virales, du soi ou issus d'Ag tumoraux (Brazil et al., 1997; Paludan et al., 2005).

La voie de l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes permet d'importer des protéines cytosoliques, du cytoplasme vers la membrane lysosomiale. Ce système implique la protéine de transport LAMP-2a et les protéines chaperonnes Hsc70 (Agarraberes and Dice, 2001). Cette voie a été mise en cause pour la présentation d'autoantigènes (Zhou et al., 2005).

La voie de l'autophagie se limite aux protéines comportant un signal d'adressage à la membrane lysosomiale, alors que la voie de la macrophagie est moins restrictive. Dans ce dernier cas de figure, ce sont généralement des protéines à longue durée de vie, des protéines ayant échappé à la dégradation par le protéasome (Henell et al., 1987), des agrégats protéiques qui peuvent se former lors de maladies neurodégénératives (Iwata et al., 2005), ou encore des protéines anormalement surexprimées (Nimmerjahn et al., 2003).

Parce que l'autophagie est déclenchée, entre autre, par la présence d'IFN-γ (Gutierrez et al., 2004), cette voie de présentation joue un rôle très important dans l'immuno-surveillance contre les pathogènes intracellulaires, en contribuant à l'initiation et au maintien de la réponse immune dans les tissus inflammés (Munz, 2006). Elle joue également un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire, en

régulant la sélection négative des L_T CD4+, du fait de la présentation d'autoantigènes à la surface des cellules de l'épithélium thymique (Nedjic et al., 2008).

Enfin, deux autres voies de présentation d'Ag cytosoliques par les molécules HLA-II ont été proposées. La première concerne les protéines sécrétées ou transmembranaires. Ces dernières, du fait de leur peptide signal approprié, sont traduites directement dans la lumière du RE où elles pourraient s'associer avec les molécules HLA-II nouvellement synthétisées. Ce complexe serait alors envoyé dans les compartiments endosomaux où la dégradation protéique aurait lieu ainsi que le chargement des peptides générés sur les molécules HLA-II (Aichinger et al., 1997). La deuxième voie de présentation suggère que des peptides générés dans la lumière du RE ou transportés du cytosol *via* les transporteurs TAP, pourraient se lier aux molécules HLA-II en rentrant en compétition avec la chaîne invariante (Malnati et al., 1992).

D. Structures, fonctions, clivage et apprêtement des peptides signaux

Un peptide signal est une chaîne peptidique jointe à une protéine qui sert à adresser celle-ci dans un compartiment cellulaire (organite) chez les eucaryotes, ou dans le milieu extracellulaire chez les procaryotes. Le peptide signal est nécessaire lorsqu'une protéine n'est pas codée par le génome de l'organite en question, mais par le génome nucléaire. Dans le cas de protéines destinées à être sécrétées, le peptide signal permet de diriger la synthèse de la pré-protéine directement dans la lumière du RE en ciblant la membrane de ce dernier et en se liant au complexe de translocation appelé translocon. Pour autant, le rôle des peptides signaux ne se limite pas seulement à l'adressage membranaire des protéines destinées à être sécrétées. En effet, des études récentes révèlent que les peptides signaux possèdent de multiples fonctions (Hegde and Lingappa, 1997; Zheng and Gierasch, 1996). Dans ce chapitre, nous parlerons de la structure des peptides signaux et de leurs différentes fonctions.

1. Structure des peptides signaux

En 1975, il a été découvert que les protéines sécrétées portent un peptide signal court et amovible assurant leur adressage vers le RE (Blobel and Dobberstein, 1975). Le peptide signal, généralement localisé dans la partie N-terminale de la pré-protéine, peut également se positionner à l'extrémité C-terminale ou au cœur même de la séquence protéique (Kutay et al., 1995).

Les premières études supposaient qu'il existait un motif distinctif au sein des peptides signaux mais le séquençage de différentes pré-protéines a révélé par la suite l'absence de séquences consensus. De récentes études comparatives ont montré que les peptides signaux sont composés de trois domaines (Figure 19) :

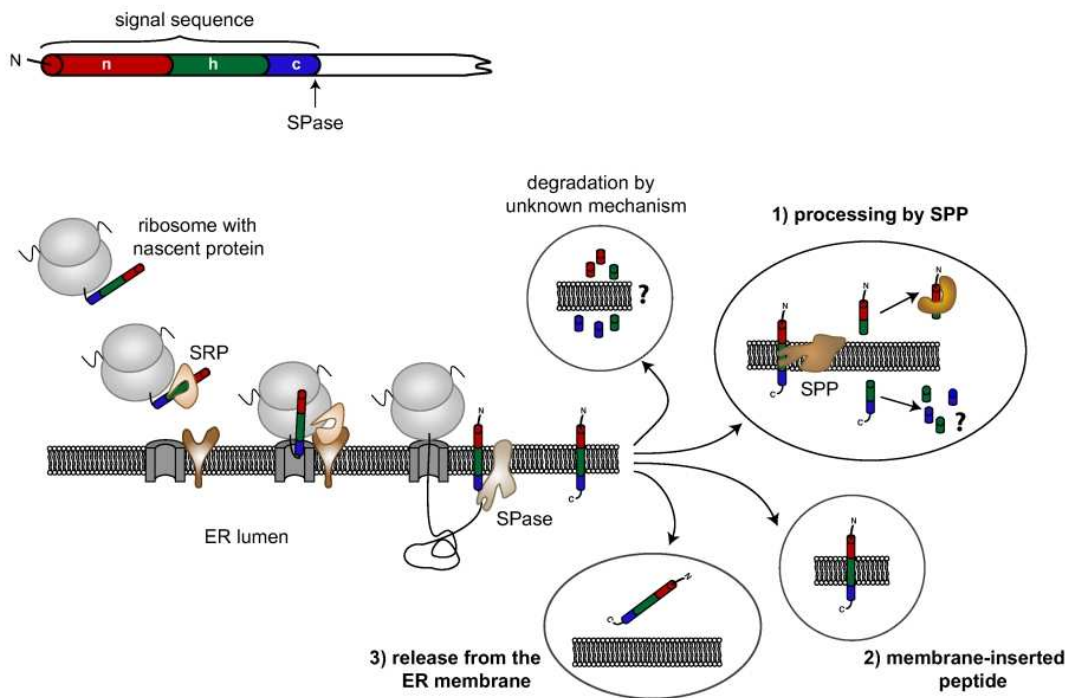


Figure 19 : Structures, fonctions, clivage et apprêtement des peptides signaux

Les peptides signaux N-terminal permettent le ciblage des protéines sécrétées ou membranaires au RE grâce à la SRP (signal recognition particule). Les peptides signaux ont une structure tripartite, consistant en un corps hydrophobe (région-h) flanquée par une région n et c. La région c contient le site consensus de clivage de la SPase (signal peptidase). Les peptides signaux sont extrêmement variables à la fois dans leur longueur et dans leur composition en acides aminés. Cette variabilité suggère que le ciblage du RE et que le clivage par la SPase sont affectés par le peptide signal. Après le clivage par la SPase, des peptides signaux sont clivés par la SPP (signal peptide peptidase) et les fragments résultants sont relargués dans le cytosol ou directement dans la lumière du RE. Ces fragments de peptides signaux ont diverses fonctions. (*D'après signal peptide website*)

- Un cœur hydrophobe (la région-H), composé de 6 à 15 résidus, nécessaire au clivage du peptide signal ainsi qu'au ciblage et à l'insertion dans le translocon
- Une courte partie C-terminale polaire (la région-C), composée de 2 à 9 résidus, formant un motif consensus rudimentaire qui définit le site de clivage du peptide signal
- Une partie N-terminale (la région-N) relativement neutre.

D'autres analyses comparatives ont montré que la longueur des peptides signaux pouvait varier de 15 à 50 résidus, voire plus (von Heijne, 1986). La plus grande variabilité de longueur se trouve au niveau de la région-N (Martoglio and Dobberstein, 1998). Pour autant, cette région n'est pas impliquée dans les fonctions de ciblage et de translocation des protéines ce qui suggère que cette région-N pourrait jouer d'autres fonctions, intervenant notamment après le clivage du peptide signal de la pré-protéine (Martoglio and Dobberstein, 1998).

2. La translocation co-translationnelle d'une protéine sécrétée

2.1. Processus général de translocation

Les principales caractéristiques du passage transmembranaire d'une protéine sécrétée au niveau de la membrane du RE, aussi appelé translocation co-translationnelle, sont représentées dans la Figure 19.

Les pré-protéines sont synthétisées par les ribosomes. Dès que le peptide signal émerge de la grande sous-unité du ribosome (le polypeptide fait au moins 40 résidus), la particule de reconnaissance du signal (SRP pour « Signal Recognition Particule ») se lie à la fois au peptide signal et au ribosome. La SRP est un complexe de 325KD composé de six protéines différentes associées à une molécule d'ARN 7S. Une fois la liaison effectuée, le changement de conformation de la SRP empêche le ribosome de poursuivre la synthèse du polypeptide, évitant que la protéine qui doit passer dans le RE ne soit libérée dans le cytosol. Ce blocage est appelé arrêt de l'élongation.

La synthèse de la pré-protéine redémarre une fois que le complexe SRP-peptide signal-ribosome se lie au récepteur de la SRP situé dans la membrane du RE. Ce récepteur est une protéine de membrane intrinsèque composée de sous unités α et β . Les sous-unités α se lient au GDP (guanosine diphosphate). Lorsque le complexe interagit avec le récepteur, l'échange GDP-GTP (guanosine triphosphate) est activé. Cette nouvelle forme du récepteur possède alors une forte affinité pour la SRP ce qui permet de libérer le peptide signal qui se lie au translocon situé dans la membrane du RE. Le caractère unidirectionnel de ce cycle permet de le faire avancer en

favorisant l'interaction du ribosome et du peptide signal à la membrane du RE.

Le translocon est un canal aqueux dans lequel la protéine hydrophile va passer. Il est constitué d'un complexe multi-protéique dont la protéine la plus importante est la protéine Sec61p composée de 10 domaines trans-membranaire qui délimitent un pore de 20 Angstrom de diamètre.

La liaison de la SRP à son récepteur place le ribosome en cours de traduction au niveau de l'extrémité cytoplasmique du canal de translocation : le canal s'ouvre, la protéine native est alors traduite directement à travers le canal, sans jamais être exposée au cytosol. La protéine en cours d'élongation forme une boucle à l'intérieur du canal. Le peptide signal est reconnu par les protéines du translocon. L'extrémité N-terminale de la protéine reste dans le cytosol alors que l'extrémité C-terminale se trouve dans la lumière du RE. D'autres ribosomes, les uns après les autres, commencent la traduction du même ARN messager et s'attachent de la même manière à la membrane du RE.

Une fois la traduction achevée, le ribosome est libéré de la membrane du RE et le peptide signal est clivé de la protéine (Figure 19).

Certaines protéines comportent un peptide signal au cœur même de leur séquence, aussi appelé « stop transfert ». Au cours de la translocation, le mouvement s'arrête quand un des segments hydrophobes est reconnu par le translocon et la protéine est alors déplacée latéralement du canal vers la membrane. Ce phénomène se produit autant de fois qu'il y a de domaines transmembranaires dans la protéine.

2.2. Variabilité dans l'efficacité d'interaction entre le peptide signal et le translocon

Comme nous l'avons vu, la structure en 3 domaines des peptides signaux est relativement bien conservée d'une protéine à une autre. Cependant, la variabilité dans la séquence suggère qu'il pourrait y avoir une variation dans l'efficacité d'interaction entre les peptides signaux et le translocon. Plusieurs études vont dans ce sens.

Par exemple, la contribution de facteurs supplémentaires peut être nécessaire à la reconnaissance de peptides signaux par le translocon. En effet, dans des systèmes mammaliens, plusieurs peptides signaux ne peuvent cibler correctement le translocon sans les protéines TRAM et/ou TRAP (Fons et al., 2003).

D'autre part, d'autres études *in vitro* ont montré qu'une différence d'efficacité d'interaction de peptides signaux avec le translocon, bloque la translocation d'une partie des protéines d'une même famille. Cela concernerait 5 à 20% des protéines secrétées, dont une partie resterait dans le cytosol. Cependant, cette population cytosolique serait mineure et aurait le plus souvent une durée de vie relativement courte (Besemer et al., 2005; Garrison et al., 2005). La calréticuline, une protéine abondante du RE, est l'une de ces protéines dont le peptide signal est connu pour

donner à la fois des protéines transloquées et des protéines non transloquées. Plusieurs études ont impliqué la calréticuline dans des activités cytosoliques et nucléaires, bien que le mécanisme par lequel une telle protéine accède à ces compartiments ne soit pas clarifié. Récemment, la bi-localisation de la calréticuline a été expliquée par le fait que son peptide signal est relativement inefficace (~5%) à la fois *in vivo* et *in vitro* (Shaffer et al., 2005). La préprotéine core du virus de l'hépatite B représente un autre exemple pour lequel l'inefficacité du peptide signal a une pertinence physiologique. Bien que cette protéine possède effectivement un peptide signal, sa translocation est en partie avortée à l'étape qui suit le ciblage du translocon (Garcia et al., 1988).

L'inefficacité du peptide signal peut aussi avoir des conséquences pathologiques. La protéine prion (PrP), qui est une glycoprotéine connue pour altérer le métabolisme, en est un exemple (Kim and Hegde, 2002). Au cours de l'adressage de la PrP au RE, une petite proportion de cette protéine (~5-15%) n'est pas transloquée complètement produisant ainsi des formes cytosoliques et transmembranaires. Quand cette protéine est sur-représentée, les localisations ectopiques de la protéine peuvent être pathogéniques (Hegde et al., 1998; Ma et al., 2002).

3. Clivage et apprêtement du peptide signal

Une fois la pré-protéine entièrement synthétisée dans la lumière du RE et sa partie N-terminale insérée dans la membrane, le peptide signal est clivé par la signal peptidase (SP) (Figure 19). La SP est un complexe hétéro-oligomérique composé de 5 différentes protéines membranaires. Deux d'entre elles, la SPC18 et SPC21, des sérines protéases, sont essentielles pour l'activité de la SP. Les autres protéines du complexe semblent plutôt être impliquées dans la régulation du clivage. Plusieurs caractéristiques du peptide signal telles que le type d'acides aminés en position 1 et 3 dans la région-C ainsi que la longueur de la région-H, peuvent influencer leur clivage par la SP (Nilsson et al., 1994; von Heijne, 1984). De ce fait, il est très difficile de prévoir si ce clivage aura lieu, ni même où.

Le peptide signal qui a été clivé de la pré-protéine peut être de nouveau clivé par une autre peptidase membranaire du RE, la SPP (Signal Peptide Peptidase). La SPP est une glycoprotéine membranaire de 40kDa, qui contient 7 à 9 régions transmembranaires putatives et des motifs d'une aspartate protéase (Weihofen and Martoglio, 2003). Cependant, les règles de spécificité de coupure des peptides signaux par la SPP n'ont pas été clairement définies à l'heure actuelle (Lemberg and Martoglio, 2002).

Les fragments résultant de la dégradation par la SPP peuvent être relargués dans le cytosol ou directement dans la lumière du RE (Henderson et al., 1992; Long,

Protéine	Restriction	TAP dépendence	Référence
Hémagglutinine du virus de la grippe	HLA-A*0201	OUI	(Guéguen et al, 1994)
MUC1	HLA-A*0201	ND	(Mitchell et al, 2007)
Calréticuline	HLA-A*0201	NON	(Henderson et al, 1992)
Tyrosinase	HLA-A*0201	NON	(Wolfel et al, 2000)
Préprocalcitonine	HLA-A*0201	NON	(El Hage et al, 2008)
IP30	HLA-A*0201	NON	(Henderson et al, 1992)
preproinsulin	HLA-A*0201	NON	(Skowera et al, 2008)
HLA-A, B ou C	HLA-E	OUI	(Long et al, 1998)
hsp60	HLA-E	OUI	(Michaelsson et al, 2002)
GP1 du LCMV	H-2D ^b et H-2D ^k	ND	(Hudrisier et al, 1997)
Nucléoprotéine du virus de la grippe	H-2D ^b	OUI	(Uger et al, 1997)

Tableau 6 : Antigènes comportant un épitope T dans leur peptide signal

1998) (Figure 19). Les peptides signaux non coupés peuvent également être transférés dans le cytosol.

3.1. Présentation de fragments de peptides signaux par les molécules HLA-I classiques

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, chez l'homme les molécules classiques HLA-I sont les molécules HLA-A, B et C. Ces molécules sont capables de lier des peptides de 9 à 10 résidus, incluant notamment les peptides signaux (Lehner and Cresswell, 1996), et de les présenter à la surface des cellules aux CTL. La grande majorité de ces peptides est dérivée de protéines endogènes dégradées par le protéasome et transportées dans la lumière du RE par les transporteurs TAP où ils se lient aux molécules de HLA-I.

Les peptides dérivés de peptides signaux font partis de ceux trouvés comme capables de se lier aux molécules HLA-I (Lehner and Cresswell, 1996). Des protéines comportant un épitope T dans leur peptide signal sont listés dans le Tableau 6. C'est le cas du peptide M1.2 dérivé de la molécule mucine MUC1 connu pour être surexprimée dans une variété d'adénocarcinome. Ce peptide est capable de se lier aux molécules HLA-A2 et d'induire des réponses cytotoxiques. De plus, il a été démontré que ce peptide est le plus immunogène de tous les peptides MUC1, chez l'homme (Mitchell et al., 2007).

Les fragments des peptides signaux peuvent s'associer aux molécules HLA-I par des voies dépendantes ou indépendantes des transporteurs TAP (Figure 20). Dans les cellules déficientes en TAP, les peptides associés aux molécules HLA-I sont dérivés des régions-H ou C de peptides signaux longs comme celui de l'IP30, et des régions-N et -H de peptides signaux courts comme celui de la calréticuline (Henderson et al., 1992). Au contraire, les fragments dérivés des régions-N de longs peptides signaux sont strictement TAP dépendant (Lehner and Cresswell, 1996; Uger and Barber, 1997). Un exemple d'épitope T immunodominant dont la présentation aux CTL est indépendante des transporteurs TAP et du protéasome est celui d'un épitope dérivé du peptide signal de la Tyrosinase. Des réponses cytotoxiques contre cet épitope ont été observées chez des patients atteints de mélanomes métastatiques (Wolfel et al., 2000). Plus récemment, un épitope T immunodominant a été trouvé dans la partie C-terminale du peptide signal de la préprocalcitonine, un Ag exprimé par les cellules de carcinome des poumons. Il a été démontré que la présentation de cet épitope est restreinte aux molécules HLA-A2 et est indépendante des transporteurs TAP et du protéasome (El Hage et al., 2008).

Les présentations TAP dépendantes ou indépendantes indiquent généralement que les fragments du peptide signal sont relargués respectivement dans le cytosol ou dans la lumière du RE (Figure 20). Après l'insertion dans la

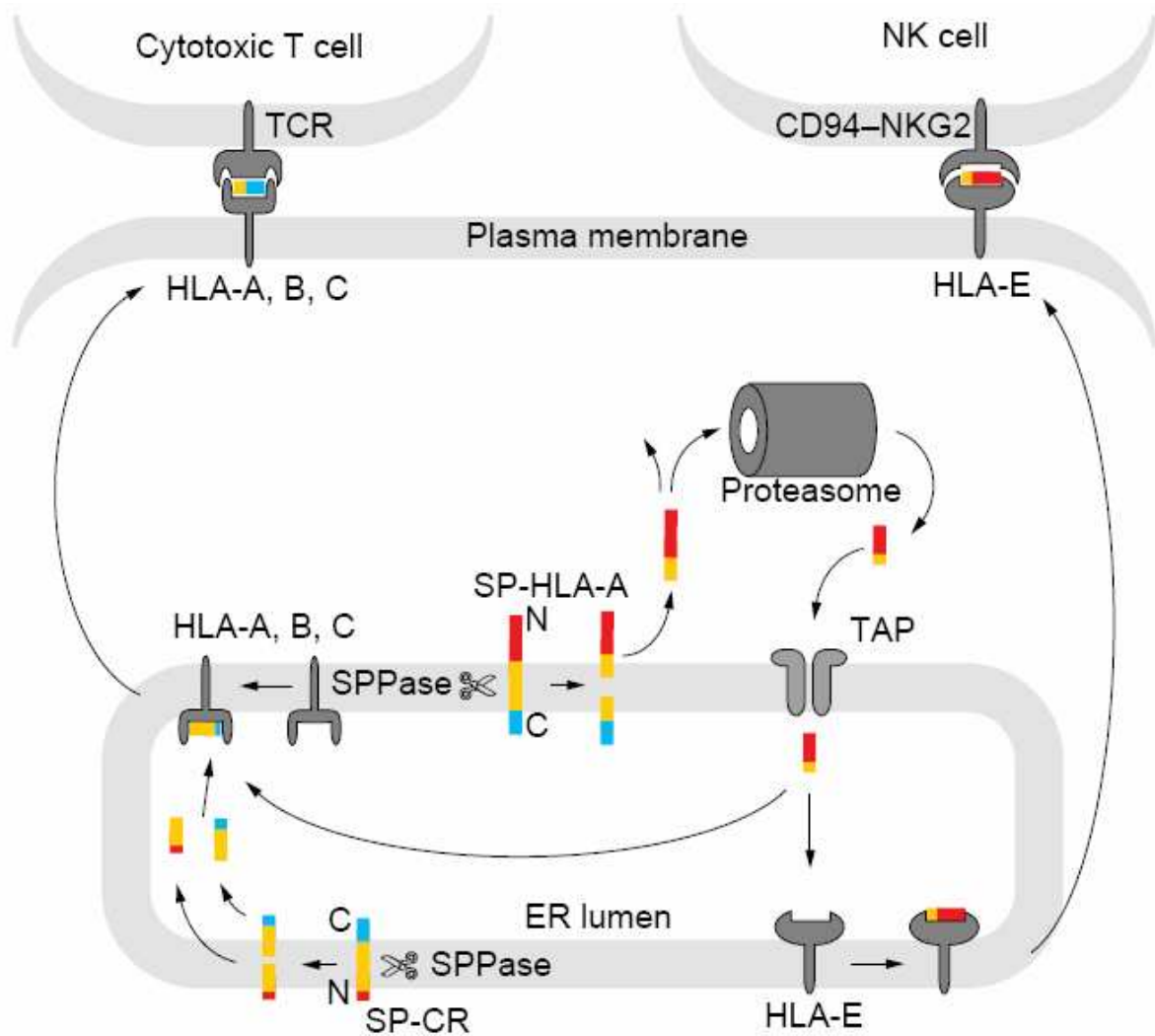


Figure 20 : Présentation de fragments de peptides signaux par les molécules de HLA-I
(Martoglio et al., 1998)

Les fragments de peptides signal peuvent être relargués dans la lumière du RE ou dans le cytosol où ils sont apprêtés par le protéasome. Les peptides résultants sont transportés par les transporteurs TAP dans la lumière du RE, où ils se lient aux molécules HLA-I classiques HLA-A, B, ou C. Ces complexes HLA-peptide sont exportés à la membrane de la cellule pour être présentés aux lymphocytes T cytotoxiques.

D'autres part, les molécules de HLA-I non classiques que sont les molécules HLA-E, lient sélectivement des fragments dérivés de la région-N du peptide signal des molécules HLA-A, B ou C et les présentent aux récepteurs CD94-NKG2 des cellules NK.

Abréviations : SP-CR : peptide signal de la calréticuline ; SP-HLA-A : peptide signal de la molécule HLA-A

membrane du RE, le clivage du peptide signal expose sa partie N-terminal du côté cytoplasmique du RE et le site de clivage de la SP, du côté luminal du RE. Le clivage par la SPP dans la région-H du peptide signal donne naissance à des fragments N et C-terminaux. Les fragments C-terminaux peuvent être directement relargués dans la lumière du RE et se lier aux molécules de HLA-I. Des fragments N-terminaux peuvent également le faire si le peptide signal est court et ne possède pas d'acides aminés chargés dans sa région-N.

A l'inverse, des fragments de peptides signaux contenant des régions-N longues ou hydrophiles, peuvent être relargués dans le cytosol et dégradés par le protéasome (Gallimore et al., 1998). Les peptides résultants peuvent alors être transportés dans la lumière du RE pour se lier aux molécules de HLA-I classiques (Figure 20).

3.2. Présentation de fragments de peptides signaux par les molécules HLA-I non classiques

Les peptides présentés par les molécules HLA de classe I classiques représentent un large spectre de peptides générés par le protéasome. A l'inverse seule une petite partie des fragments de peptides signaux est présentée par les molécules HLA-I non classiques (HLA-E chez l'homme) par une voie dépendante des transporteurs TAP (Iezzi et al., 1998; Lanier, 1998). Ces molécules indiquent la présence de molécules HLA-I classiques en présentant un fragment de la région-N des peptides signaux des molécules HLA-A, B ou C aux cellules NK (Natural Killer) (Figure 20). Les cellules NK détruisent les cellules incapables d'activer leurs récepteurs inhibiteurs KIR. Ces récepteurs sont activés par la présence des molécules HLA classiques. Les cellules NK détruisent également les cellules incapables d'activer les hétérodimères CD94-NKG2. Ces hétérodimères sont activés en se liant à une molécule HLA-E chargée avec un peptide dérivé du peptide signal des molécules HLA-I classiques (Braud et al., 1998; Long, 1998). La perte des molécules HLA-I classiques est l'une des caractéristiques des cellules tumorales.

E. Les Lymphocytes T : les effecteurs de la réponse cellulaire anti-tumorale

L'immunité adaptative (acquise), caractérisée par l'expansion et la différenciation de L_T spécifiques de l'Ag (les L_T CD8+ et L_T CD4+), peut permettre d'éradiquer ou de contrôler la progression d'une tumeur. Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation (ou maturation) de CPA professionnelles est la première étape clé de l'induction d'une immunité adaptative efficace (Janeway, 2001). Ce sont ces dernières qui permettent, dans une seconde étape, la présentation de peptides tumoraux aux L_T naïfs afin de les activer. Parce que la plupart des Ag tumoraux ont été mis en évidence à partir de CTL spécifiques de tumeurs, il est aujourd'hui admis que les L_T , et notamment les L_T CD8+ cytolytiques (CTL) jouent un rôle central dans l'initiation et le maintien d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace (Boon et al., 1994; Kawakami et al., 1994). Cependant, la réponse CTL spécifique d'une tumeur ne peut être efficace qu'après l'activation préalable des cellules T auxiliaires CD4+. Ce sont ces dernières qui orientent la réponse vers un phénotype de type Th1 ou Th2. Pour autant, il ne faut pas oublier qu'une cellule maligne présente des Ag du soi mutés, mais surtout, la plupart du temps, des Ag du soi surexprimés. C'est pourquoi le système immunitaire est bien souvent tolérant, car dans le thymus, une grande majorité des L_T dont leurs TCR (T cell receptor) reconnaissent des Ag du soi (thymocytes auto-réactifs) sont éliminés. Ainsi, pour que la réponse anti-tumorale devienne efficace, il faut une rupture de la tolérance induite et élever le niveau d'activation des cellules T effectrices.

Après avoir décrit les mécanismes d'activation des L_T selon trois étapes clés (engagement du TCR, co-signal et formation de la synapse immunologique), le rôle et les fonctions des cellules T CD4+ et des CTL dans la réponse anti-tumorale seront détaillés.

1. Les mécanismes d'activation des lymphocytes T

Le récepteur cellulaire T (TCR ; T cell receptor) permet la reconnaissance de l'Ag sous forme peptidique par les cellules T, lorsque ce dernier est présenté sur les molécules HLA à la surface des CPA. La signalisation déclenchée par l'engagement du TCR permet ainsi aux L_T de détecter continuellement la présence d'Ag. Cependant, ce premier signal ne suffit pas à induire l'activation fonctionnelle des L_T . Il doit être renforcé par un deuxième signal (co-signal) délivré aussi par les CPA et déclenché par l'engagement des molécules de co-stimulation (Iezzi et al., 1998; Viola et al., 1999). Ces deux signaux favorisent alors la formation d'une synapse immunologique stable, qui amplifie et prolonge la signalisation par le TCR (Huppa and Davis, 2003).

1.1. L'interaction TCR / HLA-peptide

Le TCR est un hétérodimère de chaînes α/β (ou γ/δ). Chaque chaîne est constituée de 2 domaines : un domaine variable (noté $V\alpha$ ou $V\beta$) et un domaine constant (noté $C\alpha$ ou $C\beta$) dont la structure est très similaire à celle des domaines V et C des Ig. De même, la grande diversité des TCR repose sur un codage génétique particulier qui est basé pour l'essentiel sur les mêmes mécanismes de recombinaison que ceux conduisant au codage aléatoire des Ig. Ces mécanismes de recombinaison contribuent à la formation du répertoire T.

Le TCR, qui possède la propriété de reconnaissance des déterminants antigéniques, est associé au complexe CD3. Ce dernier comporte plusieurs chaînes protéiques qui jouent un rôle important dans la transduction du signal. Selon le type de cellule T, le complexe TCR/CD3 est associé soit à la protéine membranaire CD4, soit à la protéine membranaire CD8. Les protéines CD4 et CD8 interagissent avec les complexes peptide/HLA-II et peptide/HLA-I respectivement, ces complexes étant présents à la surface des CPA. Ce premier signal, s'il n'est pas soutenu par le co-signal, entraîne l'apoptose de la cellule T, et peut donc se révéler être négatif.

1.2. Les molécules de co-stimulation

Le signal de co-stimulation implique diverses molécules dont les plus essentielles sont les molécules de la famille B7, (B7-1 ou CD80, et B7-2 ou CD86) (Lenschow et al., 1996) et les molécules CD40 (Acuto and Michel, 2003), toutes deux présentes sur les CPA. Alors que le récepteur CD40 se lie à son ligand (CD40L), les molécules B7 quand à elles, engagent le récepteur CD28 (Green et al., 1994) pour augmenter à la fois l'expression du récepteur de forte affinité pour l'IL2 (Shahinian et al., 1993) et la sécrétion d'IL-2 par le L_T (Wells et al., 1997). Ce processus de co-stimulation réciproque est donc primordial quand on sait que l'IL-2 est une cytokine essentielle à la prolifération des cellules T (Schwartz, 1992). De plus, l'engagement de CD28 permet également la survie des lymphocytes activés en augmentant l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-XL (Boise et al., 1995). Outre ses deux rôles majeurs dans l'activation des L_T , de nombreux autres effets de CD28, directs et indirects, ont été décrits. Il permet par exemple, l'induction de l'expression de récepteurs pour d'autres molécules de co-stimulation (OX40L, 4-1BBL et ICOSL) qui contribuent à l'activation des sous-populations de L_T (Acuto and Michel, 2003). OX40L a une action préférentielle sur les cellules T CD4 ; 4-1BBL sur les L_T CD8 ; et ICOSL sur les lymphocytes T qui aident les L_B dans les centres germinatifs à se différencier (Whitmire and Ahmed, 2000).

Une molécule présentant des homologies avec CD28 et donc interagissant avec les molécules B7, est la molécule CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, CD152).

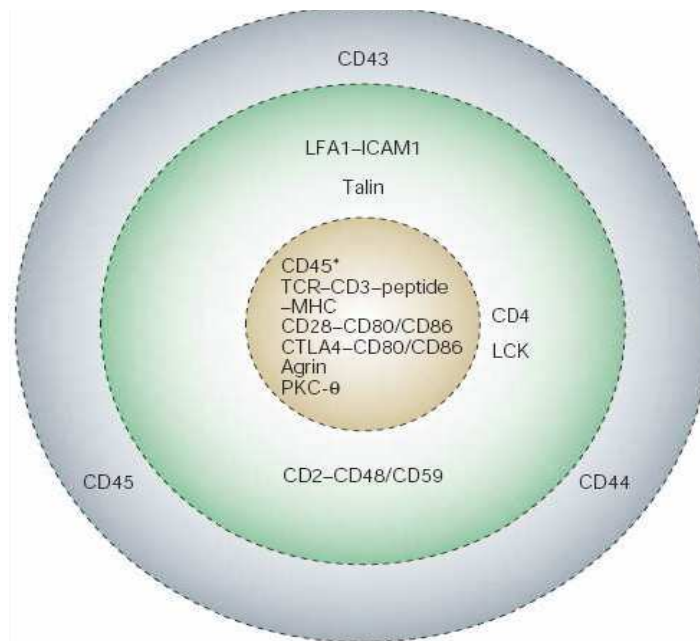
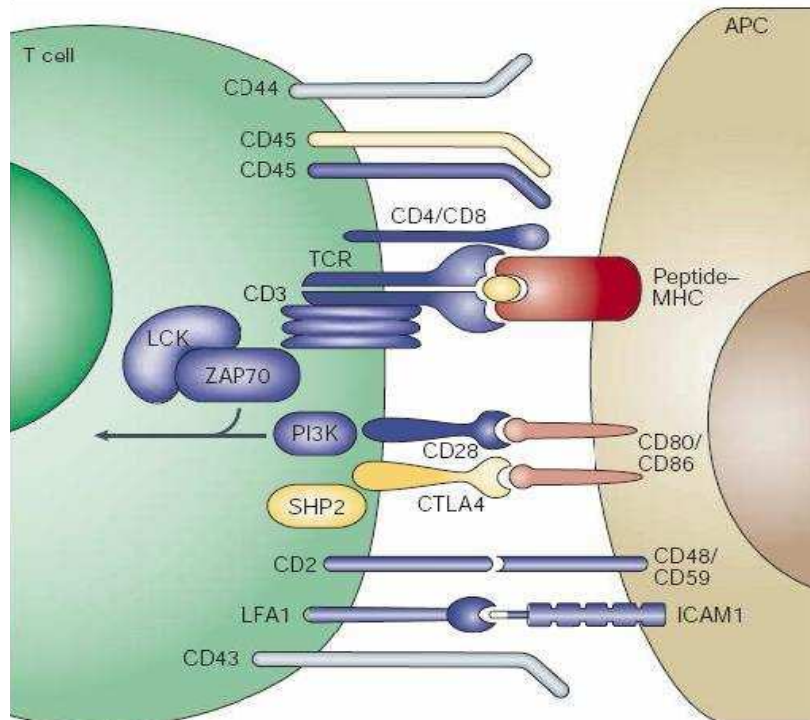


Figure 21 : Vue générale de la synapse immunologique mature.
(Huppa et al., 2003)

Cette dernière s'exprime tardivement après l'activation des L_T car elle joue un rôle opposé à CD28, en envoyant un signal inhibiteur aux L_T activés pour limiter leur prolifération (Chambers et al., 2001). En effet, des souris Knock-out pour le gène CTLA-4 développent une maladie mortelle en 3-4 semaines due à une prolifération lymphocytaire massive (Waterhouse et al., 1996).

Une troisième étape clé à l'activation fonctionnelle des L_T , en plus de la quantité et de la qualité des interactions dictées par l'engagement du TCR et des molécules de co-stimulation, est la formation de la synapse immunologique.

1.3. La synapse immunologique

La synapse immunologique peut être décrite comme une superstructure moléculaire qui se forme lors du contact entre un L_T et une CPA (Figure 21). La formation de cette structure est complexe et met en jeu de nombreux partenaires et événements de signalisation. L'ensemble de ces événements ont pour objectif d'optimiser l'activation du L_T en relocalisant l'ensemble des partenaires nécessaires à son activation au niveau d'une zone de contact, appelée c-SMAC (central-SupraMolecular Activation Complex). Cette zone de contact centrale est entourée par un anneau dans lequel sont retrouvés des couples de molécules d'adhésion comme LFA-1/ICAM-1, CD40/CD40L, CD80 ou CD86/CTLA-4. Les grandes molécules intervenant dans la répulsion intercellulaire, comme CD43 ou possédant, des effets inhibiteurs comme CD45, sont repoussées en périphérie de la synapse, dans une zone appelée p-SMAC. Ainsi, la zone de contact cellulaire est organisée en domaines contenant chacun certains types de molécules, et en excluant d'autres.

La synapse a pour effet de stabiliser l'interaction cellule T-CPA pendant quelques minutes à plusieurs heures (Celli and Bousso, 2008). Cette stabilisation est indispensable pour favoriser une activation optimale qui implique les complexes spécifiques peptide-HLA qui sont rares et dont l'affinité pour le TCR est peu élevée. La durée du signal peut influencer, par la suite, la nature de la réponse induite (Gett et al., 2003).

Un complexe initial ICAM-3/DC-SIGN présent respectivement sur les L_T et les DC, est rapidement complété par la participation du couple LFA-1/ICAM-1. Une fois engagé, d'autres contacts avec des molécules plus petites s'établissent tels CD2-CD58/CD48. L'environnement inflammatoire, par la présence de chimiokines, modifie la conformation des intégrines et augmente ainsi leur affinité pour leurs ligands. Lorsqu'un contact entre un TCR et un peptide agoniste-HLA se produit, le réarrangement spatial moléculaire établissant la synapse se développe. Les TCR migrent tous vers la zone centrale entourée par un anneau d'intégrine LFA-1/ICAM-

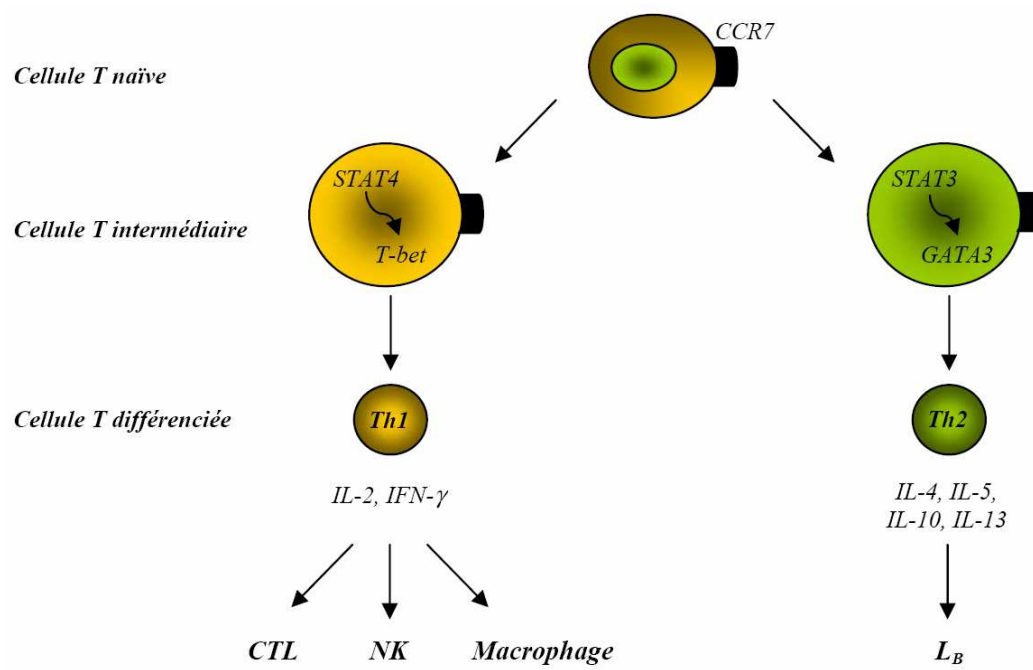


Figure 22 : Programme de différenciation des lymphocytes T CD4+

Les cellules T CD4+ naïves subissent un programme de différenciation aboutissant à l'expansion de cellules T intermédiaires et de cellules différenciées en cellules de type Th1 ou Th2. (S. Delluc, 2005)

1. Ces mouvements sont dépendants d'une contraction du cytosquelette, relayée par l'effet moteur de la myosine. Ils sont aussi facilités par un second mécanisme qui est celui de la coalescence de radeaux lipidiques (ou GEMs glycosphingolipid enriched membranes ou micro domains).

Au niveau cytoplasmique, on observe l'activation de la protéine kinase Lck (appartenant à la famille des Src kinases) suite à l'association des co-récepteurs CD4 ou CD8 avec la molécule HLA. Lck activée phosphoryle ensuite les motifs ITAM (pour Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) situés sur les régions intracellulaires des chaînes protéiques ξ , δ et ϵ du CD3. Les résidus phosphorylés sont reconnus par les domaines SH2 de ZAP-70 (kinase de la famille Syk), ce qui permet son recrutement. Parallèlement à ce rapprochement de ZAP-70, il y a relocalisation de l'ensemble des partenaires de la signalisation. Ce phénomène de rapprochement permet une amplification du signal au niveau cytoplasmique. ZAP-70 activée par Lck, active par phosphorylation plusieurs protéines adaptatrices dont la protéine LAT (linker for activation of T cells). Des voies de signalisation parallèles sont activées par les protéines adaptatrices : la voie Ras et la cascade des MAP kinases ainsi que la voie de mobilisation du calcium. Ceci conduit à l'activation de plusieurs facteurs de transcription, comme NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) et NF κ B (nuclear factor-kappa B). Ces derniers activent directement la transcription de plusieurs gènes permettant l'activation de la réponse immune tels que les gènes codant pour l'IL2 et l'IL8 (Fisher et al., 2006).

1.4. Les mécanismes de polarisation des cellules T CD4+

Les cellules T CD4+ jouent un rôle central dans la nature des réponses induites, car elles se polarisent différemment selon que la réponse est de type Th1 (cytotoxique) ou Th2 (humorale, allergique). De plus, une nouvelle population de cellules T CD4+ productrice d'IL-17 jouerait un rôle dans les réponses auto-immunes. Enfin, des cellules T CD4+ particulières, appelées cellules T régulatrices, sont impliquées dans le rétrocontrôle des cellules T activées, ou dans l'induction d'une tolérance.

1.4.1. Les cellules T CD4+ de type Th1 ou Th2

La polarisation des L_T CD4+ en cellules auxiliaires de type Th1 ou Th2 (Figure 22) dépend de l'importance et de la durée de stimulation, de l'effet de cytokines et de l'environnement. Ainsi, pour que les cellules T CD4+ se différencient en cellules Th1, l'IL-12 produite par les CPA active STAT-4 (signal transducer and activator of transcription 4) et T-bet (le principal facteur de transcription qui contrôle la différenciation Th1) (Mullen et al., 2001). Parallèlement, STAT-3 et le facteur de

transcription GATA-3 sont nécessaires à la différenciation des cellules Th2 (Lee et al., 2001). Parce que la polarisation est un processus lent qui n'implique qu'une proportion de L_T , deux catégories de cellules sont induites : les L_T polarisés, c'est-à-dire avec une différenciation terminale, et les L_T non polarisés, comprenant des cellules intermédiaires dans leur processus de différenciation.

Au cours de cette différenciation lymphocytaire T, les fonctions effectrices et la capacité à migrer sont régulées de façon coordonnée. Ainsi, les L_T naïfs, qui expriment le récepteur de chimiokine CCR7, migrent dans les organes lymphoïdes secondaires pour se localiser dans l'aire des cellules T, attirés par leurs ligands SLC (Secondary lymphoid organ chemokine) et ELC (EBI-1 ligand chemokine). En revanche, parce qu'elles expriment peu de récepteurs CCR7, mais qu'elles expriment des récepteurs spécifiques de chimiokines inflammatoires, les cellules effectrices Th1 et Th2 migrent dans les tissus endommagés au niveau des sites d'inflammation. Les cellules T non polarisées continuent d'exprimer CCR7 (Sallusto et al., 2004).

1.4.2. Les cellules T CD4+ de type Th17

Récemment, on a rapporté que les cellules T CD4+ isolées des joints enflammés des patients présentant la maladie de Lyme contiennent une sous-population de cellules T CD4+ particulières qui sécrètent de l'IL-17. Cette sous-population est distincte des Th1 et Th2 et est nommée Th17 (Harrington et al., 2006). La formation de ces cellules impliquerait les cytokines TGF β , IL-6, IL-21 et IL-23. Les protéines impliquées dans leur différenciation sont STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) ainsi que ROR α et ROR γ (retinoic-acid-receptor-related orphan receptors) (Manel et al., 2008). Chez l'homme, une combinaison de TGF β , d'IL-1 β et d'IL-23 induit la différenciation de cellules T naïves en cellules Th17, alors que l'IFN- γ et l'IL-4, principaux stimulateurs de la différenciation Th1 et Th2 respectivement, régulent négativement la différenciation des cellules T en cellules Th17.

Ces cellules jouent un rôle clé dans les maladies autoimmunes et notamment dans la lésion des tissus (Stockinger and Veldhoen, 2007). Les cytokines effectrices associées aux cellules Th17 sont l'IL-17, l'IL-21 et l'IL-22 (Ouyang et al., 2008). Il existe deux types de cellules Th17 : les cellules IL-17A et les cellules IL-17F qui sont impliquées dans le recrutement, l'activation et la migration de neutrophiles.

1.4.3. Les cellules T CD4+ régulatrices

Une population particulière de L_T CD4+ a plutôt un rôle suppressif de la prolifération et des fonctions effectrices des L_T . Il s'agit de cellules T régulatrices qui

se composent des cellules TH3 et Tr1 d'une part et des cellules Trég qui sont une sous-population des CD4+ CD25+ d'autre part.

Les cellules Th3 (CD4+ CD25-) ont été découvertes par l'équipe de H.L.Weiner lors d'études réalisées sur la tolérance orale (Khoury et al., 1992). Ces cellules produisent des quantités élevées de TGF- β et des quantités moindres d'IL-4 et d'IL-10.

Les cellules Tr1 sont des L_T régulateurs de type 1 définis par leur aptitude à produire de l'IL-10 et des quantités modérées d'INF- γ , de TGF- β et d'IL-5. Phénotypiquement les Tr1 ont un phénotype CD4+ CD25- CD45R0+ CD62L+ (donc lymphocytes centraux mémoires). Ces cellules sont générées après stimulation antigénique répétée en présence d'IL-10. Spécifiques de l'Ag, les Tr1 peuvent supprimer les réponses naïves ou les réponses mémoires de types Th1 et Th2, de façon contact indépendante, grâce à la production de l'IL-10 et du TGF- β (Roncarolo et al., 2001).

Les cellules CD4+CD25+ constituent 5 à 10 % des lymphocytes T CD4+ périphériques et comprennent les cellules Treg mais également des lymphocytes T activés. Les Treg sont capables d'inhiber les manifestations auto-immunes (Shevach, 2002). Ainsi les souris dépourvues de cette sous-population de L_T développent des thyroïdites et des gastrites auto-immunes (Powrie et al., 1994). Le phénotype CD4+CD25+ est associé à l'expression du facteur de transcription FOXP3, qui joue un rôle fondamental dans les fonctions suppressives de cette sous population lymphocytaire ce dont nous parlerons dans le chapitre suivant.

2. Les lymphocytes T : fonctions effectrices et rôle dans la réponse anti-tumorale

Avant le contact avec l'Ag, les L_T ont un phénotype naïf. Ils expriment peu ou pas d'ARN messager codant pour des molécules de signalisation inter-cellulaires (cytokines) avec au premier rang l'IL-2. C'est une stimulation par le TCR soutenue qui permettra leur différenciation en cellules polarisées exprimant des cytokines de type Th1 (IFN- γ) ou Th2 (IL4, IL5) selon la nature des réponses induites. Parce que les cellules T CD4+ sont essentielles dans l'orientation des réponses induites, nous parlerons en premier lieu de ces cellules. Les cellules T CD8+ et leur capacité à lyser les cellules cibles seront ensuite décrites.

2.1. Les lymphocytes T CD4+

La stimulation antigénique d'un L_T CD4+ naïf en périphérie va dans un premier temps entraîner sa différenciation en L_T auxiliaire non polarisé (Th0), capable de sécréter des cytokines ayant des effets variés telles l'IL-2, l'IFN- γ , l'IL-13 et

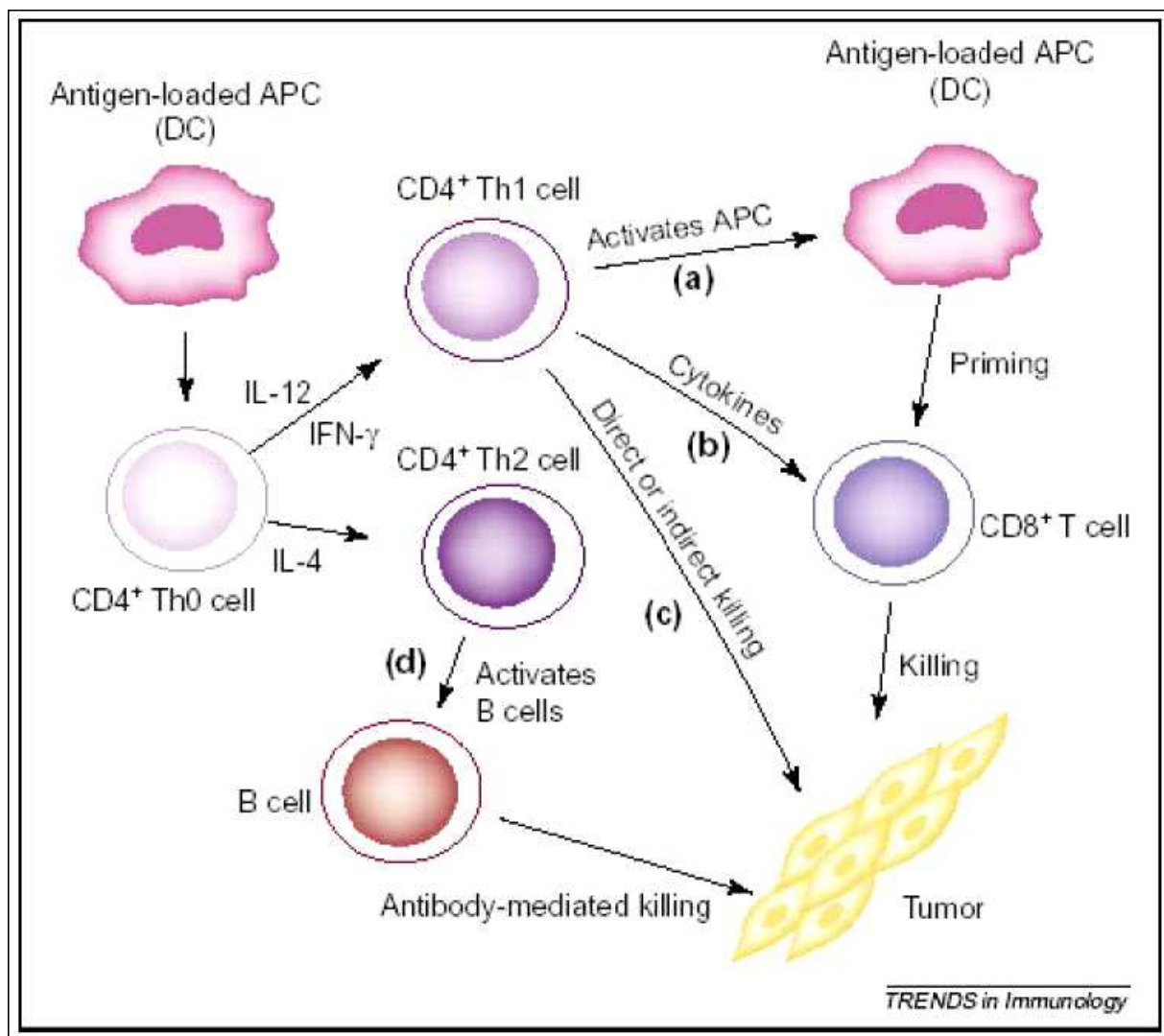


Figure 23 : Rôle des lymphocytes T CD4+ dans la modulation des réponses immunes antitumorales. (Wang *et al.*, 2001)

l'IL-4. Ces lymphocytes Th0 pourront ensuite se différencier en cellules Th1 ou Th2, définies selon le profil de cytokines qu'elles sécrètent. Les lymphocytes Th1 (IL-2, IFN- γ) sont les principaux acteurs de l'immunité à médiation cellulaire et entraînent une réaction inflammatoire concomitante, notamment en raison de la production des cytokines telles l'IFN- γ et le TNF. Ils jouent un rôle majeur dans les réponses anti-tumorales en favorisant l'activation des CTL et participent aux réactions de rejet de greffes. Les lymphocytes Th2 sécrètent majoritairement de l'IL-4 et de l'IL-13 et sont essentiels dans la réponse immune à médiation humorale. Bien que ces cellules soient décrites comme majoritairement impliquées dans l'allergie et la réponse anti-parasitaire, des études en modèle murin ont montré qu'elles pouvaient toutefois contribuer à l'induction de réponses anti-tumorales (Dobrzanski et al., 2004).

Les fonctions des cellules T CD4⁺ dans l'immunité anti-tumorale sont nombreuses (Figure 23). Elles permettent notamment l'initiation de la réponse immune, le maintien des fonctions et de la prolifération des cellules T CD8⁺ mais aussi une inhibition directe de la croissance des tumeurs. Cependant, ces fonctions nécessitent une activation préalable de ces lymphocytes via la présentation des Ag tumoraux.

2.1.1. La présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD4⁺

Comme décrits auparavant, les Ag tumoraux sont présentés aux L_T CD4⁺ sous forme peptidique associés aux molécules HLA-II présentes sur les DC. Les Ag tumoraux captés par les DC peuvent être des protéines sécrétées ou des protéines libérées dans le milieu après destruction de cellules tumorales. Cette présentation est nécessaire à l'initiation de l'activation des L_T CD4⁺.

Les L_T CD4⁺ peuvent également reconnaître directement les peptides antigéniques présentés par les cellules tumorales elles mêmes, lorsqu'elles expriment des molécules HLA-II. Cette voie de présentation est appelée "la voie de présentation endogène des molécules HLA-II" (Voire chapitre 2.C.4.). Dans ce cas de figure, les cellules tumorales jouent elles-mêmes le rôle de CPA. Cependant, le mécanisme de cette voie de présentation n'est pas encore clair. Il reste notamment à déterminer où a lieu le chargement des peptides dérivés des protéines cytosoliques. Récemment on a montré que des peptides cytosoliques peuvent être présentés par les molécules HLA-II par le mécanisme de l'autophagie. De plus, la plupart des cellules tumorales expriment peu de molécules HLA-II, et ne possèdent *à priori* pas de molécules de co-stimulation (ou ces molécules ne sont pas encore décrites). En conséquence, l'activation de cellules T CD4⁺ reste difficile par cette voie de présentation.

2.1.2. L'initiation de la réponse immune anti-tumorale

La plupart des tumeurs se développent dans un contexte non inflammatoire. L'activation des L_T CD8⁺ naïfs est initiée par les cellules T CD4⁺ spécifiques préalablement activées après leur rencontre avec les CPA.

Le rôle des cellules T CD4⁺ dans l'induction de la réponse immune a été extensivement démontrée, soit dans des modèles de souris knock-out pour le gène CD4, soit par la méthode de déplétion des cellules T CD4⁺ avec les Ac anti-CD4 (Hung et al., 1998). Depuis les années 90, il a été découvert que l'interaction entre la molécule CD40 exprimée par les CPA et leur ligand CD40L (CD154) exprimé par les cellules T CD4⁺ contribue à l'induction d'une immunité anti-tumorale protectrice (Mackey et al., 1998). De plus, cette interaction joue un rôle crucial dans l'initiation et l'activation des cellules T CD8⁺ (Bennett et al., 1998), en favorisant l'activation des L_T CD4⁺ d'une part, mais aussi celle des DC d'autre part, ces dernières devenant compétentes pour initier à leur tour l'activation des cellules T CD8⁺ par la voie HLA-I (Bennett et al., 1998).

2.1.3. Le maintien de la prolifération et de la fonction effectrice des CTL

Les L_T CD4⁺ sont aussi essentiels dans le maintien de la prolifération et des fonctions effectrices des CTL via la sécrétion des cytokines telles l'IL-2. L'IL-2 participe à la différenciation et à la survie des CTL, contribue à leur protection contre l'apoptose et l'anergie, maintient leur capacité cytotoxique et supporte la production d'autres cytokines (Rosenberg et al., 1998b). Les L_T CD4⁺ peuvent également activer directement les CTL. En effet, la cytotoxicité des CTL peut être augmentée *via* des molécules de costimulation (telles CD27, CD134) ou de présentation (HLA-II), présentes sur les L_T CD4⁺ (Giuntoli et al., 2002). D'autres études ont démontré que les L_T CD4⁺ non seulement arrivent à maintenir le nombre des L_T CD8⁺, ou à réactiver des CTL mémoires (Gao et al., 2002), mais aussi modulent l'environnement tumoral pour favoriser l'infiltration des CTL au site tumoral (Marzo et al., 2000).

2.1.4. L'inhibition de la croissance tumorale en l'absence des lymphocytes T CD8⁺

Les L_T CD4⁺ peuvent aussi éradiquer les cellules tumorales en recrutant et en activant des cellules effectrices comme les macrophages et les polynucléaires éosinophiles (Mattes et al., 2003). Dans l'inhibition de la croissance de tumeurs, le rôle pivot des L_T CD4⁺ a été démontré par différentes approches expérimentales. D'une part, en l'absence de L_T CD8⁺, de L_B et de cellules NK, les L_T CD4⁺ peuvent parvenir à inhiber la prolifération des cellules tumorales *in vivo*, voire les lyser, comme démontré *in vitro* dans des modèles murins (Flynn and Stockinger, 2003;

Lundin et al., 2003). D'autre part, chez la souris knock-out pour le gène CD4 la croissance de la tumeur est incontrôlée (Hung et al., 1998).

Les L_T CD4⁺ peuvent également être cytotoxiques via principalement l'activation des voies FAS et TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Thomas and Hersey, 1998). Cependant, des activations de la voie perforine/granzyme ont également été rapportés (Echchakir et al., 2000).

La production de cytokines, comme l'IFN- γ , par les L_T CD4⁺, permet un contrôle anti-tumoral en détruisant notamment la vascularisation tumorale (Qin and Blankenstein, 2000). Ainsi, l'équipe de JY Niederkorn a découvert dans un modèle de tumeur intra-oculaire que l'IFN- γ sécrété par les L_T CD4⁺ est indispensable à leur activité lytique envers les cellules tumorales via la voie TRAIL (Wang et al., 2003).

En conclusion générale, les L_T CD4⁺ peuvent lutter contre le développement tumoral selon divers mécanismes. Ils participent à l'activation des L_T CD8⁺ (CD40L/CD40), sécrètent des cytokines pour maintenir la fonction et la prolifération des CTL, et inhibent la croissance de tumeurs de manière directe ou indirecte (Wang et al., 2001).

2.2. Les lymphocytes T CD8⁺

Les L_T CD8⁺ sont les effecteurs principaux de l'immunité adaptative anti-tumorale. Après leur activation et leur prolifération, les L_T CD8⁺ naïfs se différencient alors en cellules effectrices (CTL). A terme, certaines de ces cellules effectrices se différencient en cellules mémoires (centraux et effecteurs).

Comme décrit ci-dessus, la qualité des réponses CTL est régulée par les cellules T CD4⁺, notamment pour l'induction des réponses secondaires, probablement parce qu'elles expriment le ligand de CD40 (CD40L), permettant d'améliorer la fonction des cellules T CD8⁺ mémoires (Bourgeois et al., 2002). La lyse des cellules tumorales est essentiellement attribuée aux CTL, bien que des études aient montré que les L_T CD4⁺ peuvent également être cytotoxiques et jouer un rôle dans l'immunité anti-tumorale (voir paragraphe ci-dessus).

De nombreuses études chez l'animal, et chez l'homme, ont montré que c'est la fonction cytotoxique des CTL qui est primordiale pour contrôler ou éradiquer une tumeur. Les CTL utilisent deux voies de cytotoxicité conduisant à la mort des cellules cibles, principalement par apoptose (ou mort cellulaire programmée). Ces deux voies sont la voie perforine/granzyme (Trapani et al., 1998), et la voie de signalisation par les récepteurs de mort, principalement celle impliquant FasL (Nagata and Golstein, 1995).

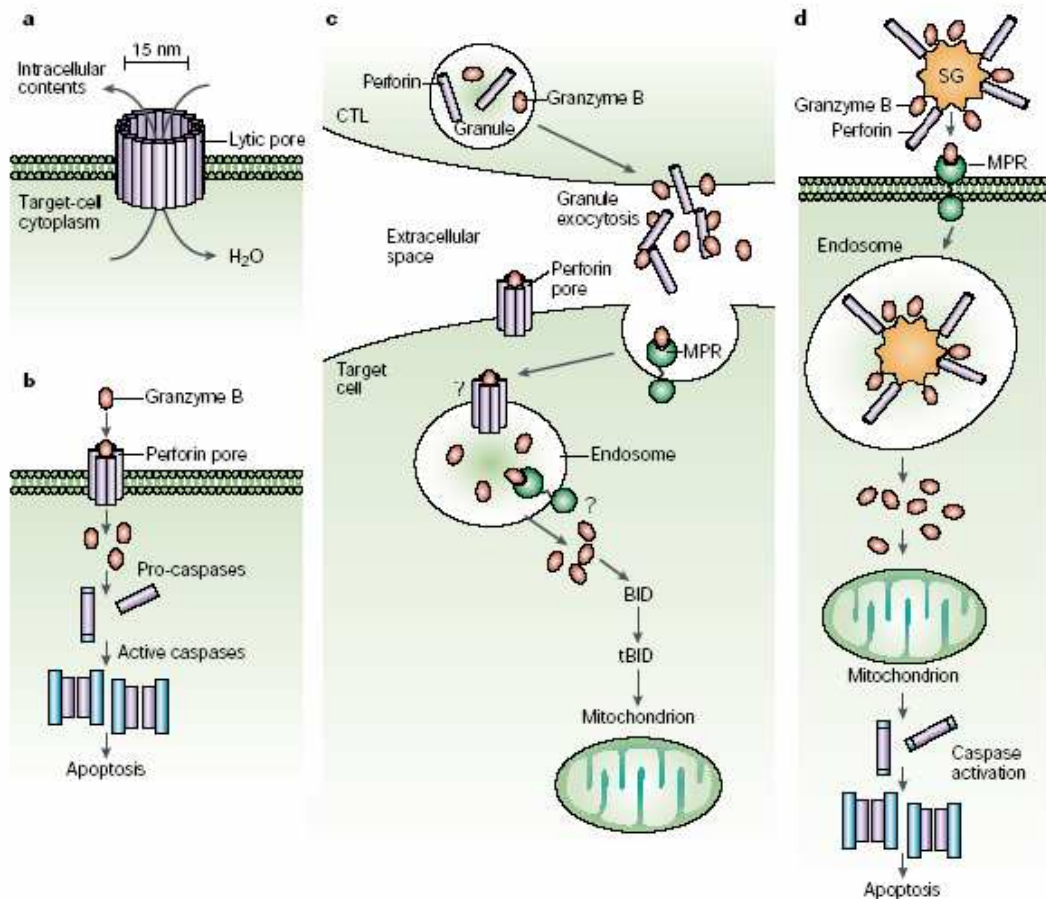


Figure 24 : Évolution du modèle de mort cellulaire par la voie perforine/granzyme

a) Initialement, dans les années 1980s, il a été proposé que la perforine jouait le rôle de molécule lytique induisant la mort des cellules par nécrose, en raison de la perte du contenu intracytoplasmique et l'éclatement des cellules se gorgeant d'eau.

b) Quand il a été montré que les granzymes coopéraient avec la perforine, il a été admis que la voie perforine/granzyme induisait la mort des cellules par apoptose, avec une diffusion passive des granzymes dans le cytosol des cellules cibles, leur permettant l'accès aux caspases.

c) Dans les années 90s, il a été montré que les granzymes entraient dans les cellules cibles par endocytose indépendamment de la perforine, et restaient séquestrées dans les vésicules en absence de perforine. De faibles quantités de perforine conduisaient à une perméabilisation membranaire minimale, mais aussi à une synergie avec les granzymes A et B, conduisant en une apoptose rapide.

d) Dans le modèle le plus récent, il est reconnu que le récepteur MPR pourrait être un candidat au récepteur du granzyme B, permettant la formation de complexes perforine/granzymes. Cela permettrait l'incorporation de ces complexes dans les cellules cibles, sans formation de pore spécifique à la perforine.

BID = BH3-interacting domain death agonist; CTL = cytotoxic T lymphocyte; NK = natural killer; tBID = truncated BID. (Trapani, 2002)

2.2.1. La voie perforine / granzyme

La voie perforine/granzyme est une voie d'exocytose dépendante du calcium de granules cytotoxiques médiée, comme son nom l'indique, par la perforine et les membres de la famille des sérines protéases appelées granzymes.

La voie perforine/granzyme est induite après contact direct entre la cellule effectrice et la cellule tumorale. Après engagement du complexe TCR/HLA, le cytosquelette d'actine se réorganise. Ainsi, le centre organisateur des microtubules (MTOC) se réoriente vers la synapse immunologique et intervient dans la ségrégation des molécules de signalisation, dans la relocalisation de l'appareil sécrétoire et dans la libération polarisée des cytokines et des granules cytolytiques dans l'espace délimité par la synapse (Kuhn and Poenie, 2002) (Figure 24). La libération de la perforine conduit à sa polymérisation, menant à la formation de pores à la surface des cellules cibles permettant le passage des granzymes. Parce que la perforine perméabilise les membranes cellulaires conduisant à une libération du contenu intra-cytoplasmique de la cellule cible, il a longtemps été admis qu'elle induisait la mort des cellules par un phénomène passif de nécrose. Pourtant, la compréhension des mécanismes moléculaires de la voie perforine/granzyme a révélé que les cellules cibles mourraient principalement par apoptose, sous l'action des granzymes, qui agissent, soit indirectement en activant des programmes apoptotiques dépendants de caspases, soit directement en clivant les substrats des caspases (Trapani et al., 1998). Il a également été montré que le récepteur au mannose 6 phosphate (mannose 6-phosphate receptor, MPR) pouvait servir de récepteur au granzyme B, indépendamment de la formation de pores spécifiques de la perforine.

De nombreuses autres protéines sont présentes dans les granules d'exocytose des CTL et possèdent aussi leur rôle dans l'activité cytotoxique (Lieberman, 2003). Parmi elles, nous pouvons citer la granulysine, une protéine toxique qui détruit directement les membranes bactériennes (Pena and Krensky, 1997) et dont la forme recombinante induit l'apoptose de lignées tumorales *in vitro* (Wang et al., 2000).

2.2.2. L'apoptose via les récepteurs de mort

a) L'apoptose via la voie Fas / Fas Ligand

Les CTL peuvent induire l'apoptose des cellules cibles via la voie Fas/FasL qui ne dépend, ni de la perforine, ni du calcium, bien que ce dernier soit nécessaire pour la synthèse et la mobilisation intracellulaire de FasL (Helgason et al., 1992). FasL présent sur les CTL et Fas, présent sur les cellules cibles appartiennent respectivement à la superfamille du TNF et du récepteur au TNF. La liaison de FasL sur son récepteur Fas (CD95) induit sa trimérisation (Itoh and Nagata, 1993) pour

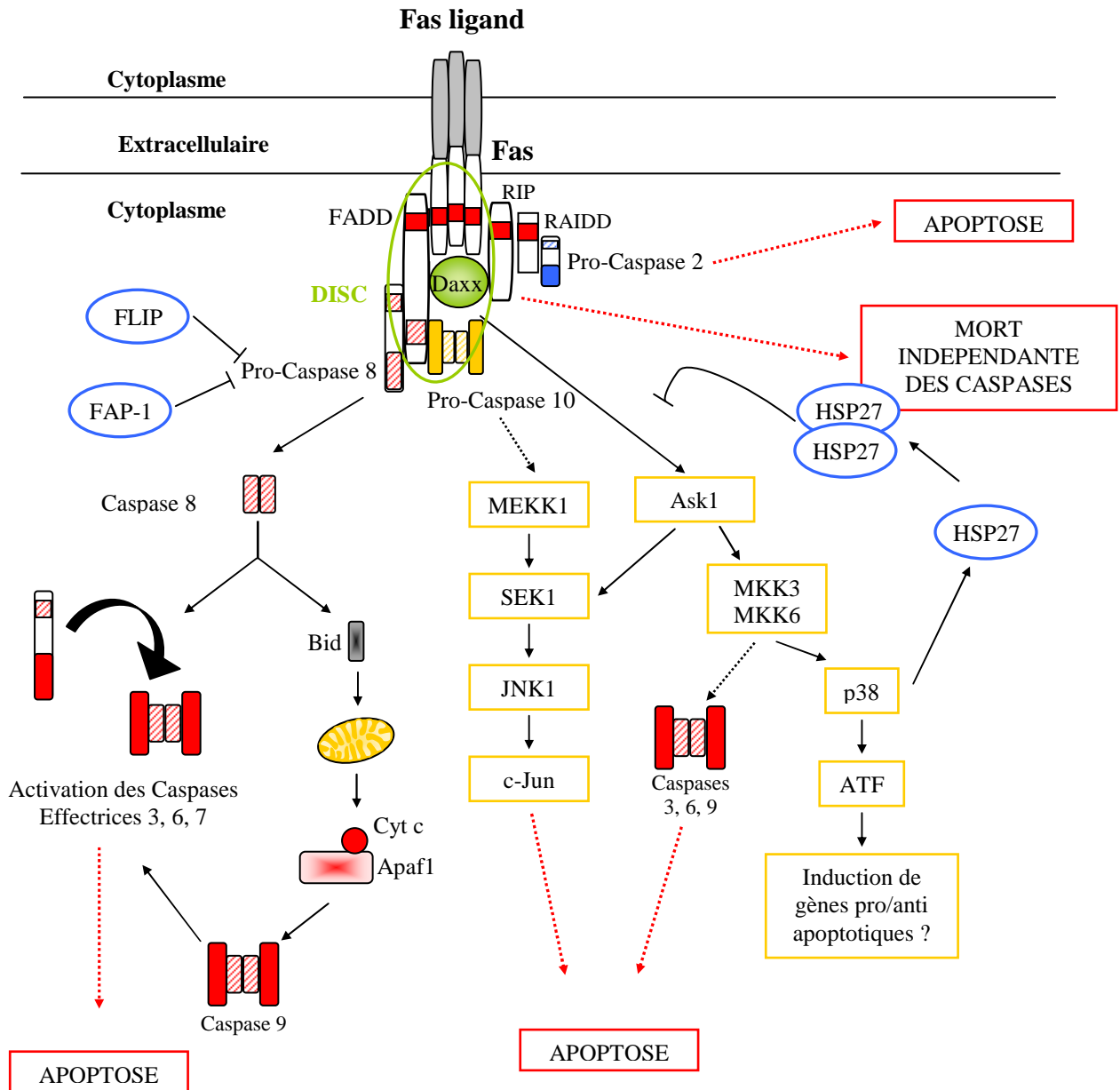


Figure 25 : Les différentes voies de signalisation par le récepteur Fas

La signalisation par le récepteur Fas est la voie de cytotoxicité via les récepteurs de mort la plus employée par les cellules effectrices du système immunitaire. Après liaison à son récepteur, le ligand de Fas induit la formation du DISC death. Trois molécules adaptatrices différencient les trois voies de signalisation pouvant être activées. 1) La molécule FADD conduit à l'apoptose de la cellule par induction d'une cascade de caspases activées. 2) La molécule Daxx peut avoir des effets anti- ou pro-apoptotiques, dépendant de l'environnement cellulaire. 3) La molécule RIP induit l'apoptose indépendamment ou non des caspases. (S. Delluc, 2005)

former un complexe de transmission du signal de mort, appelé DISC (death-inducing signaling complex). L'apoptose finale est caractérisée par une fragmentation de l'ADN, une condensation de la chromatine, une fragmentation du noyau en oligonucléosomes, et un bourgeonnement de la membrane plasmique formant des corps apoptotiques qui seront phagocytés par les cellules voisines. Trois molécules adaptatrices de Fas sont connues à l'heure actuelle et conduisent à trois voies distinctes responsables de l'apoptose ou de la prolifération cellulaire (Figure 25) :

La protéine adaptatrice FADD (Fas-associated death domain protein) est recrutée au niveau du DISC. FADD associe alors son domaine effecteur de mort (DED ; death-effector domain) à la région N-terminale des pro-caspases 8 ou 10. Le rapprochement de ces caspases vers le DISC conduit à leur activation par auto-clivage, puis à une cascade d'activation des caspases en aval, dégradant des substrats nucléaires et cytoplasmiques nécessaires au maintien de l'intégrité cellulaire. Selon les voies stimulées en aval de la caspase 8, deux types cellulaires sont définis. Dans les cellules de type I, une grande quantité de caspase 8 est activée, conduisant à une apoptose rapide par clivages protéolytiques successifs de caspases. La voie mitochondriale est activée dans les cellules de type I, mais n'est cependant pas nécessaire à l'apoptose. La protéine FLIP (FLICE inhibitory protein) est une molécule inhibitrice de cette voie, car elle prévient le recrutement de la pro-caspase 8 au niveau du DISC (Irmeler et al., 1997; Tschopp et al., 1998). Dans les cellules de type II, une trop faible quantité de caspase-8 activée ne suffit pas à induire directement la cascade de caspases, mais permet en revanche le clivage, et donc l'activation de la molécule Bid qui migre dans la mitochondrie pour entraîner le relargage de cytochrome c (Li et al., 1998). Ce processus aboutit finalement à la mort par une activation indirecte des caspases.

La molécule Daxx (Fas death domain associated protein xx) est une protéine adaptatrice de Fas, qui présente la particularité de se lier aux domaines DD (Death Domaine) de Fas par son extrémité C-terminale, car elle n'a pas de domaine DED. Cette protéine Daxx active *via* la molécule ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) la voie SAPK/JNK conduisant à terme à l'apoptose, et la voie des kinases MKK-3 et -6 induisant selon les conditions environnementales des effets pro ou anti-apoptotiques. Cette voie reste cependant peu impliquée dans l'apoptose, contrairement à la voie Fas-FADD, et serait davantage impliquée dans des phénomènes de survie cellulaire. En effet, des mutants de Fas capables de lier Daxx, mais pas FADD, sont peu sensibles à l'apoptose (Wang et al., 1999a). En revanche, des souris déficientes en Daxx meurent durant leur développement embryonnaire d'un excès d'apoptose (Michaelson et al., 1999).

La molécule **RIP** a été récemment montrée comme étant également une molécule adaptatrice de Fas, permettant l'induction de l'apoptose de façon dépendante ou indépendante des caspases (Holler et al., 2000), ce dernier mécanisme étant encore mal connu. La voie dépendante des caspases implique, comme pour la voie du TNF-R1, l'activation de la caspase-2 par l'intermédiaire de la protéine RAIDD (RIP-associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a death domain).

b) L'apoptose via les autres récepteurs de mort : TNF-R1, DR3, et TRAIL

D'autres molécules que Fas, faisant également partie de la superfamille du TNF, peuvent jouer un rôle cytotoxique par induction de l'apoptose des cellules cibles. Parmi ces récepteurs, certains ont été bien caractérisés, comme TNF-R1, DR3 ou Apo3, DR4 ou Apo2/TRAIL-R1, DR5 ou TRAIL-R2, DR6 (Ashkenazi and Dixit, 1998).

Brièvement, l'engagement du **TNF-R1** (TNF receptor 1) par son ligand, le TNF- α , conduit à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP1, qui vont à leur tour induire l'expression de molécules impliquées dans les processus inflammatoires, la réponse au stress, l'immunorégulation... (Tartaglia and Goeddel, 1992). La liaison du TNF à son récepteur peut également conduire à l'apoptose de la cellule qui exprime ce récepteur, bien que celle-ci soit limitée du fait de l'expression de nombreuses molécules à activité anti-apoptotique induites elles aussi par la voie NF- κ B.

Du fait de la très forte homologie du **récepteur DR3** (Apo3) au TNF-R1, les mêmes voies que celles du TNF- α seront induites après la liaison de son ligand Apo3L. Toutefois, les types cellulaires potentiellement capables de répondre à ces molécules sont différents, probablement en raison du fait que Apo3 a une expression restreinte aux cellules de la rate, du thymus et du sang, contrairement au TNF-R1, dont l'expression est ubiquitaire (Chinnaiyan et al., 1996; Marsters et al., 1998).

TRAIL est la molécule de la famille du TNF qui ressemble le plus à FasL. Comme le TNF- α et le FasL, elle est capable d'induire l'apoptose des cellules tumorales ou infectées par un virus. En revanche, contrairement à ses deux homologues, TRAIL n'est pas cytotoxique pour les cellules saines (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999). Bien que les molécules impliquées dans la transmission du signal via TRAIL sont encore mal connues, il est aujourd'hui admis que TRAIL implique le recrutement de l'adaptateur FADD.

2.2.3. Le rôle des CTL dans l'immunité anti-tumorale

La lyse spécifique de la cellule tumorale par des lymphocytes T cytotoxiques est la phase effectrice d'une réponse immunitaire. Lorsqu'elles sont activées, les CTL

peuvent lyser les cellules tumorales qui présentent à leur surface sur les molécules HLA-I des épitopes T, issus de la dégradation de protéines endogènes. In vivo, ils doivent pour cela recirculer dans l'organisme, des ganglions lymphatiques jusqu'aux cellules cibles. Ils exercent alors leur activité anti-tumorale par les mécanismes de cytotoxicité que nous venons de décrire.

Chez l'homme, des CTL ont été mis en évidence dans le sang périphérique et dans les tissus tumoraux de patients atteints de nombreux cancers (Belldegrun et al., 1988; Ferrini et al., 1985; Itoh et al., 1988). Le rôle fonctionnel de ces CTL a été démontré dans des situations cliniques privilégiées de régressions tumorales spontanées. Par exemple, à partir de biopsies de patients présentant un mélanome spontanément régressif, des CTL cytotoxiques antitumoraux ont été mis en évidence, suggérant fortement leur implication dans la régression spontanée de ces tumeurs (Mackensen et al., 1994).

Le groupe de S.A Rosenberg a le premier montré que l'expansion *in vitro* par de l'IL2, de TIL, suivie de leur administration à des souris, entraînait la guérison de métastases hépatiques macroscopiques et de métastases pulmonaires (Rosenberg et al., 1986). Cet effet était induit principalement par les CTL dont l'efficacité était corrélée à leur capacité à lyser la tumeur autologue (Barth et al., 1991; Cohen et al., 2001). Un rôle plus direct des CTL dans l'élimination des tumeurs a été montré par l'efficacité thérapeutique de clones T CD8 cytotoxiques dirigés contre différents peptides viraux et exprimés par des tumeurs murines. De même l'administration de clones T CD8 humains cytotoxiques contre une lignée de mélanomes humains transplantée chez la souris SCID a entraîné la disparition de nodules métastatiques (Feltkamp et al., 1995). Chez l'homme, des réponses cliniques ont été obtenues après administration de TIL associés à de l'IL2 (Hoffman et al., 2000). Comme chez la souris, une corrélation a été établie entre la capacité des CTL présents parmi les TIL à lyser la tumeur autologue et les régressions tumorales (Schwartzentruber et al., 1994).

2.3. Les lymphocytes T mémoire

Lorsque les L_T CD4⁺ et CD8⁺ sont activés, plusieurs mécanismes de rétrocontrôle peuvent intervenir pour limiter les effets pro-inflammatoires des cellules effectrices. Les cellules T peuvent entrer en apoptose par la voie des récepteurs de mort (Fas et TNF), ou peuvent mourir par le processus d'AICD (activation-induced cell death). Les molécules effectrices elles-mêmes, telles l'IFN- γ ou la perforine peuvent entraîner la mort des cellules T activées (Sallusto et al., 2004). Alors que l'administration d'IL-2 permet d'augmenter la prolifération des cellules T et leur survie (Blattman et al., 2003), elles peuvent aussi induire l'apoptose des cellules T par AICD si la dose est trop élevée.

Quelques L_T survivent à l'apoptose pour devenir des cellules T dites mémoire. Lanzavecchia & al ont proposé l'existence de deux sous-populations de cellules T mémoires, définies selon leur localisation tissulaire et leur capacité à répondre ou non rapidement à une restimulation antigénique (Lanzavecchia and Sallusto, 2000).

Les cellules T mémoires centrales, définies comme des cellules intermédiaires dans leur différenciation, expriment CCR7 et la L-selectine (CD62L), produisent majoritairement de l'IL-2 et répondent plus rapidement que les cellules T naïves à une stimulation du TCR. Ces cellules T peuvent stimuler la production d'IL-12 par les DC et peuvent se différencier de façon terminale après une seconde rencontre avec l'Ag pour orienter la réponse immunitaire vers une réponse Th1 ou une réponse Th2.

Les cellules T mémoires effectrices sont des cellules différenciées qui produisent de l'IFN- γ (Th1), ou de l'IL-4 (Th2) et renferment de la perforine. Ces cellules n'expriment pas CCR7, mais expriment des récepteurs de ciblage des tissus endommagés, leur fonction principale étant de fournir une protection en périphérie (Langenkamp et al., 2000).

Chapitre 3

L'immunogénicité des tumeurs

L'immunogénicité des tumeurs a été extensivement étudiée *in vivo* chez la souris. Après transplantation, la plupart des tumeurs s'étendent progressivement et finissent par tuer l'hôte. Cependant, l'injection de cellules tumorales irradiées limite ou bloque le développement de tumeurs implantées sauf quand les souris sont déficientes en L_T . Par transfert adoptif de L_T spécifiques de la tumeur, la protection est restaurée (Spiess et al., 1987). Chez l'homme, l'immunogénicité des tumeurs a également été montrée dans des études de transfert adoptif de L_T . Ainsi, l'injection de L_T spécifiques de la tumeur et dérivés *in vitro*, à des patients atteints de cancer, peut permettre l'induction d'une régression tumorale (Cohen et al., 1994).

La spécificité de la réponse immunitaire anti-tumorale est déterminée par la capacité des CTL à reconnaître spécifiquement des peptides antigéniques exprimés par les cellules tumorales : on parle d'Ag associés aux tumeurs (TAA ; Tumor-associated antigen). L'identification d'un nombre croissant de TAA a permis d'envisager des stratégies d'immunothérapie spécifiques du cancer. Néanmoins, la réponse immunitaire induite contre les tumeurs demeure peu efficace, comparée à celle induite contre les virus. Ceci est probablement lié au fait que les tumeurs sont capables d'échapper au système immunitaire. D'autre part, il ne faut pas oublier que la tumeur exprime la plupart du temps des Ag du soi, ce qui explique la tolérance du système immunitaire. Ces différents paramètres doivent être pris en considération pour définir des stratégies d'immunothérapie anti-cancéreuses efficaces.

Dans ce chapitre, nous parlerons des systèmes d'identification et de classification des TAA. Nous parlerons également des mécanismes d'échappement des tumeurs au système immunitaire ainsi que des différentes approches d'immunothérapies actives anti-tumorales.

A. Les antigènes tumoraux

Les premières tumeurs immunogènes ont été décrites dans des modèles murins dans les années 40 (Gross, 1943). Cependant, ce n'est que 20 ans après que les premiers TAA ont été définis chez l'homme. Parmi ces Ag, on peut citer par exemple, l'Ag carcino-embryonnaire (CEA) dans le carcinome colorectal (Gold and Freedman, 1965), ou encore l' α -fetoprotéine dans le carcinome hépatocellulaire (Abelev et al., 1971). Les premiers TAA décrits comme responsables de l'induction de réponses immunitaires anti-tumorales appartiennent à la famille MAGE (van der Bruggen et al., 1991). L'évolution des technologies, notamment de biologie moléculaire et de

biochimie, ont permis aujourd'hui l'identification de nombreux TAA et la description des séquences épitopiques reconnues par les L_T.

1. Les systèmes d'identification des antigènes tumoraux

Différentes approches ont permis l'identification de TAA (Chouaib et al., 2001). Les premières approches ont pour but de rechercher des peptides capables d'induire des réponses T, soit par l'obtention de CTL spécifiques de tumeurs, soit par l'identification d'épitopes T potentiels. Une approche inverse consiste à isoler des cellules T réactives ou des TIL issues de patients et à identifier les protéines et/ou TAA que ces cellules T reconnaissent. Une troisième approche nommée SEREX, consiste à identifier des TAA responsables de l'induction de réponses humorales. L'ensemble de ces approches peut être soutenu par l'emploi de logiciels informatiques de prédiction d'épitopes, que nous décrirons à la fin de ce chapitre.

1.1. Stratégies basées sur l'identification de TAA à partir de TIL ou de cellules T réactives, ou basée sur l'activation de CTL spécifiques de tumeurs

Les stratégies les plus classiques d'identification de TAA sont basées sur l'analyse de la spécificité du répertoire du TCR pour une cible donnée. Elles nécessitent l'obtention de cellules T réactives qui peuvent être isolées à partir de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) (Topalian et al., 1989) ou induits par stimulation *in vitro* avec des cellules tumorales (Coulie et al., 1993).

Ces approches, bien qu'ayant permis l'identification d'un peptide viral dès 1990 ne sont devenues applicables qu'avec le développement des **technologies biochimiques** combinant l'élution des peptides liés aux molécules HLA par traitement acide (acide trifluoroacétique ou citrate-phosphate), la séparation et la purification de ces peptides par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), et le séquençage par spectrométrie de masse des fractions peptidiques capables d'induire *in vitro* l'activation de CTL spécifiques. Cox et al (Cox et al., 1994) ont été les premiers à utiliser cette approche pour identifier un TAA humain reconnu par les CTL, la gp 100. Le TFA (acide trifluoroacétique) a été largement utilisée pour l'élution acide. Cependant, le TFA ne permet pas de garder les cellules viables. C'est pourquoi le Dr Storkus et son équipe ont développé une approche alternative utilisant le citrate-phosphate (CP) comme substitut du TFA, qui, permet de maintenir la viabilité des cellules afin de réaliser plusieurs cycles d'élution (Storkus et al., 1993).

La seconde approche de ce genre est une approche génétique qui consiste à transfecter, conjointement dans des CPA, une banque d'ADN complémentaire (ADNc) préparée à partir des ARN messagers (ARNm) de cellules tumorales et le

gène codant pour la molécule HLA pertinente pour la présentation de cet Ag. L'ADNc induisant une activation du clone CTL spécifique est alors séquencé, et plusieurs minigènes codant des parties distinctes de cet Ag sont transfectés dans les cellules cibles, afin de localiser grossièrement la ou les séquence(s) épitopiques.

C'est par cette approche que le premier TAA associé au mélanome, MAGE-1, a été identifié (van der Bruggen et al., 1991). Par la suite, d'autres TAA ont été identifiés notamment MART-1, MAGE-A1 et MAGE-A3. Bien que la plupart des peptides reconnus par les TIL, ou par les CTL anti-tumoraux spécifiques induits *in vitro*, soient restreints aux molécules HLA-I, des peptides HLA-II ont aussi été identifiés plus récemment par cette approche. C'est ainsi que des TIL CD4⁺ isolés à partir de patients atteints de cancer cervical sont capables de reconnaître 2 peptides dérivés de la protéine E7 du papillomavirus humain (HPV) et présentés par les molécules HLA-DR4 (Hohn et al., 1999). Le Dr Wang et son équipe ont également identifié un nouvel Ag dérivé d'une protéine de fusion reconnu par des TIL CD4⁺. Ils ont identifié que cette néo-protéine résultait d'un réarrangement chromosomal entre les gènes codant pour les protéines LDLR (low density lipid receptor) et FUT (GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase) (Wang et al., 1999b).

Cette technique présente l'avantage de pouvoir tester un grand nombre de cibles protéiques différentes et permet l'identification des peptides immunogènes apprêtés de façon correcte à la surface des cellules. Cependant, cette approche ne permet que l'identification des épitopes dominants mais pas celle des épitopes sous-dominants dont la présentation par les CPA est moins efficace que celle des cellules tumorales, ne permettant pas de ce fait d'induire *in vitro* la stimulation de CTL (L'immunodominance des épitopes T sera abordée dans la partie C. de ce chapitre). Enfin, cette technique ne permet pas l'identification de peptides tumoraux présentant des modifications post-traductionnelles qui ne peuvent pas être déduites de la séquence génétique (Skipper et al., 1996).

Bien que cette stratégie ait permis l'identification d'un grand nombre de TAA, elle nécessite l'obtention de clones CTL et la connaissance de l'élément de restriction HLA. Une alternative à l'utilisation de lignées cellulaires T isolées chez des patients cancéreux est l'analyse des tumeurs (ou cellules cibles) capables d'induire l'activation de CTL spécifiques *in vitro*. C'est une technique dite **d'immunologie inverse**.

La majorité des épitopes connus à ce jour a été identifié par cette troisième approche qui laisse supposer que la protéine cible étudiée, si elle induit des CTL spécifiques, joue un rôle dans le développement tumoral. Bien que cette approche ne nécessite pas d'avoir de clone de L_T spécifiques de la lignée tumorale, ni de déterminer l'élément de restriction HLA, elle nécessite en revanche, l'identification de protéines cibles potentielles, et la prédiction des épitopes.

L'identification des protéines cibles peut se faire par diagnostic différentiel, en comparant le profil d'expression de tissus pathologiques à celui de tissus sains par diverses techniques telles la RT-PCR, l'immuno-histochimie, le Western Blot, les études transcriptomiques, ou encore par méthodologie d'hybridation soustractive d'ADNc combinée aux puces à ADN. Cette dernière approche a ainsi permis l'identification de 17 gènes surexprimés dans les carcinomes de cellules squameuses (Wang et al., 2000).

L'identification des épitopes inclus dans la séquence de la protéine cible immunogène peut se faire selon diverses approches. La première approche consiste à faire une librairie de peptides chevauchants couvrant la séquence entière de la protéine cible étudiée. Les épitopes de l'Ag MAGE-A3 dans le mélanome (Chaux et al., 1999), NY-ESO 1 (Jager et al., 2000), et de l'Ag membranaire spécifique de prostate (PMSA) dans les cancers de la prostate ont été identifiés par cette méthode (Schroers et al., 2003b).

Cette approche présente l'avantage d'identifier l'ensemble des épitopes T présents dans la séquence de la protéine étudiée. Un inconvénient significatif est le coût de construction de librairie de peptides et le nombre important de peptides à tester, surtout pour les grosses protéines cibles.

Une seconde approche consistant en la prédiction au préalable des peptides à tester a donc été développée. Ces prédictions sont basées sur la capacité des peptides à se lier de façon stable à une ou plusieurs molécules HLA fréquemment représentées dans la population. Elles peuvent se faire par des méthodes biochimiques ou par logiciels informatiques (voir chapitre ci-dessous). Ces prédictions peuvent aussi se baser sur la capacité du protéasome à cliver correctement la protéine dont les peptides sont issus, afin de sélectionner les peptides naturellement apprêtés par les cellules tumorales (PAPROC) (Schirle et al., 2001). Cette approche de prédiction peut générer des faux négatifs, c'est-à-dire des peptides de faible affinité pour la molécule HLA étudiée qui seraient exclus, alors qu'ils sont capables d'induire l'activation de CTL spécifiques. En effet, la faible capacité de liaison d'un peptide à une molécule HLA donnée peut être compensée par une forte affinité de son TCR pour le complexe "molécule HLA/peptide" (Arnold et al., 2002).

L'ensemble de ces méthodologies est donc un moyen efficace pour identifier des épitopes T, au sein de séquences protéiques, capables d'activer des CTL *in vitro*. Pour autant, ces derniers ne sont pas toujours capables de reconnaître la tumeur dont les peptides sont issus (Ayyoub et al., 1999; Zaks and Rosenberg, 1998). La première hypothèse est que les CTL induits *in vitro* par de fortes concentrations de peptides sont de faible affinité et incapables de reconnaître les faibles quantités d'Ag exprimées par cellules tumorales (Dahl et al., 1996). La seconde hypothèse est que les modifications post-traductionnelles générées par la cellule tumorale conduisent à la

présentation d'Ag différents de ceux initialement prédits (Skipper et al., 1996). Enfin dans certains cas, les épitopes identifiés ne sont pas apprêtés de façon correcte par les cellules tumorales. L'ensemble de ces constats impose donc de vérifier la reconnaissance directe de cellules tumorales par les CTL induits *in vitro*. Certaines améliorations techniques, comme l'induction de CTL spécifiques par des DC chargées avec la protéine étudiée entière (Chaux et al., 1999), ou encore la corrélation entre épitopes prédits et présentation naturelle de ces épitopes (digestions *in vitro* par le protéasome par exemple) (Kessler et al., 2001), ont permis de résoudre en partie ces problèmes.

1.2. L'approche sérologique (SEREX)

L'approche sérologique constitue un outil pour identifier les TAA qui sont naturellement immunogènes. Cette approche SEREX (Serological analysis of recombinant cDNA expression libraries with autologous serum) se distingue des précédentes, car elle est basée sur l'identification de peptides reconnus par des L_B, et non plus par des L_T, à partir de sérums de patients atteints d'un cancer.

Elle est fondée sur l'existence d'une réponse anti-tumorale de type humorale spécifique. La technique consiste à établir une banque d'ADNc à partir de la lignée tumorale, à exprimer cette banque dans des bactéries, puis à cribler l'expression des protéines recombinantes à l'aide du sérum du patient (Pfreundschuh et al., 1978). Le résultat révèle l'ensemble des TAA exprimés par la tumeur induisant une réaction immunitaire humorale comme l'Ag SSX-2. D'autres Ag identifiés par cette approche, comme la tyrosinase et NY-ESO 1 sont reconnus par des Ac spécifiques mais aussi par les CTL. Le Dr Pfreundschuh et son équipe ont été les premiers à utiliser le sérum de patients atteints de lésions cancéreuses pour identifier des TAA par cette approche (Pfreundschuh, 2000; Preuss et al., 2002). Cette méthode d'identification présente l'inconvénient de n'être utilisable que dans le cas de titres élevés en Ac (Chouaib et al., 2001).

1.3. Les modèles informatiques de prédiction d'épitopes

L'étude de la prédiction des épitopes doit tenir compte des résidus d'ancrage. En effet, il a été montré par exemple que 70 % des peptides ayant des résidus d'ancrage primaires appropriés ont une faible affinité pour la molécule HLA-A*0201 et, inversement, des peptides ne présentant pas les résidus d'ancrages primaires appropriés, peuvent tout de même se fixer correctement à cette même molécule HLA. Cela est dû à la présence des résidus secondaires qui influencent l'interaction HLA/peptide (Ruppert et al., 1993). Des modèles informatiques qui tiennent compte du rôle des résidus d'ancrage primaires et secondaires ont été construits (logiciels

BIMAS, SYFPEITHI ou PROPRED-1). Ces modèles sont basés sur la mise au point d'algorithmes pour prédire des motifs de peptides pour la liaison aux molécules HLA-I et/ou HLA-II. Les algorithmes actuellement utilisés sont basés soit sur les motifs de liaison, soit sur les matrices quantitatives, soit sur les réseaux neuronaux ANN (*artificial neural network*).

Le Dr Hassainya et son équipe ont employé deux algorithmes « BIMAS » et « SYFPEITHI » combinés aux données de la digestion par le protéasome pour identifier les épitopes dérivés de la pro-insuline, un auto-Ag jouant un rôle important dans le diabète de type 1 (Hassainya et al., 2005).

« SYFPEITHI », le premier algorithme de prédiction d'épitopes restreints à HLA-I, a été basé sur l'identification de résidus d'ancrage (Rammensee et al., 1999).

Le deuxième algorithme « BIMAS », développé par le Dr K.C. Parker et ses collaborateurs (Parker et al., 1994). Il classe les peptides potentiels selon le demi-temps de dissociation des complexes HLA-I/peptide qu'il prédit. Dans l'étude de Hassainya, 10 peptides ont été sélectionnés. Parmi eux, sept sont immunogènes chez la souris transgénique HLA-A2, mais finalement six sont naturellement apprêtés et présentés par des cellules exprimant la pro-insuline (Hassainya et al., 2005).

Pour prédire les épitopes T CD4+ restreints à HLA-II, l'algorithme TEPITOPE développé plus récemment a montré son efficacité (Sturniolo et al., 1999). Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, le site de fixation d'un peptide sur une molécule HLA-II se compose d'un sillon formé de 5 positions spécifiques appelées poches. Par comparaison de séquences des allèles HLA-II, les auteurs ont trouvé qu'il existe un nombre limité de profils de polymorphisme pour une poche donnée. Les auteurs ont pu évaluer l'affinité de chaque type de poche pour chacun des 20 acides aminés, et, en considérant l'interaction des acides aminés avec les 5 poches comme indépendantes, ont pu évaluer l'affinité des peptides pour chaque forme allélique des molécules HLA-II. L'utilisation de TEPITOPE permet de calculer les forces de liaison de tout peptide pour les 51 allèles HLA-II. Les peptides ayant les plus grandes forces de liaison seraient présumés pour être les épitopes immunodominants. Cette méthode, basée sur l'emploi d'une matrice, permet également l'identification des peptides capables de se lier à plusieurs formes alléliques de HLA-II. Ces peptides sont appelés peptides « promiscuous ». De ce fait, ces peptides représentent les candidats les plus prometteurs pour une approche vaccinale. TEPITOPE a été appliqué à la recherche d'épitopes T dérivés d'Aggs tumoraux comme gp100 (Cochlovius et al., 2000), MAGE-A3 (Consogno et al., 2003), RAGE-1 (Stassar et al., 2001), mais aussi pour la recherche d'épitopes viraux comme ceux dérivés de la glycoprotéine D de l'HSV (herpes simplex virus) (BenMohamed et al., 2003).

Gène/Protéine	Tumeur	Référence
antigènes spécifiques du patient (des antigènes mutés ou protéines de transcrits de fusion)		
MUM-1	mélanome	[Coulie et al., 1995]
CDK4	mélanome	[Wolfel et al., 1995]
β -caténine	mélanome	[Rubinfeld et al., 1997]
HLA-A2	carcinome rénal	[Brandle et al., 1996]
Bcr-abl	leucémie myéloïde	[Bosch et al., 1996]
CASP-8	carcinome de la tête et du cou	[Mandrizzato et al., 1997]
p53	cancer colorectal, de la vessie, de l'estomac	[Gnjatic et al., 1998]
antigènes spécifiques de tumeur (cancer-testis antigens)		
MAGE 1	mélanome	[Traversari et al., 1992]
MAGE 3	mélanome	[van der Bruggen et al., 1994]
MAGE 6	mélanome	[Zorn and Hercend, 1999]
BAGE	mélanome	[Boel et al., 1995]
GAGE	mélanome	[Russo et al., 1996]
RAGE	mélanome	[Pellat-Deceunynck et al., 2000]
PRAME	mélanome	[Ikeda et al., 1999]
NY ESO1	mélanome	[Valmori et al., 2000]
CEA	carcinome colorectal	[Tsang et al., 1995]
antigènes de différenciation		
tyrosinase	mélanome	[Kawakami et al., 1998]
gp-100	mélanome	[Skipper et al., 1996]
Melan-A/mart-1	mélanome	[Kawakami et al., 1994]
thyroglobuline	cancer de la thyroïde	[Fong and Engleman, 2000]
α -fetoprotéine	cancer du foie	[Fong and Engleman, 2000]
antigènes surexprimés		
gp75	mélanome	[Neumann et al., 1998]
PSA	cancer de la prostate	[Correale et al., 1997]
PMSA	cancer de la prostate	[Fong and Engleman, 2000]
HER-2/neu	cancer du sein, de l'ovaire et colo-rectal	[Fisk et al., 1995]
p53	cancer colorectal, de la vessie, de l'estomac	[Gnjatic et al., 1998]
antigènes viraux		
EBV	lymphome de Burkitt	[Moss et al., 1999]
HPV	cancer du col de l'utérus	[Ressing et al., 1995]

Tableau 7 : Les différentes classes d'antigènes tumoraux humains

Notre laboratoire s'est inspiré de TEPITOPE pour développer un programme de prédiction de liaison des peptides aux molécules HLA-DP4. Des peptides sélectionnés par ce programme se sont montrés immunogènes puisqu'ils ont permis l'activation de L_T CD4+ spécifiques (Busson et al., 2006; Castelli et al., 2002; Wang et al., 2007b; Zarour et al., 2002).

2. Classification des antigènes tumoraux

Un Ag tumoral idéal correspondrait à une structure exprimée par les cellules tumorales, peu ou pas dans les tissus nécessaires à la survie, et reconnue par le système immunitaire adaptatif de l'hôte de manière efficace. Cependant, tous les TAA utilisés à ce jour en immunothérapie ne répondent pas à cette définition, dans la mesure où les tumeurs se développent dans les tissus de l'hôte, rendant difficile une distinction entre Ag du soi et Ag tumoraux.

La classification des différents TAA identifiés se fait selon la nature de leur expression (Jager et al., 2000) et est présentée dans le Tableau 7. Ainsi, cinq grands groupes d'Ag tumoraux ont été proposés.

2.1. Les antigènes tumoraux spécifiques du patient

Les cellules tumorales sont le siège d'un nombre important de mutations génétiques survenant au hasard ou bien consécutives au processus de tumorigénèse. Ces mutations témoignent de leur instabilité génétique. Des protéines ubiquitaires peuvent donc être mutées dans les cellules tumorales, et générer de nouveaux Ag spécifiques des tumeurs (TAA). De tels TAA peuvent être des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (CDK4) (Wolfel et al., 1995), dans le contrôle de la prolifération (β -caténine) (Robbins and Kawakami, 1996) ou encore dans l'induction de l'apoptose (Mandelboim et al., 1994). Ces protéines sont normalement exprimées dans les cellules somatiques dans lesquelles leur niveau d'expression est faible. Dans le cas de cellules tumorales, ces Ag sont alors fortement exprimés et deviennent des oncogènes impliqués dans la tumorigénèse. Ces protéines sont alors potentiellement immunogènes. Certaines mutations au niveau des produits du proto-oncogène ras ou du gène suppresseur de tumeurs p53 sont reconnues par des L_T CD4+ et CD8+(Gjertsen et al., 2001; Theobald et al., 1995). Ces Ags sont particulièrement intéressants, car ils ont un large spectre d'expression dans les cancers. Ainsi, les Ag issus de mutations d'oncogènes pourraient être des candidats intéressants pour l'immunothérapie, notamment parce qu'ils sont exprimés spécifiquement dans les cellules tumorales, et que le répertoire de L_T réactifs vis-à-vis de ces Ag n'est pas restreint par la tolérance au soi. Néanmoins, l'utilisation de cette catégorie d'Ag en immunothérapie nécessite l'identification des protéines cibles chez le patient en question (tumorale ou virale), ce qui impose la mise en place d'une

immunothérapie personnalisée. Cette limitation exclut donc les Ags de cette catégorie en ce qui concerne l'élaboration d'un vaccin antitumoral à grande échelle.

2.2. Les antigènes spécifiques de tumeurs

Les Ag spécifiques de tumeurs, aussi appelés « cancer/testis », sont des peptides issus de protéines non mutées exprimés dans les tissus tumoraux, mais pas dans les tissus sains, excepté dans les trophoblastes placentaires et la lignée germinale testiculaire. Aujourd'hui, 44 gènes ou familles de gènes ont été identifiés, comptant plus de 89 Ag au total. Le premier gène de ce type à avoir été identifié est celui codant pour la protéine MAGE-1 (van der Bruggen et al., 1991). Ces Ag sont généralement groupés en superfamilles (MAGE) puis familles (MAGE-A, MAGE-B, MAGE-C) mais peuvent aussi être isolés (BAGE). Nous pouvons également citer la protéine CAMEL qui est surexprimée dans de nombreux cancers tels les mélanomes, les myélomes et les carcinomes de la prostate et des poumons. Un épitope T restreint par la molécule HLA-A2 a été identifié dans sa séquence (Aarnoudse et al., 1999). Plus récemment, la γ -globin, une protéine oncofétale exprimée par les cellules tumorales de jeunes patients atteints de leucémie myéломocytique juvénile (JMML) a été identifiée. 5 épitopes T restreints par la molécule HLA-A2 ont été identifiés dans la séquence de cette protéine et des CTL spécifiques de ces épitopes sont capables de lyser spécifiquement des cellules tumorales autologues issues du patient (Hirano et al., 2006).

A la différence des Ag viraux, ou des Ag codés par des gènes du soi mutés, les Ag de type « cancer/testis » sont spécifiques des tumeurs et par conséquent sont des candidats privilégiés pour le développement d'approches d'immunothérapies anti-tumorales. L'expression des Ag communs au niveau des testicules ou au niveau de la rétine n'est pas limitant pour leur utilisation en immunothérapie, dans la mesure où ces tissus sont des organes immunopriviliés (ils n'expriment pas de molécules HLA-I) (Uyttenhove et al., 2003).

2.3. Les antigènes du soi surexprimés dans les cellules tumorales

Ces Ag dérivent de protéines exprimées à des taux très faible dans les cellules saines de l'organisme et qui sont surexprimées spécifiquement dans les cellules tumorales. Pour cette raison, les CTL spécifiques de ces Ag reconnaissent les cellules tumorales mais peuvent aussi reconnaître les cellules saines. Toutefois, un seuil d'expression minimal de l'Ag semble être nécessaire à la reconnaissance par les CTL (Lethe et al., 1998), limitant ainsi le risque d'induire des maladies auto-immunes par des approches vaccinales utilisant ce type d'Ag. Parmi les Ag de ce type connus, nous pouvons citer la Survivine et l'Ag HER-2/neu.

La protéine HER-2/neu est exprimé dans les carcinomes du sein, des ovaires, gastriques et colorectaux (Correa and Plunkett, 2001). Un peptide dérivé du gène HER-2/neu, restreint par la molécule HLA-A2, est reconnu efficacement par des TIL isolés à partir de carcinomes ovariens (Fisk et al., 1995). Les premiers essais cliniques utilisant ce peptide ont montré que les CTL spécifiques de l'Ag, induits après vaccination, ne reconnaissent pas les cellules saines, mais sont également incapables de lyser les cellules tumorales (Zaks and Rosenberg, 1998).

Un second Ag de ce type à large spectre d'expression dans les tumeurs est l'Ag hTERT (issus de la Télomérase). Ce dernier est effectivement surexprimé dans plus de 85% des cancers (Vonderheide et al., 1999). Contrairement à HER-2/Neu, les CTL induits *in vitro* à partir des peptides issus de cet Ag reconnaissent et lysent les cellules tumorales (Ayyoub et al., 2001; Vonderheide et al., 1999). L'induction d'une réponse immunitaire chez la souris après vaccination par cet Ag n'induit pas de réaction auto-immune (Nair et al., 2000). De plus, les CTL spécifiques de cet Ag sont capables de reconnaître différents types histologiques de cellules tumorales laissant supposer que la vaccination par cet Ag permet l'induction d'une immunité anti-tumorale protectrice à large spectre (Nair et al., 2000).

Plus récemment, le facteur de transcription PAX5 a été identifié. Son expression dans les tissus sains adultes est limitée aux cellules hématopoïétiques, et comme pour les deux premiers Ag cités, PAX5 a un large spectre d'expression dans les tumeurs. Un épitope T CD8+ restreint par la molécule HLA-A2 a été identifié dans la séquence de cet Ag et des CTL spécifiques de cet épitope sont capables de limiter la croissance de cellules humaines de carcinome colorectal implantées dans des souris immunodéficientes humanisées (Yan et al., 2008).

Un épitope T restreint par la molécule HLA-A3 a aussi été identifié au sein de la protéine RhoC, une protéine à activité GTPase surexprimée dans de nombreux cancers surtout dans les métastases. Des CTL spécifiques de cet épitope sont ainsi capables de reconnaître des cellules tumorales variées (Wenandy et al., 2008).

La protéine ALDH1A1 (aldehyde dehydrogenase 1 family member A1) appartenant à la famille de protéines impliquées dans la synthèse de l'acide rétinolique, est surexprimée dans des carcinomes de cellules squameuses de la tête et du cou. Un épitope T CD8+ dérivé de cet Ag et restreint par la molécule HLA-A2 permet l'induction de CTL spécifiques capables de lyser spécifiquement des cibles tumorales (Visus et al., 2007).

Les protéines Tankyrases 1 et 2, des polymérase associées aux télomères, sont un autre exemple. Ce sont des Ag tumoraux induisant uniquement des réponses de type humorales chez des patients atteints de cancer variés, puisque aucune réponse lymphocytaire T CD8+ n'a été détecté contre ces Ag (Shebzukhov et al., 2008).

Dans la famille des métalloprotéases (MMP), des TIL issus de patients atteints de mélanome ont permis l'identification de la MMP-2 comme Ag tumoral cible. Des CTL spécifiques d'un épitope T restreint par la molécule HLA-A2 sont capables de

lyser les cellules de mélanome *in vitro* (Godefroy et al., 2005). Dans cette même famille, des CTL spécifiques d'un épitope T restreint par la molécule HLA-A3 et issu de la protéine MMP-7, sont capables de reconnaître spécifiquement des cellules tumorales autologues du patient (Yokoyama et al., 2008).

La liste des Ag de ce type est donc longue, mais non limitative, car de nombreux autres Ag pourraient être découverts dans le futur. Les résultats intéressants qu'ils permettent d'obtenir, laissent envisager leurs applications dans des approches d'immunothérapie pour de nombreux types de cancers. Cependant, l'expression ubiquitaire de ce type d'Ag implique un suivi attentif d'éventuelles inductions de réactions auto-immunes.

2.4. Les antigènes de différenciation, tissu spécifique

Ces Ag sont des protéines de différenciation exprimées par la tumeur, mais également dans les tissus sains à partir desquels la tumeur est originaire. Ces TAA ne sont donc pas spécifiques de la tumeur et leur utilisation peut entraîner un risque d'auto-immunité encore plus accrue que les Ag du soi surexprimés dans les tumeurs. Ce risque auto-immun est relativement bien documenté dans les études faites sur le mélanome. En effet, les CTL spécifiques de la tumeur reconnaissent également les mélanocytes, par reconnaissance de la tyrosinase, impliquée dans la synthèse de la mélanine. La protéine GP-100, une glycoprotéine transmembranaire exprimée par les mélanocytes et surexprimée dans les mélanomes (Bakker et al., 1994), permet l'induction des L_T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques d'épitopes identifiés dans la séquence de cette protéine. La protéine MELEO-1 (melanoma-overexpressed antigen) est un autre exemple d'Ag de différenciation exprimé dans les mélanomes. Un épitope T restreint par la molécule HLA-A2 a été identifié dans la séquence de cette protéine (Godet et al., 2008).

Les manifestations auto-immunes induites dans les mélanomes sont caractérisées par une dépigmentation de la peau (vitiligo), qui s'accompagne de la régression spontanée de la tumeur et de l'amélioration du pronostic clinique (Duhra and Ilchyshyn, 1991). Ces phénomènes sont la conséquence de la destruction par les TIL des mélanocytes (Kawakami et al., 1995).

Ces données pointent du doigt la possibilité de casser la tolérance du système immunitaire aux Ag du soi. En effet, les précurseurs lymphocytaires réactifs pour des Ag dérivés de la tyrosinase ou de Melan-A/MART-1 sont présents chez des donneurs sains (van Elsas et al., 1996).

La rupture de tolérance immunitaire par l'emploi de ces Ag les rendent intéressants pour développer des approches d'immunothérapie anti-mélanome. En effet, dans ce cas particulier, les conséquences de l'induction d'une réponse auto-immune demeurent limitées à une dépigmentation de la peau, et sont sans dangers pour la survie du patient. De nombreux essais cliniques montrent la possibilité de

l'induction d'une manifestation auto-immune dirigée contre les mélanocytes associée à la reconnaissance par les mêmes CTL des cellules malignes (Jaeger et al., 1996; Rosenberg et al., 1998a).

Les TAA associés au mélanome ne sont pas les seuls Ag de ce type à avoir été identifiés. Dans les cancers du sein, par exemple, la protéine Mammaglobine-A exprimée par les cellules des glandes mammaires est surexprimée dans la tumeur. Huit épitopes T restreints par la molécule HLA-A3 ont été identifiés et les CTL spécifiques de ces peptides sont capables de lyser les cellules tumorales issues des patientes (Jaramillo et al., 2002).

Dans le cas des cancers de la prostate, plusieurs TAA ont été identifiés et notamment la PSA (Prostate specific antigen). Des épitopes T CD8⁺ restreints par HLA-A2 ou HLA-A1, et des épitopes T CD4⁺ ont été identifiés. L'ensemble des réponses immunes induites *in vitro* permet la lyse spécifique des cellules tumorales (Corman et al., 1998; Correale et al., 1997).

La protéine CEA, impliquée dans l'adhésion cellulaire, est exprimée normalement par de nombreuses cellules au cours du développement embryonnaire et par les cellules épithéliales chez l'adulte, et anormalement dans des pathologies telles les adénocarcinomes (notamment celui du colon). Cette protéine est capable d'induire l'activation de L_T CD8⁺ et CD4⁺ spécifiques à partir de cellules isolées de donneurs sains (Nair et al., 1998). Des épitopes restreints par HLA-A2 et HLA-A3 respectivement ont été identifiés (Kawashima et al., 1999; Tsang et al., 1995) ainsi que des épitopes T CD4⁺ restreints aux molécules HLA-DR*0701, -DR*0301 et -DR*1401 (Crosti et al., 2006). Des lignées T induites contre certains de ces épitopes se sont même montrées capables de reconnaître des cellules tumorales issues de patient atteints de cancer colorectal (Campi et al., 2003).

2.5. Les antigènes tumoraux issus de tumeurs viro-induites

Certains virus sont responsables du développement de tumeurs : le papillomavirus humain (HPV) dans le cas du cancer du col de l'utérus (Tindle, 1996), le virus d'Epstein Barr (EBV) dans les lymphomes (Khanna et al., 1998; Roskrow et al., 1998) ou encore le virus de l'hépatite B dans les tumeurs hépatiques, en sont des exemples bien connus.

Les tumeurs viro-induites expriment des Ag viraux identiques entre différentes tumeurs, ce qui en font des cibles thérapeutiques potentielles. C'est le cas des cancers génitaux associés aux papillomavirus. La protéine E7 exprimée initialement par la souche 16 du virus HPV est impliquée dans la transformation tumorale des cellules cervicales. Des CTL spécifiques de peptides dérivés de cette protéine et restreints aux molécules de HLA-A2 ont été isolés après stimulation *in vitro* (Ressing et al., 1995).

En conclusion, selon le type d'Ag tumoral identifié, les perspectives d'applications thérapeutiques sont plus ou moins intéressantes. Dans certains cas, elles représentent un danger, comme l'apparition de maladies auto-immunes, et la balance bénéfique/risque doit être précautionneusement étudiée avant de débiter une étude clinique. De nombreux essais ont été réalisés ou sont en cours de réalisation. Pour autant, les succès thérapeutiques sont rares. Une des limites à ces approches est qu'elles ont souvent été faites avec un seul Ag cible, alors qu'une tumeur possède bien souvent plusieurs Ag cibles. De plus, l'instabilité génétique qui caractérise une cellule tumorale, lui permet de réprimer l'expression de certains Ag dispensables, ce qui favorise son développement, notamment en échappant au système immunitaire. C'est la cas, en particulier, dans les tumeurs viro-induites, capables de perdre l'expression des protéines virales immunogènes initialement utilisées pour la vaccination. C'est pourquoi il est aussi intéressant de bien connaître les mécanismes d'échappement des tumeurs pour envisager des stratégies thérapeutiques combinant activation du système immunitaire et le contrôle de la tumorigénicité des cellules malignes.

B. Échappement des tumeurs aux réactions immunes

Le rôle du système immunitaire dans le contrôle des tumeurs a été clairement démontré. Cependant, le développement d'une tumeur chez les patients cancéreux suggère que le système immunitaire ne l'a pas éliminé précocement, soit en raison de l'absence de signaux de danger, soit parce que les cellules tumorales peuvent échapper, au moins dans certains cas, à ce contrôle immun. Les mécanismes d'échappement tumoral sont bien observés dans des modèles murins, dans lesquels une tolérance spécifique de l'Ag tumoral se développe même lorsque les DC présentent l'Ag cible aux L_T , afin de stimuler des CTL anti-tumoraux spécifiques. Plusieurs mécanismes d'échappement des tumeurs à la surveillance immunitaire ont été décrits à ce jour.

1. Résistance à l'attaque immune

1.1. Altération des mécanismes de présentation des Ag tumoraux

La présentation des Ag par les molécules HLA aux L_T est un mécanisme majeur de la réponse immunitaire spécifique. C'est pourquoi, l'absence de présentation de l'Ag est un mécanisme important d'échappement tumoral au système immunitaire. L'instabilité génétique des cellules tumorales conduit dans certains cas à des altérations chromosomiques, qui peuvent entraîner la perte d'expression des molécules HLA (Ferrone and Marincola, 1995) ou des molécules

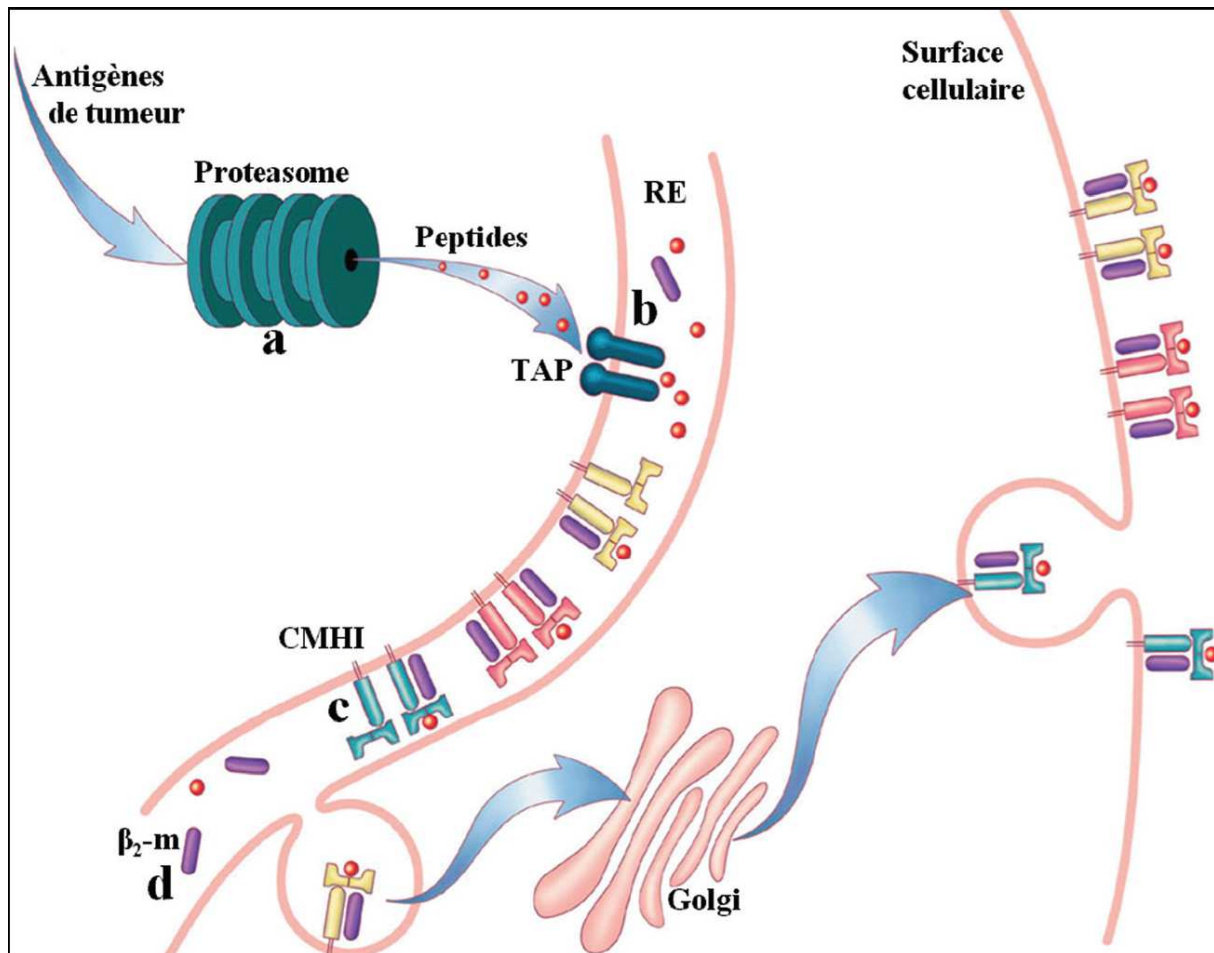


Figure 26 : Mécanismes moléculaires responsables de la déficience d'expression de molécules HLA-I (Khong et al., 2002)

Des dérégulations peuvent intervenir au cours des différentes phases aboutissant à l'expression de molécules du CMH I à la surface cellulaire.

a : dérégulations dans les composantes du protéasome (telles LMP-2, LMP-7)

b : dérégulations des transporteurs peptidiques TAP1 et TAP2 ;

c : perte d'hétérozygotie sur le chromosome 6; dérégulation transcriptionnelle, mutations ponctuelles ou délétions sur le gène codant le CMH I

d : mutations ou délétions du gène codant la β 2-m

nécessaires à la présentation des Ag sur les molécules HLA, comme les protéines de transport TAP (Johnsen et al., 1999; Maeurer et al., 1996).

Cette absence partielle ou totale d'expression des molécules HLA est fréquente dans les cancers humains, comme le mélanome, les carcinomes du côlon ou les cancers de la prostate (Algarra et al., 1997). Dans le cancer du sein, la perte d'expression est supérieure à 50 %. Les cellules n'exprimant pas de molécules HLA pourraient provenir de variants tumoraux issus d'une lésion cancéreuse précoce. Les capacités invasive et métastatique de certains cancers ont également pu être corrélées à l'absence de molécules HLA- I (Khong and Restifo, 2002). La perte d'expression des ces molécules n'influence pas la progression tumorale, puisqu'il a été montré qu'une déficience en protéines TAP1 n'avait pas d'incidence sur le développement de tumeurs murines (Johnsen et al., 2001). Les mécanismes impliqués dans cette perte d'expression des molécules HLA sont nombreux (Figure 26).

Une absence totale de molécules HLA est souvent due à une mutation dans le gène codant la $\beta 2m$ (Hicklin et al., 1998). La régulation négative des complexes protéiques du protéasome (LMP-2, LMP-7) ou des transporteurs peptidiques (TAP1, TAP2) peut également être impliquée, comme rapporté dans des cancers du poumon (Korkolopoulou et al., 1996), de la prostate (Sanda et al., 1995) ou du rein (Seliger et al., 1997). Certaines tumeurs peuvent également présenter des pertes d'allèles, de *locus* ou d'haplotypes pour la molécule HLA. Dans les mélanomes, par exemple, la surexpression de l'oncogène *c-myc* est corrélée avec la perte d'expression du *locus* HLA-B (Versteeg et al., 1989). Dans les cancers du colon, c'est l'absence de certains facteurs de transcription qui entraîne la perte d'expression du *locus* HLA-B (Soong and Hui, 1992). Dans le mélanome, c'est souvent le produit du *locus* HLA-C qui est délété (Marincola et al., 1994). Aussi, l'absence de lyse par les cellules NK des cellules HLA-I négatives pourrait s'expliquer par l'absence de signaux nécessaires à l'activation des ces cellules ou par la production par les cellules tumorales de molécules inhibant leur activation et leurs fonctions telles que le TGF- β ou le MIF (macrophage migration inhibitory factor) (Khong and Restifo, 2002)

1.2. Anomalies fonctionnelles des voies de l'apoptose

La dérégulation de la prolifération cellulaire n'est en aucune façon suffisante pour aboutir à la transformation tumorale. La résistance à l'apoptose naturelle est un phénomène inhérent au processus tumoral. Les mécanismes par lesquels une tumeur assure sa survie en résistant à l'apoptose sont multiples et peuvent se cumuler. On distinguera :

- **La surexpression de protéines anti-apoptotiques**, appartenant à la famille de Bcl-2 ou de FLIP, ou à famille des IAPs «inhibitor of apoptosis protein» (tel la survivine), qui sont inhibitrices des caspases.
- **La diminution ou la mutation de molécules pro-apoptotiques**. De nombreuses molécules peuvent être impliquées comme BAX, la caspase 8, CD95, APAF1, FADD ou TRAIL.
- **La dérégulation de la voie p53**. La moitié des cancers présentent une mutation de p53 qui altère potentiellement sa fonction. Ce facteur de transcription est essentiel dans le contrôle de l'apoptose des cellules stressées. D'autres molécules régulant la p53 peuvent être altérées. C'est le cas de MDM2 qui induit l'ubiquitination de p53 et donc sa destruction. Une dérégulation des voies PI3K/AKT (Shayesteh et al., 1999) et NF- κ B (Rayet and Gelinis, 1999) ont également été observées.
- **Le blocage de certaines voies d'apoptose**. La perte d'expression de l'adaptateur FADD, impliqué dans la transduction du signal apoptotique via le complexe Fas/FasL, est observée dans différentes pathologies telles les cancers de la thyroïde, et les leucémies myéloïdes chroniques. Ceci pourrait expliquer la résistance de certaines tumeurs à l'apoptose alors qu'elles expriment Fas et son ligand (Buzyn et al., 1999; Tourneur et al., 2003).

1.3. Stratégie de contre-attaque tumorale au système immunitaire

a) L'altération du métabolisme du tryptophane

L'altération du métabolisme du tryptophane par les cellules tumorales constitue le plus bel exemple de contre-attaque efficace des cellules tumorales. L'indole amine 2-3 dioxygénase (IDO) est l'enzyme qui intervient dans la première étape du catabolisme du tryptophane non utilisé dans la biosynthèse protéique. La biosynthèse d'IDO par toutes les cellules de l'organisme est induite principalement par l'INF γ . IDO prive le milieu en tryptophane et inhibe la croissance cellulaire.

Le tryptophane est l'acide aminé le plus rare. Il représente 1% des acides aminés. IDO est impliquée dans les mécanismes de tolérance. En privant le milieu environnant, elle inhibe la prolifération des L_T. Sa biosynthèse est soit constitutive pour les macrophages et les DC plasmacytoïdes (Munn et al., 1999), soit inductible pour les DC lymphoïdes par l'INF γ , l'IL10 et par liaison de CTLA-4 à CD80/CD86 (Boasso et al., 2005). Le CTLA-4 membranaire, exprimé par les L_T régulateurs naturels, exerce le même effet inducteur d'IDO sur les DC (Grohmann et al., 2003). En 2003, l'équipe de T.Boon a montré que de nombreux cancers expriment cette

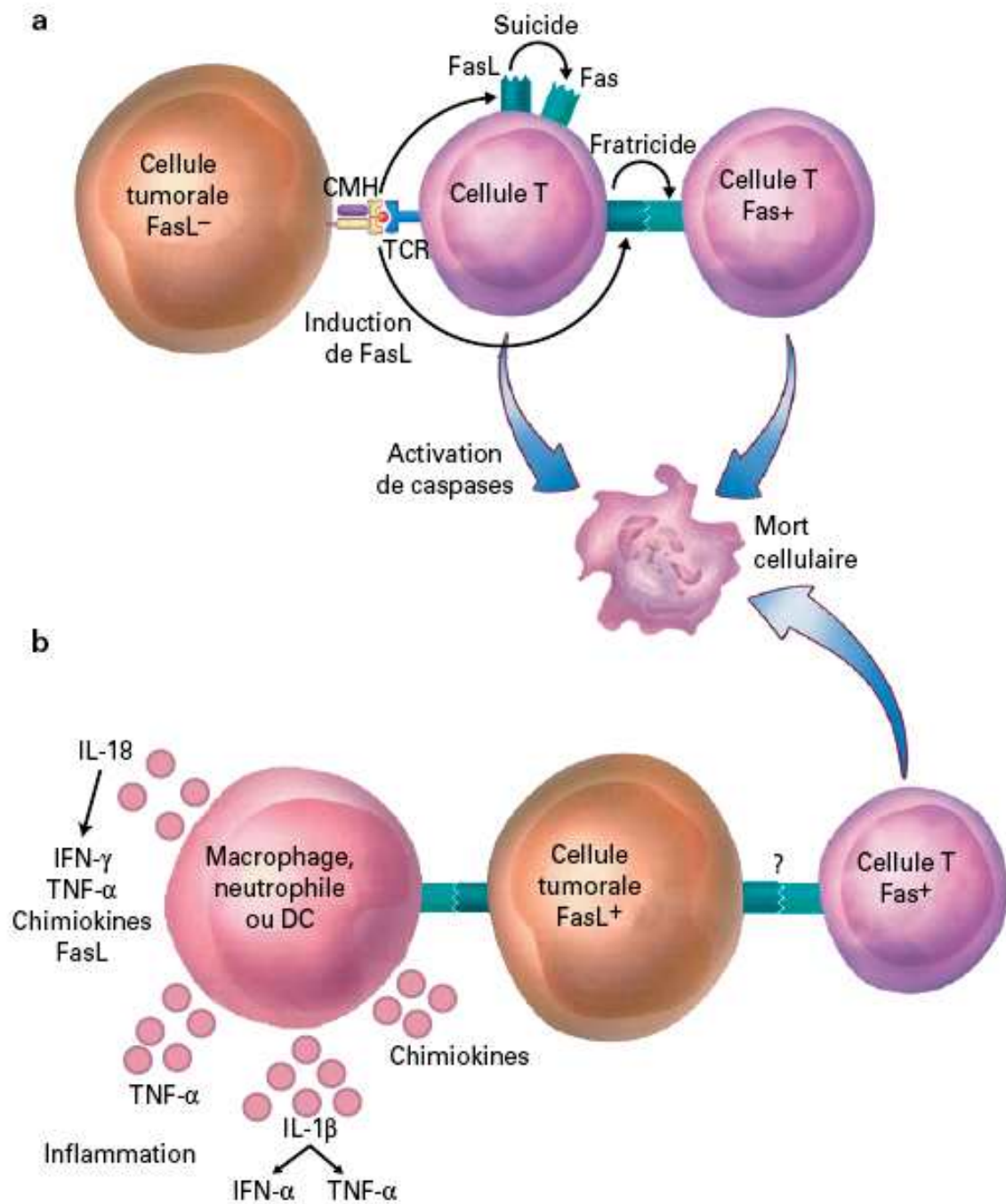


Figure 27 : Apoptose des lymphocytes T induite par FasL (Khong and Restifo, 2002)

a : AICD des cellules T après reconnaissance des cellules tumorales. La reconnaissance des cellules tumorales par les L_T entraîne une surexpression des molécules Fas et FasL à la surface des LT aboutissant à leur destruction

b : les cellules tumorales exprimant la molécule FasL peuvent directement lyser les L_T. Cependant, l'interaction avec la protéine Fas exprimée à la surface des cellules de la réponse immunitaire non-spécifique peut également entraîner la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires participant au rejet tumoral.

enzyme, notamment les carcinomes prostatiques, colorectaux, pancréatiques et utérins (Uyttenhove et al., 2003).

b) Expression de FasL

Un des mécanismes les plus controversé de l'échappement tumoral est l'expression de FasL par les cellules tumorales. Certaines tumeurs expriment FasL, ce qui pourrait induire l'apoptose de TIL (Figure 27b) (O'Connell et al., 2001; Restifo, 2001). Dans certains cas, comme dans les cancers du côlon, l'expression de FasL est corrélée à l'apoptose des TIL (Houston et al., 2003). Cependant, des expériences menées chez la souris ont montré que l'expression de FasL par la tumeur est la cause de son élimination, notamment par les neutrophiles (Igney et al., 2003). Un autre mécanisme, moins contesté, et impliquant la voie Fas-FasL, est le mécanisme d'AICD des cellules T anti-tumorales (Figure 27a). Les cellules T activées par la reconnaissance spécifique des Ag tumoraux vont exprimer fortement FasL à leur surface, ce qui va induire leur propre apoptose (suicide) ainsi que l'apoptose des cellules T voisines exprimant le récepteur Fas (Zaks et al., 1999).

2. Induction d'une tolérance

Les cellules tumorales sont aussi capables de développer de multiples stratagèmes pour empêcher le développement d'une réponse immune efficace et conduire à la tolérance du système immunitaire à leur rencontre.

2.1. Inaccessibilité des cellules tumorales

La première hypothèse d'une absence de réponse immunitaire est l'ignorance de l'Ag par le système immun. La raison la plus plausible est que la tumeur, en restant confinée dans un tissu périphérique, est très peu accessible aux cellules immunes. L'équipe de Zinkernagel a ainsi démontré que l'immunogénicité de tumeurs liquides, implantées sous la peau, est plus forte que l'immunogénicité de tumeurs solides, implantées au même endroit (Ochsenbein et al., 2001). De plus, même lorsqu'elles arrivent dans les organes lymphoïdes, les cellules tumorales peuvent demeurer ignorées du système immunitaire. Elles sont isolées derrière une barrière moléculaire, de fibres de collagène ou de facteurs de coagulation. De plus, les tumeurs qui se développent dans des sites immuno-privilegiés comme le cerveau et les yeux sont peu accessibles au système immunitaire. La régulation négative des molécules d'adhésion dans les tissus malins peut inhiber l'infiltration immune et donc contribuer à l'ignorance immunitaire (Igney and Krammer, 2002). La dose d'Ag est un facteur important du déclenchement de la réponse immunitaire. Lorsqu'elle

est insuffisante, peu d'effecteurs sont mobilisés, expliquant peut être la raison de l'ignorance immunitaire.

2.2. Présentation inefficace par les DC

Dans certains cas, l'inefficacité de présentation des Ags tumoraux par les DC peut contribuer à limiter l'initiation et le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. La maturation intracellulaire des Ag par le protéasome est un paramètre important de l'efficacité de présentation de ces Ag.

Le protéasome et l'immunoprotéasome possèdent des spécificités de clivage différentes qui peuvent avoir des conséquences importantes au niveau de la maturation et de la présentation des Ag (Van den Eynde and Morel, 2001). Dans certains cas, la maturation des Ag est améliorée en présence d'immunoprotéasome (Sijts et al., 2000; van Hall et al., 2000). Dans d'autres cas, l'immunoprotéasome ne permet pas la génération de certains épitopes issus de TAA endogènes, ou dérivés de protéines exogènes empruntant la voie de présentation « croisée » (Van den Eynde and Morel, 2001). En effet, l'Ag Melan-A27-35 n'est pas mûré de façon optimale par l'immunoprotéasome, et n'est plus présenté à la surface des DC (Morel et al., 2000). De la même façon, l'Ag MAGE-3 n'est pas mûré par le protéasome de façon à permettre la présentation optimale de l'épitope MAGE-3271-279. Dans ce cas précis, le traitement des cellules tumorales par un inhibiteur de l'une des activités catalytiques du protéasome, restaure la maturation de l'Ag et permet aux CTL spécifiques de l'Ag MAGE-3271-279 de lyser à nouveau les cellules tumorales (Valmori et al., 1999). Ces données montrent que l'inefficacité de présentation des TAA pourrait contribuer à inhiber l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale spécifique. Par ailleurs, ces données argumentent fortement en faveur d'une approche immunothérapeutique spécifique utilisant les TAA sous une forme optimale pour la présentation par les DC.

2.3. Les cytokines immunosuppressives

L'activation ou l'inhibition des L_T reposent en grande partie sur la nature des cytokines qui composent le micro-environnement tumoral. Les cellules tumorales produisent certaines cytokines et chimiokines qui affectent de manière négative la maturation et les fonctions des cellules immunitaires.

La molécule VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), sécrétée par de nombreuses tumeurs, est notamment responsable de l'angiogenèse tumorale. Elle possède également une activité inhibitrice sur la maturation et la différenciation des DC, en bloquant le facteur de transcription NF- κ B (Oyama et al., 1998). En effet, dans les cancers du sein et du poumon, des études ont montré une corrélation entre la diminution du nombre de DC et l'augmentation de VEGF (Almand et al., 2000). Cette

protéine est la cible de certaines stratégies thérapeutiques. Un Ac bloquant dirigé contre le VEGF (bevacizumab) permet, par exemple, de limiter la progression de la maladie chez des patients atteints de carcinomes rénaux (Yang et al., 2003).

La cytokine IL-10 est fréquemment détectée dans le sérum de patients atteints de cancer. Elle peut avoir un effet inhibiteur sur la différenciation et la fonctionnalité des DC à partir des cellules souches hématopoïétiques (Girolomoni and Ricciardi-Castagnoli, 1997). L'IL-10 inhibe la présentation antigénique, la production d'IL-12 et donc l'induction d'une réponse TH1 *in vivo* (Sharma et al., 1999). Elle entraîne l'apoptose des DC (Ludewig et al., 1995) en augmentant leur sensibilité à la lyse par les cellules NK autologues (Carbone et al., 1999). L'IL-10 peut également protéger les tumeurs de la lyse par les populations CTL en diminuant l'expression des molécules HLA-I et -II ainsi que la protéine d'adhésion ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) à la surface des tumeurs (Yue et al., 1997).

De fortes concentrations de cytokine TGF- β peuvent être retrouvées chez des patients, souvent associées à une progression de la maladie (Gorsch et al., 1992). Cette cytokine, produite par les cellules tumorales, peut également être sécrétée par des cellules apoptotiques (Chen et al., 2001). Le TGF- β inhibe l'activation, la prolifération et l'activité des lymphocytes *in vivo* (Fontana et al., 1989). Des stratégies utilisant des Ac neutralisants ou des oligonucléotides antisens dirigés contre le TGF- β ont permis l'éradication de tumeurs établies en modèles animaux (Gorelik and Flavell, 2001). (Figure 27b).

2.4. L'absence de signaux de danger

Il est reconnu que l'intrusion tumorale au sein d'un tissu sain induit une destruction tissulaire et la libération de certains facteurs pro-inflammatoires par les cellules détruites et les cellules tumorales elles-mêmes suite à leur activation par des molécules telles que le LPS ou les IFNs. Ces facteurs inflammatoires, considérés comme des signaux de danger, vont permettre d'initier une réponse immune anti-tumorale. Il semblerait que ce phénomène ne puisse pas avoir lieu dans la plupart des tumeurs évoluées (Pardoll, 2003). Par conséquent, en se développant dans un contexte non inflammatoire, la plupart des tumeurs n'induisent pas l'activation des DC, des cellules NK et des macrophages, ce qui empêche le développement d'une quelconque réponse immune et conduit à la tolérance du système immunitaire vis-à-vis de la tumeur. Ce phénomène est en particulier dû à une expression sub-optimale de molécules de co-stimulation par les DC non activées en l'absence de signaux pro-inflammatoires. Ce défaut d'activation par les DC ne peut être compensé par les cellules tumorales puisque l'expression des molécules CD80 et CD86 est nulle ou insuffisante pour induire une activation lymphocytaire T dans la plupart des tumeurs solides et lymphomes (Costello et al., 1999). Les mécanismes par lesquels les cellules tumorales finissent par ne plus produire de facteurs inflammatoires

résulteraient de l'expression constitutive du facteur de transcription STAT3. Tout le problème des stratégies vaccinales est de pouvoir rompre cet état de tolérance ou de réactivité insuffisante (Engelhard et al., 2002).

2.5. Les lymphocytes T régulateurs

Il existe aussi une population de L_T CD4+ qui joue un rôle suppressif pour la prolifération et les fonctions des cellules effectrices. Ce sont les cellules Treg (CD4+CD25+), décrites auparavant dans le chapitre 2E. La suppression des fonctions effectrices contribue à prévenir l'auto-immunité, ce qui conduit à la tolérance de l'Ag impliqué. Dans un état non pathologique, ils représentent environ 5 à 10% de la population totale de L_T CD4+ (Jonuleit et al., 2003; Wang et al., 2006; Yu and Fu, 2006).

L'expansion des Tregs et leur présence au sein de la tumeur interfère avec le bon fonctionnement des L_T effecteurs ce qui réduit l'efficacité de l'immunité anti-tumorale (Allan et al., 2004; Liyanage et al., 2002). Leur origine ainsi que leur fonctionnement ne sont pas encore bien compris. Il semblerait que des ligands encore non identifiés soient responsables de leur génération au niveau intra-thymique ainsi qu'au niveau de leur activation en périphérique. Les Tregs auraient donc la capacité de reconnaître des ligands agonistes du soi.

En conclusion, l'échappement tumoral est un paramètre dont il faut tenir compte pour la mise en place d'une stratégie de vaccination. L'échappement constitue un obstacle à l'efficacité de la thérapie cellulaire. L'analyse des résultats des études cliniques montre en effet l'efficacité partielle des vaccinations. L'échantillonnage des patients participant aux études cliniques est réalisé parmi une population atteinte de cancer avancé. La probabilité que la tumeur ait mis en place un mécanisme d'échappement est plus grande à ce stade avancé de la maladie. Une thérapie cellulaire adoptée dès le développement de la tumeur avant l'installation des mécanismes d'échappement pourrait s'avérer plus efficace, mais ceci reste à démontrer.

3. Le concept d' « immunoediting »

Il est clair que si le système immunitaire est capable de surveiller l'émergence de cellules tumorales, celles-ci sont capables d'échapper à la réponse immune, ce qui explique le développement possible de tumeurs chez des sujets immunocompétents. Cette observation a conduit le Dr Schreiber à décrire de façon plus appropriée les interactions entre le système immunitaire et l'évolution tumorale. Il propose de remplacer le terme d'immunosurveillance par celui d' « immunoediting » (Dunn et al., 2002). Ce nouveau concept implique la réponse immune dans le contrôle tumoral

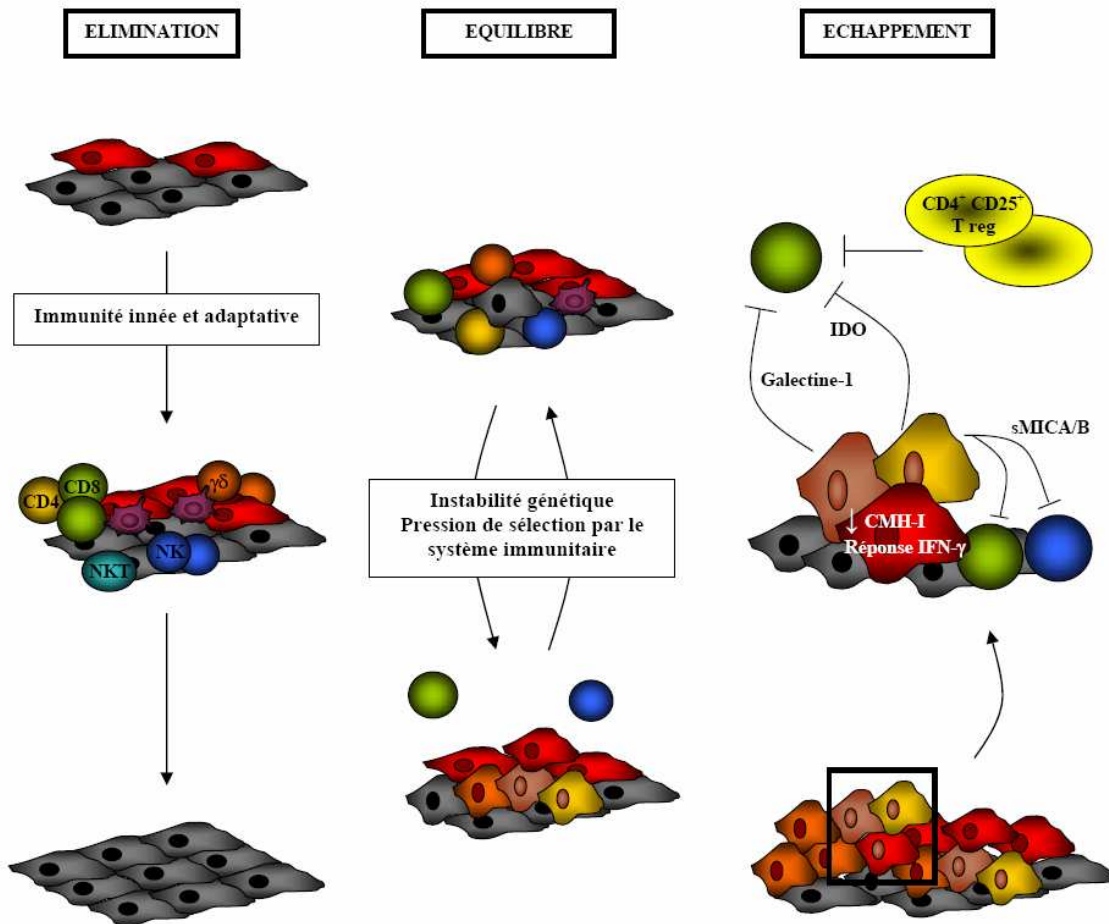


Figure 28 : Principe d'immunoediting

Les cellules normales (en gris) soumises à des stimuli onogéniques, peuvent devenir des cellules tumorales après transformation maligne (en rouge). Dans les phases précoces du développement tumoral, les cellules expriment des marqueurs antigéniques spécifiques et produisent des signaux de danger permettant l'initiation d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. Toutefois, certaines cellules tumorales, du fait de leur instabilité génétique et de la pression de sélection exercée par le système immunitaire, vont muter et survivre à l'immuno-surveillance. Ainsi, au cours de la phase d'équilibre, au fur et à mesure que certaines cellules tumorales sont détruites, de nouveaux mutants sont générés. Cette phase conduit irrémédiablement à la sélection, par le système immunitaire, de cellules tumorales ayant acquis des mécanismes de résistance efficaces. La phase d'échappement, caractérisée par la prolifération incontrôlable des cellules tumorales conduit au développement du cancer, cliniquement détectable. (Dunnet *et al*; 2002)

mais la rend aussi, dans certains cas, responsable de l'émergence de cellules échappant au contrôle immunitaire en exerçant une pression de sélection sur les cellules tumorales. Cette théorie décrit l'évolution des tumeurs en trois phases : Elimination, Equilibre et Echappement (Figure 28).

La phase d'élimination correspond au développement de réponses immunes anti-tumorales. Certaines cellules tumorales, du fait de leur instabilité génétique et de la pression de sélection exercée par le système immunitaire vont muter et survivre à l'immunosurveillance.

Au cours de la phase d'équilibre, au fur et à mesure que certaines cellules tumorales sont détruites, de nouveaux mutants sont générés. Cette phase conduit irrémédiablement à la sélection, par le système immunitaire, de cellules tumorales ayant acquis des mécanismes de résistance efficaces.

La phase d'échappement, caractérisée par la prolifération incontrôlable des cellules tumorales, conduit au développement de tumeurs cliniquement décelables.

C. L'immunodominance des épitopes T

1. Définition de l'immunodominance

Suite à une immunisation avec une protéine, la réponse lymphocytaire T CD4+ ou CD8+ est dirigée uniquement contre un nombre limité de déterminants de cette protéine (Ag). Ce phénomène appelé immunodominance a été décrit pour de nombreux Ag (Sercarz et al., 1993) et est considéré aujourd'hui comme général. En d'autres termes, l'immunodominance est définie, par conséquent, comme le résultat d'un processus de sélection, parmi les déterminants potentiellement immunogènes d'une protéine, d'un nombre très limité de déterminants cellulaires T contre lesquels s'établit la réponse lymphocytaire T. Gammon *et al.* ont proposé un modèle de hiérarchie des déterminants d'une protéine en les classant en trois catégories : immunodominants, sous-dominants et cryptiques (Gammon et al., 1987).

Les déterminants immunodominants d'un Ag sont ceux contre lesquels est dirigée la réponse lymphocytaire T. Ils sont portés par des peptides capables d'induire, par restimulation *in vitro*, une réponse proliférative forte et systématique des L_T sensibilisés *in vivo* avec la protéine entière. Ils se distinguent des déterminants cryptiques, incapables de restimuler des cellules T après immunisation avec l'Ag intact. Toutefois, les peptides cryptiques peuvent induire une réponse contre eux-mêmes. Enfin, les déterminants sous-dominants sont une catégorie dont la définition est plus floue. Il semble toutefois admis qu'ils sont capables d'induire une prolifération des cellules T *in vitro* suite à l'immunisation avec la protéine, mais leur

niveau d'immunogénicité serait plus faible et plus variable que celle induite par les déterminants dominants.

Différents paramètres sont susceptibles d'intervenir dans le phénomène d'immunodominance tels que l'apprêtement de l'Ag, la composition du répertoire T mais également la spécificité des molécules HLA-II dont nous avons parlé précédemment.

2. Facteurs impliqués dans l'immunodominance

2.1. Rôle de l'apprêtement de l'antigène

Plusieurs études menées chez la souris, ont comparé *in vivo* l'immunisation avec l'Ag natif et l'immunisation avec des peptides issus de ce même Ag (Adorini et al., 1988; Brett et al., 1988). Outre la mise en évidence de l'existence de peptides immunodominants, les auteurs ont également montré que les peptides sont capables d'initier une réponse lymphocytaire T lorsqu'ils sont injectés seuls mais pas lorsqu'ils sont présents au sein de l'Ag. Ceci suggère que ces peptides sont donc cryptiques. L'hypothèse est qu'il existe bien des L_T spécifiques de ces peptides mais que leur non-dominance provient de l'absence de production de ces déterminants au cours de l'apprêtement de l'Ag natif ce qui explique qu'ils ne sont pas présentés aux L_T . Différents facteurs engagés dans le processus d'apprêtement des Ag ont été étudiés pour connaître leurs implications dans le phénomène d'immunodominance :

- (1) Certains auteurs ont montré que l'efficacité de présentation des Ag est dictée par la nature de la CPA (Vidard et al., 1992). En effet, les DC jouent un rôle dans l'immunodominance. Elles semblent focaliser la réponse immune contre quelques déterminants antigéniques alors que les L_B pourraient présenter des peptides plus hétérogènes, diversifiant ainsi la réponse cellulaire T (Gapin et al., 1998).
- (2) D'autres auteurs suggèrent que les protéases endosomales sont impliquées dans le relargage des déterminants immunodominants (Bennett et al., 1992; Schneider et al., 2000; Van Noort et al., 1991).
- (3) La complexité de la structure de l'Ag pourrait également influencer la nature des déterminants immunodominants produits, telles leur structure quaternaire ou tertiaire (Rouas et al., 1993).
- (4) L'efficacité d'internalisation de l'Ag peut varier d'une CPA à l'autre et peut donc influencer l'immunodominance (Sercarz et al., 1993).
- (5) Enfin, la molécule HLA-DM pourrait également être impliquée dans la sélection des déterminants antigéniques présentés (Lovitch et al., 2003).

Lorsque les épitopes cryptiques sont présents à la surface des CPA, mais qu'ils induisent une réponse lymphocytaire T très faible (Viner et al., 1996), on parle d'épitopes sous-dominants. Ces épitopes sous-dominants ou non dominants peuvent être la conséquence d'un apprêtement inefficace, comme présenté ci-dessus, mais peuvent aussi résulter d'un nombre limité de précurseurs T qui leurs sont spécifiques, comme nous allons le présenter ci-dessous.

2.2. Rôle du répertoire T

Le répertoire T correspond à l'ensemble des TCR présents sur les L_T qui vont leur permettre d'être spécifiques d'un complexe HLA - peptide antigénique (von Boehmer and Kisielow, 1993). Ce répertoire T est façonné après plusieurs étapes de sélections thymiques qui ne permettent de conserver que les L_T présentant un TCR « utile ». Une première étape de **sélection positive** consiste en la reconnaissance restrictive des molécules HLA du soi sur les cellules épithéliales thymiques. Puis une seconde étape, cette fois **négative**, consiste à éliminer les L_T potentiellement dangereux qui reconnaissent les peptides du soi avec une forte affinité.

C'est ainsi que sont éliminés par apoptose environ 95% des thymocytes (von Boehmer and Kisielow, 1993). Le paradoxe de cette situation est évidemment de comprendre comment les L_T peuvent être à la fois sélectionnés positivement et négativement sur les molécules HLA du soi. De nombreuses expériences dans les années 90 ont permis de comprendre que c'est le niveau d'affinité entre le TCR et le complexe peptide du soi / HLA du soi qui détermine le type de sélection positive ou négative. Une très faible affinité, permise par la reconnaissance de plusieurs peptides différents présentés par les molécules HLA des cellules épithéliales, est nécessaire pour sauver le thymocyte de l'apoptose naturelle, lui permettant de poursuivre sa différenciation. Au contraire, une interaction de forte affinité avec un peptide du soi présenté de préférence par les molécules HLA de DC, provoquera son activation prématurée et son élimination (Ashton-Rickardt et al., 1994; Hogquist et al., 1994).

La sélection négative permet d'expliquer l'influence qualitative et quantitative du répertoire T sur la dominance des déterminants antigéniques. Elle est en particulier à l'origine de la perte potentielle de précurseurs lymphocytaires T susceptibles de reconnaître des déterminants antigéniques ayant une homologie avec des peptides du soi. Ce phénomène est désigné sous le terme de "trous" dans le répertoire T. Il en résulte qu'à chaque complexe HLA-peptide antigénique présenté en périphérie, ne correspond pas systématiquement un ligand TCR dans le répertoire T fonctionnel. L'existence de ces "trous" est invoquée par différents auteurs pour expliquer la non dominance de déterminants antigéniques (Adorini et al., 1988; Schaeffer et al., 1989).

D. L'immunothérapie active

Le but de l'immunothérapie anti-tumorale est d'éradiquer les cellules tumorales sur le long terme sans causer de dommages aux tissus sains. Les approches conventionnelles telles la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie sont limitées par leur manque de spécificité et leurs effets toxiques. L'immunothérapie pourrait donc être une approche plus spécifique de ciblage des tumeurs, qui peut même prendre un réel intérêt lorsqu'aucunes approches conventionnelles ne fonctionnent, comme dans le cas de tumeurs chimio-résistantes par exemple. L'identification de TAA a permis de définir de nouvelles cibles pour développer ces approches d'immunothérapies anti-cancéreuses.

Il existe deux types d'immunothérapies anti-tumorales : l'immunothérapie passive et l'immunothérapie active. L'immunothérapie passive consiste à injecter des Ac spécifiques de cibles prédéfinies ou à injecter des L_T autologues activés *in vitro*. L'immunothérapie active, ou vaccination anti-tumorale, consiste à induire, restaurer ou augmenter une réponse immunitaire anti-tumorale. Elle implique des cellules de l'immunité innée, et des cellules de l'immunité acquise comme principalement les DC, et les cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$. Dans ce chapitre seront décrites uniquement les différentes approches de vaccinations anti-tumorales.

Les premières stratégies de vaccination qui ont été développées avaient pour objectif unique d'induire des CTL spécifiques de TAA. Cependant, la découverte du rôle des L_T $CD4^+$ dans le maintien de la réponse immunitaire anti-tumorale et l'inhibition de la croissance des tumeurs a incité les scientifiques à développer des vaccins capables d'induire à la fois des réponses lymphocytaires T $CD8^+$ et T $CD4^+$ spécifiques.

Il existe plusieurs approches vaccinales qui se distinguent les unes des autres de par leurs méthodes de chargement en Ag (un ou plusieurs, nature de l'Ag). Elles permettent à terme l'induction et le maintien de réponses cytotoxiques spécifiques des tumeurs cibles (Mocellin et al., 2004).

Ces diverses approches vaccinales peuvent être : (1) vaccins peptidiques ; (2) vaccins protéiques ; (3) vaccins ADN et (4) vaccins cellulaires. Le travail présenté dans cette thèse s'inscrit principalement dans le développement de vaccins peptidiques, mais il peut également s'appliquer aux vaccinations protéiques ou ADN.

1. Vaccins peptidiques

L'identification de TAA est l'étape clé qui a permis le développement de ces vaccins anti-tumoraux. La compréhension des mécanismes de reconnaissance des Ag par le système immunitaire a notamment permis le développement des vaccins peptidiques spécifiques des tumeurs.

Essai	Avantages	Inconvénients	Sensibilité
Prolifération	techniquement simple	Incapable d'énumérer les cellules spécifiques ; mesures principalement les cellules T CD4, pas CD8	-
Tétramère	Capable d'énumérer les cellules T spécifiques ; analyse possible de sous-population	Requiert la synthèse des tétramères spécifiques ; pas une mesure d'activité fonctionnelle ; limité pour un seul epitope	1 : 10 ⁴
Cytométrie de flux	Capable d'énumérer les cellules T spécifiques ; essai fonctionnel ; analyse possible de sous-population	Requiert l'incubation ; incapable d'obtenir les cellules vivantes après essai ; technique compliquée	1 : 5.10 ⁴
ELISA	essai fonctionnel	Aucune information phénotypique sur les cellules répondeuse ; incapable d'énumérer les cellules spécifiques	-
ELISPOT	Capable d'énumérer les cellules T spécifiques ; essai fonctionnel	Aucune information phénotypique sur les cellules répondeuse	1 : 10 ⁵
Cytotoxicité	Essai fonctionnel ; quantification relative de cellules	Requiert la tumeur/cibles autologues ; stimulations in vitro requis ; incapable d'énumérer les cellules spécifiques	-
RT-PCR	Réactifs universels ; mesure indirecte de fonction	Mesure le mRNA, pas protéine ; incapable d'énumérer les cellules spécifiques ; exige plusieurs étapes (longues)	1 : 10 ⁵
Dilution limité	Capable d'énumérer les cellules T spécifiques ; essai fonctionnel	travail intensif ; requiert des stimulations multiples ; détecte seulement les cellules qui peuvent proliférer	1 : 10 ⁵

Tableau 8 : Méthodes immunologiques de suivi clinique

L'intérêt majeur d'utiliser les TAA sous forme peptidique réside dans le fait que cela permet d'activer le système immunitaire contre les épitopes dominants et sous-dominants présents dans la séquence de l'Ag cible. Cela n'est pas possible lors d'une immunisation avec la protéine entière, pour laquelle les réponses lymphocytaires T CD4+ et/ou CD8+ sont dirigées uniquement contre les épitopes dominants (Moudgil and Sercarz, 1993).

Un autre avantage non négligeable de la vaccination peptidique est qu'elle est bien tolérée par les patients, contrairement à d'autres vaccinations telles le transfert adoptif de cellules T activées. Elle est également peu coûteuse et ne nécessite pas de structures médicales lourdes comparée au transfert adoptif de cellules T ou à l'utilisation de DC. De plus, la possibilité de modifier les séquences peptidiques pour améliorer leur immunogénicité est plus facilement réalisable que pour les protéines. (Valmori et al., 1998).

La vaccination peptidique impose cependant la connaissance des Ag exprimés par la tumeur du patient, car cette dernière doit notamment exprimer l'Ag cible. Elle impose également la connaissance du phénotype HLA du patient. Ce dernier doit effectivement exprimer les molécules HLA impliquées dans la présentation du ou des peptides utilisés pour la vaccination. C'est pourquoi, dans ce type d'approche vaccinale, il est important d'identifier des épitopes capables de se lier sur un grand nombre de molécules HLA afin de pouvoir cibler un grand nombre de patients.

1.2. Essais cliniques de vaccinations peptidiques

L'identification d'Ag uniques aux tumeurs, ou abondamment exprimés par ces dernières constitue le rationnel pour développer des essais de vaccination peptidique, dont l'objectif principal est d'évaluer la toxicité, mais surtout les bénéfices immunologiques et cliniques sur des patients souffrant d'un cancer à un stade avancé. Les diverses méthodes immunologiques de suivi clinique utilisées sont listées dans le Tableau 8. Parmi ces méthodes de suivi clinique, la plus récente consiste à séquencer le TCR de lymphocytes circulants afin de détecter l'augmentation des clonotypes spécifiques d'un épitope particulier (Morgan et al., 2006).

Les premiers essais de vaccination prophylactique et/ou thérapeutique en modèle murin ont donné des résultats prometteurs (Noguchi et al., 1994). De plus, l'observation de régressions spontanées dans certains cancers comme le mélanome montre clairement la pré-existence d'une immunité anti-tumorale (Nagorsen et al., 2000). Cette immunité est médiée par des précurseurs CTL anti-peptide présentant un phénotype mémoire (CD45RO+ CCR7-), et capables de s'expandre plus rapidement après une re-stimulation *in vitro* avec le peptide spécifique, que les précurseurs lymphocytaires T des individus sains qui ont un phénotype naïf (CD45RA+ CCR7+) (Dunbar et al., 2000). Ces résultats ont amené les investigateurs à

Antigène ciblé	Peptides	Restriction HLA	Adjuvant	Type de cancer	Réponses CTL	Réponse clinique	Effets secondaires‡	Corrélation†	Référence
NY-ESO-1	SLLMWITQV* WITQCFLPVFLA QPPSGQRA	A2 DP4	IL-2	Melanoma	100%	PR 3%	2%	ND	(Khong, 2004)
gp100	GRAMLGHTHT MEVTV	A2, (DR53, DQ6)	IFA GM-CSF	Melanoma	57%	SD 4%	None	No	(Celis, 2007)
gp100	IMDQVPFSV	A2	IL-2	Melanoma	65% 31%	SD 31%	27%	No	(Roberts, 2006)
hTERT	YLFFYRKS* RLFFYRKS	A2 A2	IFA	NSCLC	88% 90%	SD 36%	None	Yes	(Bolonaki, 2007)
hTERT	YLFFYRKS* RLFFYRKS	A2 A2	IFA	Various	93%	SD 21%	None	ND	(Mavroudis, 2006)
WT1	CMTWVQMN CYTWNQMN	A24	IFA	Various	50%	Reduction 76%	12%	Yes	(Oka, 2004)
Survivin	AYACNTSTL	A24	None	Colorectal cancer	50%	MR 7% Reduction 40%	None	ND	(Tsuruma, 2004)
Survivin	AYACNTSTL	A24	IFA	Breast cancer	50%	SD 14%	None	ND	(Tsuruma, 2008)
SYT-SSX	GYDQIMPCK	A24	None	Synovial sarcoma	50%	SD 17%	None	No	(Kawaguchi, 2005)
CA9	EYRALQLHL AYEQLLSRL RYFQYEGSL	A24	IFA	RCC	76%	PR 13% SD 26%	None	Yes	(Uemura, 2006)
Multiple (12 antigènes)	Multiple (48 peptides)	A2, A24	IFA	RCC	5%	SD 60%	None	ND	(Suekane, 2007)
Multiple (9 antigènes)	Multiple (16 peptides)	A24	IFA	Prostate cancer	57%	Reduction 100%	None	ND	(Noguchi, 2005)
Multiple (7 antigènes)	Multiple (14 peptides)	A24	IFA	Prostate cancer	50%	Reduction 20%	None	No	(Sato, 2004)
Multiple (8 antigènes)	Multiple (16 peptides)	A2	IFA	Prostate cancer	40%	Reduction 30%	None	No	(Noguchi, 2004)

Tableau 9 : Essais cliniques de phase I/II de vaccinations peptidiques

(*Tsukahara et al., 2008*)

ND = Non Déterminé; * = peptide modifié; †Corrélation entre réponse immunologique et clinique; ‡Pourcentage d'effets secondaires délétères de grade 3, en accord avec les Critères de Toxicité Communs de l'Institut National du Cancer

mettre en place de nombreux essais cliniques chez l'homme. Les résultats de quelques essais cliniques sont récapitulés dans le Tableau 9.

1.2.1. Les essais cliniques avec des peptides de classe I (peptides CTL)

Les premiers essais cliniques utilisant des peptides de classe I, responsables de l'induction de réponses CTL, ont été réalisés principalement dans le mélanome, en utilisant des Ag de type « Cancer testis », (MAGE-3 et NY-ESO-1), ou des Ag de différenciation, (Melan-A/MART-1, tyrosinase et gp100). Malheureusement, les premiers essais réalisés n'ont pas donné les résultats escomptés, puisque seulement 10 à 30% de réponses cliniques ont été observées, souvent non corrélées avec les réponses CTL. Ainsi, 15 des 16 patients traités par injection du peptide Melan-A/MART- 27-35 développent des réponses CTL spécifiques détectables dans le sang, mais sans bénéfice clinique (Cormier et al., 1997).

La vaccination peptidique a également été employée pour traiter d'autres cancers. L'administration de peptides issus de la protéine oncogène KRas, à des patients atteints de cancer pancréatique, a permis d'augmenter leur survie globale. L'administration de peptides dérivés du papillomavirus humain (HPV 16) à des patientes atteintes de cancer du col de l'utérus, a permis l'induction de réponses CTL chez 50% des patientes traités (Parmiani et al., 2003).

L'administration de peptides dérivés de la Télomérase (TERT) à des patients atteints de carcinomes des poumons, a permis l'induction de CTL spécifiques chez 90% des patients traités. D'autre part, 36% de ces patients ont montré une stabilisation de leur maladie et une augmentation de leur durée de vie corrélée avec les réponses CTL précoces qu'ils avaient développé (Bolonaki et al., 2007). Enfin, plus récemment, l'équipe de Tsuruma a proposé de traiter des patients atteints de cancers colorectaux par administration d'un peptide dérivé de la Survivine et restreint à la molécule HLA-A24. 50% des patients traités ont montré une augmentation de la fréquence des CTL spécifiques de ce peptide mais seulement 40% d'entre eux ont eu une régression tumorale (Tsuruma et al., 2004).

Dans tous ces essais vaccinaux, l'injection de peptides a été très bien tolérée par les patients. Cependant, certains peptides ont posé des problèmes de toxicité, comme observé au cours d'un essai vaccinal utilisant un peptide restreint pour la molécule HLA-A2 et dérivé de l'Ag tumoral gp100. En effet, sur les 26 patients atteints de mélanomes immunisés par ce peptide et de l'IL2 comme adjuvant, 50% d'entre eux ont eu une toxicité de grade 2, et 25% d'entre eux ont eu une toxicité de grade 3. Cette toxicité n'est pas liée à l'emploi d'IL2 comme adjuvant car l'injection de cytokine seule n'a pas posé de problèmes. De plus, bien que 65% des patients aient développé des réponses CTL spécifiques de ce peptide, seulement 31% d'entre

eux ont montré une stabilisation de leur maladie, ce qui ne permet pas de corréler les réponses immunitaires induites avec les bénéfices cliniques (Roberts et al., 2006).

Les essais de vaccination avec des peptides CTL présentent donc un intérêt. Cependant, l'ensemble des patients ne répondent pas à ces traitements. Une hypothèse est que la tumeur peut facilement échapper à la surveillance immunitaire, en réprimant notamment l'Ag cible. Afin de palier à ce problème, des essais vaccinaux ont été effectués en utilisant de multiples peptides CTL. Cela permettant également de toucher un plus grand nombre de patients avec des typages HLA plus variés.

Un de ces essais a consisté à utiliser 16 peptides HLA-A2 restreints dérivés de 8 Ags tumoraux connus pour être exprimés dans les cancers de la prostate dont notamment PSA, PMSA et PAP. Les réponses CTL spontanées contre ces peptides ont été mesurées chez des patients atteints de cancer de la prostate. Les peptides ayant donné des réponses positives ont ensuite été injectés aux patients correspondants avec de l'IFA (adjuvant incomplet de Freund). Une réduction de la taille des tumeurs a été observée chez 30% des patients ainsi qu'une tolérance de l'ensemble des peptides injectés chez tous les patients (Noguchi et al., 2004). Des essais similaires ont été effectués sur 10 patients atteints de carcinomes rénaux en utilisant 48 peptides dérivés de 12 Ags tumoraux différents restreints aux molécules HLA-A2 et/ou HLA-A24. 60% des patients ont montré une stabilisation de la maladie (Suekane et al., 2007).

1.2.2. Les essais cliniques avec des peptides de classe I et II (peptides CTL et HTL)

Les quelques résultats prometteurs obtenus en vaccination anti-tumorale utilisant des peptides CTL sont rarement corrélés avec des bénéfices cliniques. Une hypothèse est que la vaccination avec un peptide de classe I seul peut induire une tolérance des CTL spécifiques. En effet, les peptides CTL utilisés peuvent se fixer sur les molécules de classe I présents à la surface des DC mais également présents sur les L_B et les macrophages. Ces cellules, à l'inverse des DC, peuvent présenter ces peptides CTL aux L_T CD8+ mais elles ne peuvent les activer car ils n'expriment pas de molécules de co-stimulation ce qui conduit à la mort par apoptose des CTL (Figure 29a). Une façon de prévenir cet état de tolérance est d'induire des réponses T CD4+ en plus des réponses T CD8+ (Bijker et al., 2007). En effet, l'activation de réponses T CD4+ permet d'augmenter l'amplitude des réponses CTL (Scheibenbogen et al., 2003). Cette double activation peut être obtenue par la vaccination conjointe avec des épitopes CD8+ et CD4+ (Figure 29b).

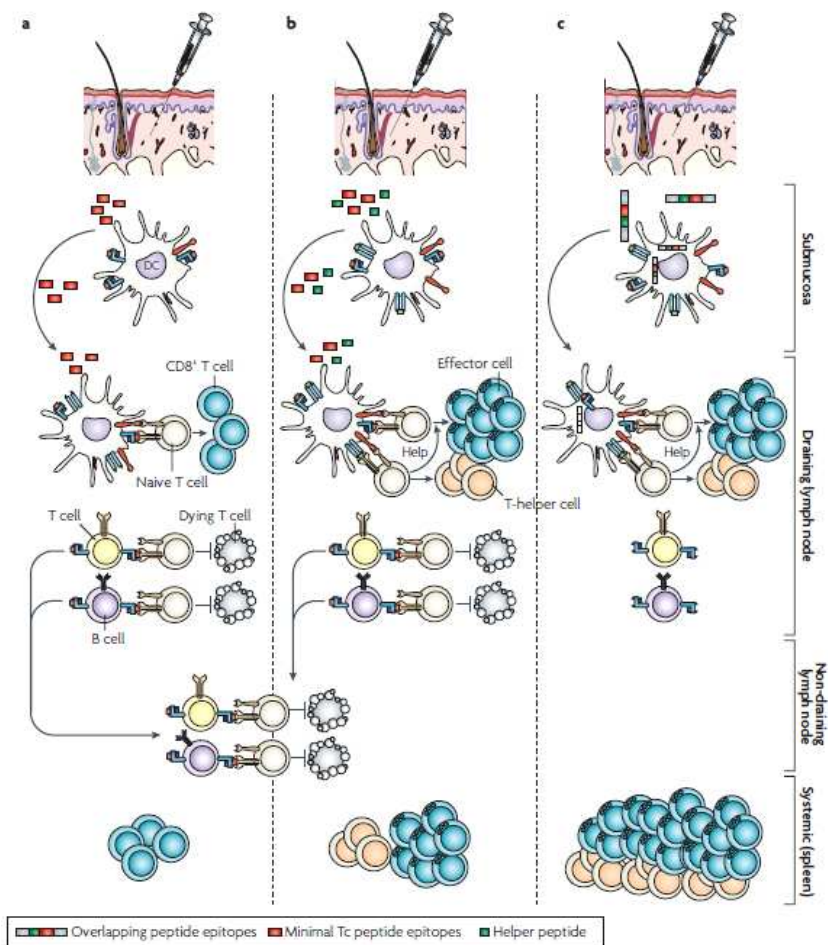


Figure 29 : Pharmacocinétique des peptides courts et longs utilisés en essais de vaccination
(Melief, 2008)

a. Les peptides CTL (rouge) peuvent se lier directement aux molécules HLA-I qui sont présents sur les DC dans les sous-muqueuses. Il en résulte une expansion des cellules T CD8+ mémoire spécifiques de l'antigène, mais en général de telles cellules T ne possèdent pas de fonctions effectrices fortes et la réponse est transitoire. Ces peptides peuvent également atteindre les ganglions lymphatiques où ils peuvent se lier de façon exogène aux DC, aux cellules T ou aux lymphocytes B. La reconnaissance de ces peptides CTL présentés par des cellules T et B mène à une tolérance de l'antigène caractérisée par une réponse proliférative avortée et à la mort des cellules T CD8+ spécifiques (Bijker, 2008).

b. L'ajout de peptides helper (vert) dans la vaccination améliore son efficacité. La présentation des peptides CTL et helper par les DC permet de stimuler les cellules T CD4+ qui stimulent à leur tour les DC leur permettant d'activer les cellules T CD8+ qui deviennent des cellules effectrices (indiqué par la présence de granules cytotitiques dans les cellules T). Les cellules T CD8+ reçoivent également une aide directe des cellules T CD4+ spécifiques de l'antigène. Ces peptides CTL et helper n'ont pas besoin d'être processés car ils peuvent se fixer de façon exogène sur les DC. Cependant, ces peptides peuvent également se fixer de façon exogène sur les cellules T et B dans les ganglions lymphatiques, ce qui conduit à une tolérance de l'antigène (Heath, 2001; Bijker, 2008).

c. L'utilisation de peptides longs chevauchants contenant à la fois un épitope T CD4+ et CD8+ permet de prévenir l'instauration d'une tolérance à l'antigène. Ces peptides ne peuvent pas se fixer de façon exogène sur les molécules HLA présentes à la surface des CPA. Ils sont phagocytés, apprêtés et présentés uniquement par les DC, ce qui résulte en la stimulation de réponses T CD4+ et CD8+ plus intenses (Welterse, 2007; Bijker, 2008).

L'aide apporté par l'induction de réponses T CD4+ sur les réponses T CD8+ ont d'abord été observés chez des souris vaccinées avec les deux types de peptides (Hanson et al., 2004).

Au vu de l'importance de l'induction de réponses T CD4+ en plus des réponses T CD8+, des efforts importants ont été faits pour identifier des épitopes T CD4+ dans différents Ags tels que MAGE-A, HER-2/neu et NY-ESO 1. Certains épitopes T CD4+ identifiés ont été combinés dans des vaccins comportant des épitopes T CD8+. Un épitope T CD4+ putatif de HER-2/neu p369-384 comprenant un épitope p369-377 de HLA-A2 a été injecté avec du GM-CSF et testé chez 19 patients HLA-A2 et Her2/neu positifs. 62% des patients ont développé des réponses de L_T CD4+ et CD8+. Les CTL sont capables de lyser les cellules tumorales. Les réponses vis à vis de p369-377 sont de longue durée et détectables chez les patients un an après la vaccination (Knutson et al., 2001). Ces résultats montrent que l'épitope T CD4+ est vraiment capable d'aider à l'induction des réponses T CD8+ et de les maintenir sur une longue durée.

Une autre approche consiste à utiliser des peptides courts contenant à la fois un épitope T CD8+ et CD4+. De tels peptides présentent de nombreux avantages. Premièrement, ils sont capables d'induire des réponses T CD4+ et CD8+. De plus, la tolérance des CTL est réduite car les épitopes T CD8+ contenus dans ces cellules ne peuvent se fixer sur les molécules HLA-I des L_B et des macrophages (Figure 29b). Des études ont en effet montré que la présentation des épitopes T CD8+ est améliorée avec ce type de peptides et que les réponses T CD8+ sont plus intenses (Shirai et al., 1994).

Trois de ces peptide ont été identifié dans la protéine gp100. Un essai de vaccination a été effectué avec l'un de ces peptides dérivé de la protéine gp100 injecté avec de l'IFA et du GM-CSF. Il a concerné 28 patients atteints de mélanome. 57% de ces patients ont montré une augmentation de la fréquence des CTL spécifiques et 4% ont eu une stabilisation de la maladie (Celis, 2007).

L'équipe du Dr Odunsi a réalisé en 2005 un essai de vaccination avec un peptide de l'Ag NY-ESO-1 contenant à la fois un épitope T CD4+ HLA-DP4 restreint et un épitope CD8+ HLA-A2 et HLA-A24 restreint. 18 patientes HLA-DP4 atteints de cancer de l'épithélium ovarien ont reçu 5 injections de ce peptide mixé avec du Montanide. 80% des patients ont développés des réponses T CD4+ spécifiques de ce peptide. 40% ont développés également des réponses humorales fortes et un des patients a eu une régression tumorale complète corrélée avec l'augmentation de cellules T CD4+ spécifiques. De plus, 22% des patients ont également développés des CTL spécifiques HLA-A2 et HLA-A24 restreints. Un tel peptide a donc permis de

développer des réponses T CD4+ et CD8+ mais également des réponses humorales. De plus, ce peptide a été toléré par l'ensemble des patients (Odunsi et al., 2007).

Une autre approche consiste à utiliser des peptides longs (22-45 acides aminés) contenant à la fois des épitopes T CD4+ et CD8+. Ces peptides présentent tous les avantages des peptides courts contenant les deux types d'épitopes T. Cependant, avec des peptides courts, une tolérance T CD4+ peut s'installer car ces peptides peuvent se fixer sur les molécules HLA-II présentes à la surface des CPA autres que les DC. Les peptides longs ne peuvent pas se fixer directement sur les molécules HLA-II. Ces peptides sont endocytés, processés et présentés uniquement par les DC (Bijker et al., 2008) ce qui conduit à une réponse immunitaire plus forte et plus efficace (Bijker et al., 2007) (Figure 29c). cependant, seuls les épitopes T immunodominants peuvent être utilisés sous cette forme.

Un essai de vaccination de phase II a été réalisé sur 20 patients atteints de cancer intra-épithéliale de la vulve de grade III HPV16 positif. Ces patients ont reçu 4 injections d'un mélange de 13 peptides chevauchants, de 27-35 acides aminés de longs, dérivés de la séquence des oncoprotéines E6 et E7 de l'HPV16. Sur 11 patients analysés, 4 patients ont montré une régression totale de toutes les lésions et 5 ont montré une régression partielle des lésions (réduction de la taille >50%). De plus, ces peptides longs se sont montrés hautement immunogéniques, car ils ont été capables d'augmenter le nombre et l'activité de cellules CD8+ et CD4+ spécifiques de l'HPV16 chez la plupart des patients vaccinés (Melief et al., 2008).

Un autre essai de vaccination a été réalisé sur 64 patients atteints de cancer des ovaires, des seins ou des poumons surexprimant la protéine Her-2/Neu. Ces patients ont été vaccinés avec 3 peptides longs dérivés de cette protéine, contenant tous un épitope T CD4+. 92% des patients ont développé des réponses T dirigées contre au moins l'un des 3 peptides associées avec une reconnaissance de la protéine entière. De plus, 84% des patients ont développé des réponses T dirigées contre d'autres épitopes, différents de ceux utilisés pour les injections (epitope spreading), corrélés avec une augmentation des réponses T spécifiques de la protéine Her-2/Neu. Ceci suggère que la vaccination a induit des réponses T dirigées contre d'autres Ags relargués des tumeurs. De plus, des réponses T spécifiques de la protéine Her-2/Neu ont été retrouvées chez 38% des patients vaccinés 1 an après la dernière injection (Disis et al., 2002).

1.2.3. Essais cliniques avec des peptides modifiés

Comme discuté ci-dessus, les peptides de classe I peuvent induire une répression du système immunitaire. De plus, parce que ces peptides sont souvent

issus d'Ag du soi surexprimés dans les tumeurs, ils peuvent également induire une tolérance centrale.

En effet, les L_T capables de reconnaître les épitopes dérivés de cet Ag ont pu être sélectionnés négativement dans le thymus. Seuls les lymphocytes spécifiques des épitopes ayant une faible affinité pour les molécules HLA ont pu échapper à cette tolérance centrale. Une façon de contrecarrer cette tolérance est de modifier la séquence des épitopes utilisés afin notamment d'améliorer l'affinité du peptide naturel pour les molécules HLA (Berzofsky et al., 2004). Ces modifications se font selon les motifs de liaison des molécules HLA visées. Cependant, chaque fois que la séquence du peptide est changée, il est important de démontrer que les cellules T induites reconnaissent toujours la séquence native du peptide. Ces peptides modifiés sont généralement utilisés dans les essais vaccinaux pour induire des réponses CTL contre le peptide natif.

Parmi les essais cliniques réalisés, l'injection avec de l'IFA comme adjuvant d'un peptide dérivé de la Télomérase et modifié pour son affinité à HLA-A2, a permis d'induire une augmentation de CTL chez 93% des 19 patients traités, en dépit du fait qu'une seule injection par ce peptide modifié a été réalisée, les 4 autres injections ayant été réalisées avec le peptide natif. De plus, bien que chimio-résistants, 26% d'entre eux ont eu une stabilisation de leur cancer, sans effets secondaires néfastes. Ces résultats prometteurs montrent bien que la vaccination par un peptide modifié permet d'induire des CTL spécifiques de l'épitope modifié mais capables de reconnaître également l'épitope natif (Mavroudis et al., 2006).

Dans une autre étude clinique, un épitope de WT1 modifié pour son affinité à la molécule HLA-A24 a été injecté à 26 patients atteints de divers cancers exprimant cet Ag cible, tels des cancers du poumon, du sein, des syndromes myélodysplasiques ou des leucémies myéloïdes. Une réduction de la masse tumorale a été observée pour 76% des patients traités, corrélée avec l'augmentation de la fréquence des CTL spécifiques de ce peptide modifié. Cependant, 12% de ces patients ont développé des effets secondaires comme des leucopénies sévères (Oka et al., 2004).

1.2.4. L'apport des adjuvants

Le choix de l'adjuvant pour améliorer l'immunogénicité du ou des peptides doit être pris en considération dans la mise en place d'un essai clinique, dès lors que ce dernier permet de délivrer un signal de « danger » nécessaire à l'activation optimale des DC (Matzinger, 1994).

L'IFA (adjuvant incomplet de Freund) bien que très utilisé dans les essais cliniques, pourrait ne pas être l'adjuvant le plus approprié. En effet, un essai comparatif a montré que l'administration du peptide tumoral tyrosinase 368-376 avec du GM-CSF ou du QS21 comme adjuvants naturels permet l'obtention de réponses cellulaires T détectables *ex vivo*, alors que l'administration de ce même peptide en

IFA ne le permet pas (Schaed et al., 2002). Les adjuvants Montanide ISA51 (Seppic, Paris, France) et TiterMax (CytRx Corp., Norcross, GA) sont des analogues de l'IFA. Leur pouvoir adjuvant est médié par l'effet de dépôt qui augmente la demi-vie du peptide au site de l'immunisation. Des adjuvants biologiques pro-inflammatoires tels que le BCG, des virosomes du virus de la grippe ont été aussi employés en vaccination anti-tumorale. Plus récemment, les adjuvants comportant des molécules actives en immunologie ont attiré beaucoup d'attention. Ils comprennent des cytokines, des chimiokines, des molécules de co-stimulation, ainsi que d'autres immunomodulateurs qui peuvent amplifier et diriger la réponse immune. Ainsi, l'administration du peptide gp100 avec de l'IL-2 permet l'obtention de réponses cliniques chez 42% des patients traités alors qu'aucun bénéfices cliniques ne sont observés si ce même peptide est injecté avec de l'IFA (Rosenberg et al., 1998a).

Le GM-CSF a également été utilisé dans des protocoles de vaccination, car il permet la migration, le recrutement local, la différenciation, et l'augmentation de l'apprêtement et de la présentation des Ag par les DC. Un essai de vaccination pluri-épitopique combinant 3 peptides (Melan-A/MART-127-35/gp100/tyrosinase) et le GM-CSF montre l'induction de réponses CTL contre l'un ou plusieurs des Ag utilisés et une régression tumorale transitoire pour les 3 patients HLA-A2 traités et atteints d'un mélanome métastatique (Jager et al., 1996). Une étude à plus grande échelle a montré l'obtention de réponses cliniques associées à une stabilisation de la maladie chez 11 patients sur 23 vaccinés (Jagere ; communication personnelle à A. Anichini). Toutefois, un essai de vaccination combinant le GM-CSF à des peptides de tyrosinase a montré l'induction de réponses cellulaires T chez 4 patients sur 5 vaccinés, mais associées à des réponses cliniques mitigées (Scheibenbogen et al., 2000).

Une stratégie plus récente est par exemple la combinaison de plusieurs adjuvants, tels le GM-CSF et des molécules de costimulation (telles que le CD40L ou des Ac agonistes anti-CD40). Ainsi, le GM-CSF permet le recrutement de DC alors que les molécules de costimulation peuvent induire la maturation de DC. Le GM-CSF peut également être associé à des cytokines favorables à la réponse Th1 (tels que l'IL-12 et IL-15). Les associations d'adjuvants peuvent alors être diverses et variées (Berzofsky et al., 2004).

En conclusion, la vaccination peptidique contre des néoplasies a fait d'énormes progrès et reste une approche essentielle parmi les différentes approches immuno-thérapeutiques connues. Elle est, en effet, aisément applicable à un moindre coût. La connaissance des épitopes utilisés permet un suivi rigoureux des réponses anti-peptidiques au cours de la vaccination. Cependant, la vaccination peptidique doit être encore améliorée. En effet, bien qu'il soit possible de générer des CTL spécifiques d'épitopes à partir de sujets sains ou de patients atteints d'un cancer, ces mêmes CTL reconnaissent rarement les cellules néoplasiques qui les expriment. Cette

absence de reconnaissance peut s'expliquer par la faible abondance de l'épitope à la surface de la cellule tumorale. L'utilisation d'un seul épitope est aussi risquée car l'instabilité génétique qui caractérise une tumeur peut lui permettre de sélectionner des cellules ayant muté et qui ne présentent plus l'épitope reconnu par les CTL. La vaccination pluri-épitopique limite donc le risque d'échappement de la tumeur à la surveillance du système immunitaire et permettrait de contrer l'hétérogénéité d'expression des Ag tumoraux entre cellules ou au sein d'une même tumeur. Actuellement, un intérêt est porté aux vaccinations peptidiques combinant des épitopes T CD4+ et CD8+. Il est donc intéressant et pertinent de rechercher des longs peptides contenant ces deux types d'épitopes.

2. Vaccins à base de protéines

Une alternative à l'emploi de plusieurs épitopes pour induire des réponses lymphocytaires T CD4+ et CD8+, est d'utiliser des Ag sous une forme protéique. Cette alternative présente l'avantage d'une immunisation pluri-épitopique (CD8+ et CD4+) et évite toute contrainte imposée par les molécules HLA. Cela permet également de s'absoudre des problèmes d'identification des épitopes T. La présentation de ces Ag est favorisée par les propriétés phagocytaires des DC. La partie la plus délicate réside dans le choix de l'adjuvant.

Peu d'essais cliniques utilisant ces approches ne sont encore répertoriés. Dans l'étude de Marchand et al., la protéine recombinante MAGE-A3 a été combinée avec l'adjuvant SBAS-2 (MPL et QS21) et injectée à 57 patients atteints de cancer MAGE-A3 positif. Ce vaccin a été bien toléré par les patients. Deux réponses partielles, deux réponses intermédiaires et une réponse complète associées à une stabilité de la maladie ont été observées (Marchand et al., 2003). D'autres études ont été réalisées avec l'Ag NY-ESO 1, et diffèrent les unes des autres de par le mode de préparation de la protéine. Ainsi, la protéine a été combinée avec un Ac (complexe immun Ag / Ac), exprimée par des cellules cibles (via l'infection par un adénovirus), ou plus récemment, associée à un adjuvant appelé Iscomatrix (Davis et al., 2004). Les résultats de cette dernière vaccination ont donné des résultats prometteurs sans effets secondaires notés. Ils montrent une régression de la tumeur chez 17 des 19 patients traités par le vaccin alors que 5 patients placebo sur 7 ont rechuté. Les L_T CD4+ et CD8+ ont été isolés après la vaccination montrant l'efficacité du vaccin et confirmant l'intérêt de travailler avec des protéines entières.

L'inconvénient majeur de cette stratégie est qu'elle ne permet l'induction de réponses cellulaires T uniquement dirigées contre les épitopes dominants présentés par les DC.

3. Vaccins à base d'ADN

Une autre stratégie vaccinale consiste à injecter en intramusculaire des séquences d'ADN codant pour l'Ag cible. Cette approche qui permet l'expression intracellulaire de l'Ag a pour objectif de faciliter la maturation et la présentation de ce dernier par les molécules HLA-I. L'utilisation de l'Ag sous forme ADN pourrait prolonger son expression, favorisant ainsi la réponse immunitaire. Cependant, comme pour la vaccination protéique, cette approche suppose que la maturation intracellulaire est adéquate et qu'elle permet une présentation optimale par les CPA. En conséquence, seuls les épitopes immunodominants sont présentés.

Les ADN plasmidiques peuvent se composer soit d'un gène (Zhai et al., 1996) ou de plusieurs gènes (Bonnet et al., 2000) codant pour le ou les Ag tumoraux, soit de la séquence antigénique minimale (Valmori et al., 2000), soit des séquences promotrices qui régulent l'expression constitutive de l'Ag.

L'Ag protéique produit par les cellules cibles (habituellement des myocytes ou des fibroblastes, selon l'itinéraire d'injection) est capté par les CPA de l'hôte, dégradé et présenté au système immunitaire dans les ganglions. Comme toutes les stratégies vaccinales basées sur des Ag définis, l'utilisation d'ADN nécessite d'identifier les cibles antigéniques, de les cloner et de s'assurer de leur expression dans les tissus tumoraux cibles. Le principal handicap de cette stratégie est le faible pouvoir immunogénique des ADN nus chez l'homme alors qu'il semble très élevé chez la souris. En particulier, les réponses anti-tumorales sont faibles. Des résultats plus prometteurs ont toutefois été observés pour des Ag dérivés d'agents infectieux comme le papillomavirus (Ribas et al., 2003).

L'injection d'un plasmide contenant un gène codant pour un Ag tumoral sous le contrôle d'un promoteur viral tire avantage de l'effet adjuvant de l'ADN plasmidique non méthylé, et en particulier des motifs GpG (Krieg, 2000). Ce motif, ligand spécifique du récepteur TLR9 des DC plasmocytaires, permet en effet d'induire leur maturation (Mincheff et al., 2000).

Les moyens pour augmenter le pouvoir immunologique de l'immunisation génétique à base d'ADN incluent 1) l'augmentation de la dose de plasmides (les primates et les humains semblent avoir besoin de doses beaucoup plus élevées que de plus petits animaux pour produire des réponses immunes détectables) ; 2) la co-expression de molécules immuno-stimulatrices telles que des cytokines, chimiokines, ou molécules de co-stimulation ; 3) l'insertion d'un alpha replicon de virus ou de protéines intracellulaires de transport du virus de l'herpès ; et 4) l'amélioration des techniques d'injection de l'ADN et de transfection des cellules *in vivo*.

L'efficacité de transfert de l'ADN peut être également améliorée par l'addition de liposomes cationiques, de polymères cationiques comme la polyéthylèneimine, par l'utilisation de particules d'or recouvertes d'ADN ou encore par l'utilisation de vecteurs viraux recombinants (Stratégie de prime-boost). Cette efficacité de transfert

peut également être améliorée par l'utilisation d'un pistolet propulsant l'ADN dans la peau grâce à l'hélium qu'il contient, ou par l'utilisation de techniques d'électroporation *in vivo* (pulse local au niveau du point d'injection de l'ADN) qui permettent d'augmenter de 10 à 1000 fois l'efficacité de transfection.

4. Les approches vaccinales utilisant des cellules

4.1 Vaccins utilisant des cellules tumorales

a) Utilisation de cellules tumorales autologues

Par référence aux vaccins contenant des pathogènes atténués et en raison de l'absence de TAA définis, les premiers vaccins anti-cancéreux étaient composés de cellules tumorales entières. Des cellules tumorales autologues sont obtenues à partir de tumeurs excisées par le chirurgien puis utilisées comme vaccin. Chaque patient est vacciné avec ses propres cellules tumorales, préalablement irradiées ou atténuées pour empêcher leur prolifération *in vivo*. Leurs cellules tumorales sont réinjectées aux patients avec ou sans immunomodulateurs tels que le BCG (Kim et al., 2002). L'utilisation de cellules tumorales autologues présente l'avantage d'immuniser les patients contre la totalité des Ag endogènes exprimés par la tumeur. En revanche, elle nécessite, notamment pour les tumeurs solides, de disposer d'une masse tumorale importante pour obtenir une quantité suffisante de matériel antigénique. Ainsi, les patients dont les tumeurs sont inaccessibles (tumeurs cérébrales), ou en masse insuffisante (NSCLC; non-small cell lung cancer), ne peuvent pas être traités de cette façon. Une alternative est de générer des lignées tumorales à partir d'une biopsie, mais les conditions de culture doivent être rigoureusement définies.

Des études cliniques ont été conduites dans le mélanome pour lequel la masse tumorale est facilement accessible. Un essai avec des cellules de mélanome modifiées par l'haptène DNP (dinitrophenyl) utilisé comme adjuvant, a confirmé qu'il était possible d'obtenir une réaction inflammatoire (DTH) contre les lésions tumorales autologues. Cette réaction semble corrélée à une augmentation de la survie globale, de 45% pour les patients avec un seul nodule tumoral, et de 47% pour les patients avec deux nodules tumoraux par rapport aux patients non vaccinés (Berd et al., 1997). La vaccination avec des cellules tumorales autologues s'est ensuite généralisée à d'autres types de cancers, comme les carcinomes rénaux (McCune et al., 1990). Comme pour les essais réalisés dans le mélanome, les investigateurs ont observé une DTH contre les cellules tumorales autologues, avec parfois une amélioration de la survie à long terme par rapport à des séries historiques.

b) Utilisation de cellules tumorales allogéniques

Les vaccins composés de cellules autologues posent des problèmes car ils nécessitent qu'un spécimen tumoral soit obtenu pour chaque patient. De plus, il est souvent difficile d'obtenir suffisamment de matériel tumoral autologue. Pour éviter ces problèmes, plusieurs équipes ont développé des stratégies utilisant des lignées cellulaires tumorales allogéniques. L'efficacité des vaccins allogéniques repose sur l'existence d'Ag partagés entre les différentes tumeurs et qui sont indépendants du donneur. Les vaccins allogéniques présentent l'avantage d'être plus aisément applicables à un plus grand nombre de patients, indépendamment de la disponibilité de la tumeur (Ribas et al., 2003).

Cependant, ce type de vaccin implique d'utiliser une lignée dont les molécules HLA sont compatibles avec celles du patient. La lignée doit également être capable de présenter des TAA ayant des motifs de liaison au HLA du patient. Des études cliniques ont donné quelques résultats prometteurs. La vaccination de patients avec 3 lignées allogéniques de mélanome a permis d'améliorer leur médiane de survie, accompagnée de l'induction d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire contre certains Ag de mélanome (Morton et al., 1993). Un vaccin utilisant un lysat de deux lignées cellulaires allogéniques combiné à un adjuvant (Detox) a permis l'obtention de bénéfices cliniques comparables à ceux obtenus avec le traitement chimiothérapeutique des patients souffrant d'un mélanome, mais avec des effets toxiques réduits (Elliott et al., 1993). Toutefois, les résultats prometteurs obtenus dans le mélanome ne sont pas généralisables à toutes les tumeurs, probablement parce que les cellules vaccinales peuvent être rapidement rejetées par le système immunitaire de l'hôte en raison de l'expression d'Ag allogéniques. De plus, un inconvénient important des vaccins à base de cellules tumorales entières est que ces préparations ne sont que faiblement immunogènes. C'est pourquoi, la majorité des essais cliniques portant sur ces vaccins n'ont pas pu clairement démontrer d'activité anti-tumorale (Ribas et al., 2003).

c) Utilisation de cellules tumorales modifiées

Comme pour les approches vaccinales peptidiques, la combinaison de vaccins à base de cellules tumorales (autologues ou allogéniques) à des cytokines (GM-CSF, IL-2) (Zhang et al., 2005), ou leur modification par génie génétique pour induire l'expression de cytokines ou de molécules de co-stimulation a permis d'améliorer les traitements.

Toutefois, parce qu'une étude préliminaire dans un modèle murin comparant l'influence de l'expression de dix cytokines sur l'immunogénicité des tumeurs a montré que le GM-CSF était la cytokine la plus efficace, elle a été largement utilisée

en clinique. Le GM-CSF pourrait amplifier la voie de présentation des Ag par les DC et stimuler le système immunitaire par une voie directe, c'est-à-dire en permettant à la cellule tumorale génétiquement modifiée de se comporter comme une CPA.

Cependant, les vaccins à base de cellules tumorales entières génétiquement modifiées présentent des risques pour la santé des patients. Le plus sérieux est le risque d'induire une maladie auto-immune. Ceci a d'ailleurs été observé dans des modèles animaux, ainsi que lors d'essais cliniques (Ribas et al., 2003).

4.2 Les vaccins utilisant les DC

Des stratégies d'immunothérapie tentent d'améliorer la présentation de l'Ag par l'utilisation des DC. En effet, les DC jouent un rôle essentiel dans la mise en place et le maintien de la réponse immunitaire anti-tumorale par l'intermédiaire d'une présentation de l'Ag extrêmement efficace aux L_T CD4⁺ et CD8⁺. L'idée directrice consiste à associer l'Ag tumoral sous différentes formes aux DC afin d'obtenir une présentation optimale de cet Ag.

Des études ont montré que des DC chargées avec des lysats de tumeur, avec des peptides dérivés de TAA ou avec des protéines tumorales entières sont capables de produire des réponses immunes spécifiques des tumeurs (Fong and Engleman, 2000). Afin d'optimiser ces approches, de nombreuses études ont été réalisées pour déterminer la nature de la DC à employer (immatures ou matures), pour étudier l'influence du mode d'injection ainsi que le mode de chargement des DC en TAA.

a) Types de DC utilisées et voies d'injection

Des études ont montré que les DC matures sont plus efficaces que les DC immatures pour induire des réponses immunitaires anti-tumorales spécifiques. Des études préliminaires réalisées *in vitro* avaient effectivement montré que les DC matures étaient plus efficaces pour induire des réponses CTL de type Th1, et résistaient aux effets immunosuppresseurs de l'IL-10 produit par les tumeurs (Steinbrink et al., 1999). En clinique, une étude sur des volontaires sains a montré que l'injection de DC immatures chargées en Ag est associée à l'induction de réponses tolérogènes (Dhodapkar et al., 2001). De plus, une étude comparant les DC immatures *vs* les DC matures dans le mélanome a clairement montré que seules les DC matures induisent des réponses anti-tumorales spécifiques d'Ag (Jonuleit et al., 2001).

D'autre part, il est aujourd'hui admis que les injections intradermique et sous-cutanée sont plus efficaces que l'injection intraveineuse, car elles favorisent la migration des DC dans les ganglions (Mullins et al., 2003), et la polarisation des réponses immunitaires de type Th1 (Fong et al., 2001a).

b) Sources d'antigènes utilisés et méthodes de chargement

Dans les approches de vaccination peptidique, l'utilisation de plusieurs peptides ou d'un peptide pluri-épitopique est aujourd'hui privilégiée, afin de limiter l'échappement tumoral (par délétion clonale des CTL spécifiques du peptide ou par sélection de cellules tumorales qui ne l'expriment plus). Le chargement de ces peptides sur les DC permet d'amplifier considérablement leur immunogénicité. La question est de savoir si tous les peptides utilisés pour la vaccination doivent être chargés sur les mêmes DC, ou s'il faut charger chaque peptide sur des DC différentes, afin d'éviter la compétition des peptides pour la fixation sur une molécule HLA. Une étude sur le mélanome a montré de façon surprenante, qu'il était possible d'obtenir des réponses immunes contre tous les peptides utilisés et restreints par la même molécule HLA même lorsqu'ils étaient chargés simultanément sur les mêmes DC (Banchereau et al., 2001). En contre partie, une autre étude dans un modèle murin sur le suivi des réponses CTL *in vivo* après injection de plusieurs épitopes viraux a montré que la vaccination conduisait en une expansion d'un clone de CTL spécifique d'un seul des peptides utilisés (Palmowski et al., 2002).

Il est difficile de comparer l'efficacité des différentes approches vaccinales utilisant des DC, en raison de la non standardisation des protocoles et des suivis post-vaccination *in vitro*. Toutefois, les essais utilisant le répertoire antigénique total de la tumeur semblent donner les résultats cliniques les plus objectifs. En effet, le Dr Nestle a rapporté en 1998 une étude clinique dans le mélanome comparant l'efficacité vaccinale de DC chargées en peptides *vs* des DC chargées en lysat tumoral. Ils ont observé que l'utilisation de lysat tumoral permettait d'induire plus de réponses immunes (2/4 patients) que l'utilisation de peptides (3/12 patients) (Nestle et al., 1998).

Les stratégies de chargement sont de nos jours nombreuses et variées : les DC peuvent être transfectées par des vecteurs viraux (Ribas et al., 2002), des ARN (Boczkowski et al., 1996) ou des plasmides ; elles peuvent être chargées en complexes immuns (Regnault et al., 1999), ou en Ac spécifiques de molécules de surface (Fong and Engleman, 2000); elles peuvent également être chargées par des protéines recombinantes ou exosomes (Zitvogel et al., 1998), des corps apoptotiques (Albert et al., 1998), des lysats tumoraux, ou encore des peptides élués de la surface des cellules tumorales.

Actuellement, l'amélioration de la connaissance des voies de chargements a permis de proposer des protocoles de chargement des Ag sur des récepteurs lectine de type-C présents à la surface des DC tels que DEC-205 (Bozzacco et al., 2007), DC-SIGN (Tacke et al., 2005), ou DNGR-1 (Sancho et al., 2008). Le chargement d'Ag sur ce type de récepteur permet leur apprêtement de façon correcte et leur présentation *via* les molécules HLA-I et II. Cependant, pour pouvoir être chargés sur ces

récepteurs, les Ag doivent être couplés à des résidus glycosylés ou à des Ac monoclonaux dirigés contre ces récepteurs.

c) Essais cliniques de vaccins utilisant des DC

Des patients atteints de mélanome ont été les premiers à être vaccinés avec des DC autologues chargées par des peptides tumoraux. Les vaccinations utilisant les DC ont été généralement bien tolérées et les symptômes locaux et systémiques observés étaient semblables à ceux résultant de vaccinations peptidiques.

L'utilisation de DC chargées en lysats tumoraux a été rapportée dans d'autres essais. Parmi ces études, l'injection de DC matures autologues chargées en lysats de tumeurs de carcinomes rénaux a conduit à l'induction de 2 réponses complètes, d'une réponse partielle et de 7 stabilisations de la maladie chez 27 patients vaccinés (Holtl et al., 2002). Ces stabilisations ont été observées jusqu'à trois ans après vaccination. De la même façon, des réponses complètes à long terme ont été rapportées après vaccination de patients atteints d'un mélanome métastatique par des DC autologues matures chargées en cellules tumorales irradiées (O'Rourke et al., 2003).

Les vaccins utilisant des DC ont été aussi employés pour le traitement de patients atteints du cancer de la prostate. Ces patients ont reçu des peptides issus des Ag spécifiques PSA, PSMA et PAP. Aucune réponse cellulaire n'a été détectée et les résultats cliniques ont été essentiellement transitoires avec 50% de réduction du niveau sérique de PSA pour 30% de sujets (Murphy et al., 1999). Dans une étude récente utilisant des DC autologues transfectées avec l'ARNm de PSA, trois rémissions complètes ont été rapportées. La réponse lymphocytaire anti-PSA était détectable pour 11 sujets examinés parmi les 13 patients vaccinés (Heiser et al., 2002). Enfin, dans une étude intéressante, des patients atteints de cancer du colon ont été immunisés par l'injection d'un peptide agoniste de l'Ag tumoral CEA, le CAP1, après que leurs DC aient été mobilisées *in vivo* par l'injection de Flt3. Cette étude a permis l'obtention de rémissions complètes pour deux patients traités et une stabilisation de la maladie pour deux autres patients supplémentaires. (Fong et al., 2001b).

En résumé, les études cliniques utilisant des DC sont de nos jours nombreuses, mais sont-elles pour autant plus efficaces que d'autres approches vaccinales? Il semblerait que oui, car le Dr Banchereau a rapporté dans une revue la comparaison du taux de réponses obtenues après vaccination dans le mélanome selon les différentes approches les plus utilisées en clinique et a montré que la vaccination par des DC a permis l'obtention de régressions tumorales chez 9,5% des patients traités *vs* 4,6% de réponses pour des patients traités par des cellules tumorales (Tableau 10) (Banchereau and Palucka, 2005).

Vaccin	Nombre total de patients	Patients répondeurs	Taux de réponse (%)
<i>Vaccin peptidique</i>	410	11	2,7
<i>Vecteurs viraux</i>	160	3	1,9
<i>Cellules tumorales</i>	43	2	4,6
<i>DC</i>	116	11	9,5

Tableau 10 : Devenir clinique des patients cancéreux vaccinés selon différentes approches. Analyse réalisée sur le mélanome.

En conclusion, les DC semblent être un moyen efficace pour augmenter les réponses immunes spécifiques des TAA. Toutefois leur utilisation nécessite de cultiver des DC autologues pour produire des vaccins personnalisés. Il est donc nécessaire d'avoir un équipement très spécifique et un personnel expérimenté, ce qui augmente considérablement le coût de la thérapie.

En conclusion générale, les stratégies de vaccination anti-tumorales développées de nos jours, sont nombreuses et variées. L'efficacité de ces vaccins a été grandement améliorée notamment par l'utilisation de séquences protéiques ou peptidiques capables d'induire à la fois des réponses cellulaires T CD8+ et CD4+ mais également par l'apport indéniable des adjuvants.

Des stratégies de vaccination pluri-épitopiques se sont également développées, notamment parce qu'elles permettent de limiter les risques de voir apparaître au sein des tumeurs, des clones devenus résistants aux attaques du système immunitaire suite à une dérégulation de l'expression des Ag cibles (Khong and Restifo, 2002). Le développement de cellules tumorales résistantes est possible car la plupart des TAA utilisés lors des essais cliniques ne sont pas des protéines impliquées dans la survie des cellules tumorales (tel que gp100, les TAA spécifiques des mélanomes, PSA, PMSA, PAP, CEA, ...). Cette vaccination pluri-épitopique est envisageable dans le cas de cancers pour lesquels de nombreux Ag tumoraux ont été identifiés. C'est le cas des mélanomes et des cancers de la prostate. Elle n'est donc pas envisageable pour certaines tumeurs, comme les hépatocarcinomes, pour lesquelles le nombre de TAA identifiés est plus limité.

Ces dernières années, une nouvelle catégorie de TAA ont été identifiés. Ce sont des protéines universelles c'est à dire exprimées dans un grand nombre de tumeurs et ayant un rôle vital pour la croissance et/ou la survie des cellules cancéreuses. Une vaccination anti-tumorale utilisant ce type d'Ag, permet donc de cibler des tumeurs variées tout en limitant le risque de voir apparaître des clones résistants. Cependant, peu de ces Ag universels ont encore été identifiés. Parmi ces Ag, nous pouvons

toutefois citer la protéine anti-apoptotique Survivine et la Télomérase qui ont été étudiés dans des études précliniques et cliniques. Des épitopes T CD8+ dérivés de ces Ag sont connus, mais peu, voire aucun épitope T CD4+ n'ont été identifiés. Il est donc important de pouvoir définir des séquences peptidiques pertinentes au sein de ces Ag afin de proposer des cibles de choix pour les essais cliniques. Il est également nécessaire d'identifier d'autres Ag ayant ce caractère universel.

L'objectif de mon travail de thèse s'inscrit en droite ligne de ces observations. Dans un premier temps, mon travail a porté sur l'étude de l'ensemble des réponses cellulaires T dirigées contre la Survivine, afin de proposer de nouvelles cibles peptidiques pour des essais de vaccination. Dans une seconde partie, mon travail a permis l'identification d'un nouvel Ag tumoral universel ouvrant des perspectives de thérapies anti-tumorale très prometteuses, dans la mesure où le développement de vaccins ciblant cet Ag pourrait être proposé pour le traitement de cancers variés.

Résultats

Chapitre 1

La Survivine : une nouvelle cible de thérapie anti-cancéreuse

La Survivine est une protéine de 16.5 kDa appartenant à la famille des IAP (inhibitor of apoptosis) qui a été identifiée en 1997 (Ambrosini et al., 1997). Cette protéine est codée par un seul gène localisé sur le chromosome humain 17q25 (11 E2 chez la souris) qui donne naissance à quatre transcrits épissés de façon alternative : les transcrits de la Survivine sauvage (142 acides aminés), deux isoformes générés par l'insertion alternative de l'exon 2 (Survivine-2 β , 165 aa) ou l'élimination de l'exon 3 (Survivine- Δ Ex-3, 120 aa) et la forme Survivine-3 β (170 aa) récemment découverte et résultant de l'introduction d'un nouvel exon-3 β .

Des études d'inhibition de la Survivine ont montré qu'elle jouait un rôle dans la division cellulaire. Elle permettrait également d'inhiber l'apoptose, en se fixant aux protéines pro-apoptotiques Smac / DIABLO (Johnson and Howerth, 2004). Elle est abondamment exprimée au cours du développement embryonnaire ainsi que dans les cellules proliférantes durant la phase G2/M, mais elle n'est trouvée qu'en faible quantité dans la plupart des tissus normaux différenciés. En revanche, elle est sélectivement surexprimée dans la plupart des cellules néoplasiques et semble être impliquée dans la résistance des cellules tumorales à des agents anticancéreux, comme le Taxol (Hsieh et al., 2002), ainsi qu'aux radiations ionisantes (Song et al., 2003). La Survivine fait donc partie des quelques protéines, au même titre que la Télomérase et la p53, qui sont différentiellement exprimées dans les cellules tumorales et la plupart des tissus normaux.

L'ensemble de ces propriétés font de la Survivine une cible attrayante pour l'immunothérapie anti-cancéreuse. Comme cette protéine est intracellulaire, les immunothérapies envisagées reposent sur l'induction d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire induisant la production de L_T capables d'aller détruire spécifiquement les cellules cancéreuses exprimant la Survivine.

Plusieurs études montrent que cette protéine est immunogène. En effet, des réponses immunes T CD8⁺ contre la Survivine ont déjà été décrites et une dizaine d'épitopes T CD8⁺ restreints aux molécules HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11 ou HLA-A24 ont déjà été identifiés dans sa séquence (Schmitz et al., 2000).

D'autre part, des réponses humorales dirigées contre la Survivine ont également été rapportées chez des patients atteints de cancers (Yagihashi et al., 2001). La présence d'une réponse humorale chez ces patients implique l'existence d'une réponse T CD4⁺ spécifique de la Survivine ayant fourni une aide nécessaire à la production des anticorps. Plus directement, dans l'étude de Casati *et al* en 2003, les auteurs ont détecté à la fois une réponse de L_T CD8⁺ et de L_T CD4⁺ dirigées contre la

Survivine chez un même patient atteint d'un cancer colorectal (Casati et al., 2003). Plus récemment, une étude a démontré *in vitro* que le nombre et la fréquence de CTL spécifiques de la Survivine étaient augmentés en présence de L_T CD4⁺ spécifiques du même Ag (Kim et al., 2008). Ces résultats démontrent bien l'immunogénicité de la Survivine. Toutefois, aucune étude n'a été faite au sujet de la capacité de cet Ag à induire des réponses T CD4⁺ et aucun épitope T CD4⁺ n'a encore été décrit dans la séquence de cette protéine. La première partie de mon travail de thèse a donc porté sur l'identification des épitopes T CD4⁺ de la Survivine.

A. Étude de la réponse T CD4⁺ induite contre la Survivine

1. Objectifs du travail

Les cellules T CD4⁺ jouent un rôle crucial dans l'initiation et l'entretien de cellules T CD8⁺ effectrices et l'activation de cellules B pour la production d'anticorps. L'identification des épitopes T CD4⁺ est donc importante non seulement pour l'étude des réponses immunes spontanées spécifiques d'Ag des patients atteints d'un cancer mais également pour le développement de vaccins anti-tumoraux.

La diversité et le polymorphisme des molécules HLA-II constituent les limites les plus importantes à la caractérisation et à l'utilisation des épitopes T en tant qu'éléments de vaccination. En Europe et aux USA, 10 molécules sont prépondérantes et couvrent l'essentiel de la population. Il s'agit de 7 allèles du locus HLA-DRB1 (DRB1*0101, *0301, *0401, *0701, *1101, *1301, *1501) et des allèles HLA-DRB3*0101, DRB4*0101 et DRB5*0101. D'autre part, deux molécules HLA-DP4 (HLA-DRB1*0401 et *0402) sont présentes chez 76% de la population caucasienne. De manière intéressante, certaines de ces molécules partagent des modes de liaison de peptides similaires. Ainsi, il existe des peptides capables de se lier à plusieurs de ces molécules largement représentées dans les populations, on parle alors de peptides « promiscuous ». Dans le cadre d'immunothérapie à base de séquences peptidiques, les peptides universels s'imposent donc comme les meilleurs candidats puisqu'ils permettent de s'affranchir de la limite posée par le polymorphisme des molécules HLA et de pouvoir cibler la majorité de la population. De tels épitopes présentent également un intérêt diagnostique puisqu'ils pourraient être utilisés pour le suivi de la réponse immune dirigée contre la Survivine et par extrapolation contre la tumeur. Le premier objectif de mon travail de thèse a été d'identifier des épitopes T CD4⁺ dérivés de la Survivine capables d'être présentés par plusieurs molécules HLA-II et d'en évaluer les propriétés immunologiques.

Cette étude a été initiée par Mlle Wang durant sa thèse dans le laboratoire. Elle a synthétisé des peptides chevauchants couvrant l'ensemble de la séquence de la Survivine et a sélectionné ceux capables de se lier avec une haute affinité à plusieurs molécules HLA-II selon des tests de liaison *ex vivo*. Mlle Wang a ensuite évalué l'immunogénicité (potentielle) de ces différents peptides par des tests d'induction de L_T CD4+ *in vitro*. Elle a enfin caractérisé les L_T CD4+ spécifiques de ces peptides de la Survivine par des tests de restriction. Elle a également regardé la réponse T CD4+ à différentes concentrations de peptides (tests de dose réponse) et elle a réalisé des tests de reconnaissance de l'Ag natif (la Survivine recombinante) présenté par les cellules dendritiques autologues.

Pour ma part, j'ai étudié la capacité de L_T CD4+ spécifiques de peptides de la Survivine à reconnaître des cellules tumorales de façon directe ou des lysats de cellules tumorales présentés par des DC autologues. Les résultats obtenus ont permis de mettre en place une collaboration avec le Dr Eric Tartour de l'hôpital Européen Georges Pompidou qui a étudié les réponses spontanées contre ces peptides chez des patients atteints de carcinomes rénaux (RCC pour Renal Cell Carcinoma). Il a également effectué des marquages immunohistochimiques de la Survivine sur des coupes histologiques de biopsies de tumeurs rénales.

2. Présentation de l'article

Résumé des travaux de Mlle Wang

Durant sa thèse, Mlle Wang a démontré l'immunogénicité de la Survivine face à des L_T CD4+. Pour cela, elle a tout d'abord synthétisé 27 peptides chevauchants couvrant l'ensemble de la séquence de la Survivine. Le découpage de la séquence de la Survivine en peptides n'a pas été effectué au hasard. Seul ont été retenus les peptides contenant un résidu aliphatique ou aromatique dans leur partie N-terminale qui est nécessaire à la fixation aux molécules HLA-DR et HLADP4. Mlle Wang a ensuite testé leurs propriétés de liaison grâce aux tests de liaison aux 12 molécules HLA-II les plus représentées dans la population, développés dans le laboratoire (Elisa en compétition), à savoir sept molécules codées par les gènes HLADRB1 (HLA-DRB1*0101, *0301, *0401, *0701, *1101, *1301, *1501), trois molécules codées par les gènes HLA-DRB3*0101, HLA-DRB4*0101, HLA-DRB5*0101 et deux molécules HLA-DP4 codées par les gènes HLA-DPB1*0401 et HLA-DPB1*0402. Ces tests de liaison lui ont permis de sélectionner sept peptides de haute affinité pour plusieurs molécules HLA-DR : les peptides 17-31, 20-34, 84-98, 90-104, 93-107, 96-110 et 128-142. Elle a ensuite étudié l'immunogénicité de ces peptides en évaluant leur capacité à induire une réponse T CD4+ spécifique chez 7 donneurs sains présentant des typages HLA très différents de manière à couvrir une grande partie des allèles HLA-II les plus

représentés. Le principe de cette induction est décrit en détail dans le matériel et méthode de l'article. Mlle Wang a constaté que tous les peptides sélectionnés étaient immunogènes car ils étaient tous capables d'induire une réponse T CD4+.

De manière à étudier en détail les différentes lignées spécifiques des peptides d'intérêt, Mlle Wang a caractérisé leur restriction, à savoir par quelle molécule HLA-II chaque peptide était-il présenté, leur efficacité de reconnaissance des peptides (par des expériences de dose-réponse) et leur capacité à reconnaître l'Ag natif (la Survivine recombinante) présenté par les cellules dendritiques immatures autologues.

Ainsi, 12 lignées ont été testées pour leur élément de restriction à l'aide de cellules L (lymphomes B murin) exprimant un allèle HLA-II donné suite à une transfection stable. Mlle Wang a constaté que les peptides 17-31 et 90-104 sont peptides « promiscuous » car ils sont capables d'être présentés par un grand nombre de molécules HLA-II.

Les études de dose réponse ont permis de démontrer que les peptides 90-104 et 128-142 sont capables d'induire des réponses T CD4+ même à des concentrations faible.

Mlle Wang a également montré que les peptides 17-31, 20-34, 90-104, et 93-107 sont des épitopes T CD4+ naturellement apprêtés à partir de l'Ag natif. En effet, des lignées T CD4+ spécifiques de l'un de ces peptides reconnaissent la Survivine présentée par les DC immatures autologues. Cette reconnaissance est bien spécifique de la Survivine puisque ces mêmes lignées T CD4+ ne répondent pas aux DC chargées avec la protéine Nef du VIH, utilisées comme un contrôle négatif.

Nous avons donc montré que ces quatre peptides sont des épitopes naturellement présentés par plusieurs molécules HLA-II différentes suite à l'apprêtement de la Survivine par les DC.

Faute de temps, Mlle Wang n'a pu démontrer la capacité des cellules T CD4+ spécifiques de la Survivine, à reconnaître des cellules tumorales de façon directe ou des lysats de cellules tumorales présenté par des DC. C'est le travail que j'ai réalisé.

Reconnaissance de lysats de tumeurs

Nous avons voulu tester la capacité de lignées de T_{CD4+} spécifiques de la Survivine à reconnaître des lysats de tumeurs présentés par des DC autologues. Nous voulions également vérifier que le taux d'expression endogène de la Survivine était suffisant pour que cette reconnaissance ait lieu.

Pour répondre à ces questions, nous avons induits de nouvelles lignées contre les peptides de la Survivine et nous avons étudié l'activation par Elispot IFN- γ , de 2 lignées T spécifiques du peptide 17-31 (les lignées 241.19 et 241.34) incubées avec des

DC autologues préalablement chargées ou non avec des lysats de cellules tumorales HeLa exprimant naturellement la Survivine. Parallèlement, nous avons mis ces mêmes lignées en présence de DC autologues incubées avec l'Ag natif (la survivine recombinante) ou chargées avec le peptide 17-31, comme témoins positifs, ainsi que des DC incubées avec la protéine Nef du VIH ou seules, comme témoins négatifs.

Afin d'étudier si le taux d'expression endogène de la Survivine dans les cellules tumorales est suffisant pour avoir une activation de lignées T CD4+, nous avons utilisé deux types de lysats de tumeurs à savoir des lysats de cellules HeLa transfectées ou non par un vecteur d'expression eucaryote codant pour la Survivine. Des analyses d'expression effectuées par cytométrie de flux ainsi que par Western Blot montrent que le taux d'expression de la Survivine est 10 fois plus important dans les cellules HeLa transfectées que dans les cellules HeLa normales (Figures 3A et 3B de l'article).

Les résultats (Figure 3C de l'article) de ces expériences montrent que des lignées T CD4+ sont capables de reconnaître des lysats de tumeurs présentés par des DC autologues. De plus, pour l'une des deux lignées étudiées, le taux d'expression endogène de la Survivine est suffisant pour que cette reconnaissance ait lieu.

Reconnaissance directe de cellules tumorales

Nous avons ensuite testé la capacité de lignées T spécifiques de la Survivine à reconnaître directement des cellules tumorales entières. Pour cela, nous avons étudié par Elispot IFN- γ l'activation de deux lignées T restreintes à HLA-DR7 et spécifiques du peptide 20-34, face à des EBV (HT144 et PITOUT) exprimant naturellement la Survivine et la molécule HLA-DR7.

Des cellules L transfectées stablement avec un plasmide codant pour la molécule HLA-DR7, chargées ou non avec le peptide 20-34 servent respectivement de témoin positif ou négatif respectivement.

Les résultats (Figure 3D de l'article) montrent que des lignées T spécifiques de la Survivine sont capables de reconnaître directement des cellules tumorales exprimant naturellement cette protéine. Ces résultats indiquent également qu'au moins un des peptides de la Survivine, le peptide 20-34, est naturellement apprêté et présenté à la surface des cellules tumorales, accessible alors aux lymphocytes T.

Détection des réponses spontanées chez des patients atteints de cancer

En parallèle de l'étude *in vitro* de l'immunogénicité de la Survivine face à des L_T CD4+, nous avons voulu savoir si cet Ag induisait des réponses spontanées chez les patients atteints de cancers variés. Pour répondre à cette question, des prélèvements sanguins ont été récoltés auprès de 8 patients atteints d'un cancer rénal

ou d'un cancer des poumons et de 6 donneurs sains. Dans chacun de ces échantillons, la présence de cellules T CD4+ capables de reconnaître les peptide 84-98, 90-104, 93-107, 96-110 et 128-142 a été recherchée. Pour cela, les cellules T ont été stimulées une fois *in vitro* avec l'ensemble de ces peptides, ainsi qu'avec les peptides de la grippe HA 255-270 et HA 306-318 comme contrôles positifs, avant de rechercher les cellules T CD4+ spécifiques de ces peptides par un Elispot IFN- γ . Les résultats de cette étude sont représentés dans la Figure 6 de l'article.

Une réponse T CD4+ spontanée et spécifique du peptide 84-98 a été détectée chez deux patients : un atteint d'une tumeur rénale et un autre atteint d'un cancer des poumons. A l'inverse, aucune réponse T n'a été détectée chez les individus sains.

Nous avons également vérifié l'absence de réponses spontanées chez les patients atteints de cancer ne provenait pas d'un manque d'expression de la Survivine au site de la tumeur. Pour cela, des marquages immunohistochimiques de la Survivine ont été effectués sur 2 biopsies de patients atteints d'un cancer rénal dont l'un donnait des réponses spontanées contre la Survivine et l'autre non. Dans les deux cas, une expression forte et équivalente de la Survivine a été détectée.

Comprehensive Analysis of HLA-DR- and HLA-DP4-Restricted CD4⁺ T Cell Response Specific for the Tumor-Shared Antigen Survivin in Healthy Donors and Cancer Patients¹

Xiao-Fei Wang,* Jerome Kerzerho,* Olivier Adotevi,[†] Hélène Nuytens,* Cecile Badoual,[†] Gaetan Munier,* Stéphane Oudard,[‡] Shuiping Tu,[§] Eric Tartour,[†] and Bernard Maill ere^{2*}

Because of the wide distribution of the survivin Ag in a variety of tumors, we have investigated the survivin-specific CD4⁺ T cell response in healthy donors and cancer patients. Screening of the entire sequence of survivin for HLA class II binding led to the identification of seven HLA-DR promiscuous peptides, including four HLA-DP4 peptides. All of the peptides were able to prime in vitro CD4⁺ T cells of eight different healthy donors. The peptide-specific T cell lines were stimulated by dendritic cells loaded with the recombinant protein or with the lysates of tumor cells. The high frequency of responders (i.e., immunoprevalence) was provided by a wide reactivity of multiple peptides. Six peptides were T cell stimulating in at least half of the donors and were close to CD8⁺ T cell epitopes. HLA-DR molecules were more frequently involved in T cell stimulation than were HLA-DP4 molecules, and hence immunoprevalence relies mainly on HLA-DR promiscuity in the survivin Ag. In two cancer patients a spontaneous CD4⁺ T cell response specific for one of these peptides was also observed. Based on these observations, the tumor-shared survivin does not appear to be the target of immune tolerance in healthy donors and cancer patients and is a relevant candidate for cancer vaccine. *The Journal of Immunology*, 2008, 181: 431–439.

Because of its widespread expression and its vital function in tumor cells, survivin appears as an ideal candidate for cancer immunotherapy. It is expressed during development and in proliferating cells during the G2/M phase, but it remains largely undetectable in differentiated tissue. In contrast, its expression is aberrantly elevated in most human solid malignancies, including lung, colon, breast, ovarian, renal, pancreatic, prostate, and gastric carcinomas and melanoma (1). It is also overexpressed in leukemia of various origins (1). Initially isolated as a member of the inhibitors of apoptosis protein family (2), survivin preferentially blocks mitochondrial-dependent apoptosis by interfering with the caspase pathway. It is also involved in the regulation of cell division and interacts with the spindle mitotic apparatus (3). It contributes to survival and proliferation of tumor cells. In agreement with its functions, survivin expression correlates with poor prognosis for the patients (4), while inhibition of its expression by antisense oligonucleotides induced tumor apoptosis and increased tumor sensitivity to chemotherapy (5).

Survivin-specific cytotoxic T cell response has been investigated by several groups. It was initially described for HLA-A2 donors (6, 7), and this type of study was extended to other haplotypes (8, 9). Cytotoxic response raised against survivin was demonstrated in breast cancer, leukemia, and melanoma patients (6) and was induced in vitro from PBMC derived from colorectal carcinoma (10) and leukemia patients (11). Based on these data, vaccination trials have been engaged (12–15). However, despite these immunological data and the requirement of CD4⁺ T lymphocytes to sustain cytotoxic responses (16), the CD4⁺ T cell response specific for survivin remains largely unknown (17). This response is expected to exist because spontaneous humoral response has been detected in tumor-bearing patients (18, 19) and because it can be induced in mice by using appropriate epitope vectors (20). However, because survivin is an overexpressed Ag as telomerase and P53, a status of tolerance may limit the CD4⁺ T cell response and give rise to low-affinity CD4⁺ T cells. Moreover, because it is relatively small, the CD4⁺ T cell response may be limited to particular haplotypes and hence may not be effective in all individuals. To account for the frequency of responders of an epitope or an Ag, we use the term immunoprevalence, while immunodominance is used to qualify peptides recognized in the context of the presentation of the native Ag. Clearly, a high immunoprevalence is needed for a candidate vaccine and is thought to be achieved by the presence of promiscuous HLA-DR-restricted peptides or peptides that are presented by preponderant HLA class II (HLA II)³ molecules as HLA-DP4. However, the respective roles of HLA-DR and HLA-DP4 molecules in CD4⁺ T cell responses in humans remain poorly documented. We have therefore addressed the question of whether Survivin can sustain an efficient CD4⁺ T cell

*Commissariat   l' nergie Atomique, Institut de Biologie et Technologies de Saclay, Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéine, Gif Sur Yvette; [†]EA 4054 Universit  Paris-Descartes-Ecole Nationale V t rinaire d'Alfort, Hôpital Européen Georges Pompidou, Unit  d'Immunologie Biologique et Unit  d'Anatomie Pathologique Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris; [‡]Service d'Oncologie Médicale, Hôpital Européen Georges Pompidou, EA 4054 Universit  Paris-Descartes, Paris, France; and [§]Department of Gastroenterology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, China

Received for publication November 5, 2007. Accepted for publication April 19, 2008.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by the Commissariat   l' nergie Atoand grants from l'Institut National du Cancer, Ligue Contre le Cancer du Val de Marne, Pole de Comp titivit  Ile de France: Projet Immucan, Centre d'Investigation Clinique en Bioth rapie (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), Grant EEC No. LSHC-2005-518234, "Cancer Immunotherapy".

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Bernard Maill ere, Commissariat   l'énergie Atomique, Institut de Biologie et Technologies de Saclay, Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines, Gif Sur Yvette, F-91191, France. E-mail address: bernard.maillere@cea.fr

³ Abbreviations used in this paper: HLA II, HLA class II; DC, dendritic cell; NSLC, non-small cell lung carcinoma; RCC, renal cell carcinoma; rh, recombinant human.

Table I. Binding capacities to HLA-DR and HLA-DP4 molecules of overlapping peptides from survivin^a

Peptides	Relative Activity												Bound HLA II
	DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR13	DR15	DRB3	DRB4	DRB5	DP401	DP402	
1-15	8,308	>289	>3,074	>6,140	7	>164	1,429	>6,262	>4,110	1,046	1,022	302	1
4-18	34,615	>289	>3,074	>6,140	3	62	>2,420	>6,262	>4,110	716	530	157	2
8-22	5,056	40	1,314	404	4	4	93	546	725	286	2,333	456	4
11-25	4,615	163	1,406	267	35	4	0.4	230	1,875	295	3,667	1,667	3
17-31	8	>289	288	1	24	1	0.1	>6,262	188	30	4	2	8
19-33	8	>289	18	32	15	15	2	>6,262	110	494	2	1	8
20-34	4	>289	163	667	21	4	26	>6,262	138	500	23	5	6
23-37	29	>289	163	2000	3,700	>164	>2,420	>6,262	>4,110	447	>6,773	247	1
36-50	1,581	>289	531	567	589	>164	>2,420	>6,262	1,225	496	282	126	0
41-55	842	>289	156	161	115	>164	125	667	17	442	>6,773	>3,989	1
52-66	3,154	34	688	287	10	35	54	792	>4,110	699	>6,773	200	4
56-70	495	>289	>3,074	433	35	>164	54	800	>4,110	1,538	>6,773	>3,989	2
59-73	1,800	>289	1657	300	194	>164	143	>6,262	>4,110	3,462	>6,773	>3,989	0
62-76	>22,567	>289	>3,074	>6,140	>10,034	>164	1,161	1,933	>4,110	>12,934	>6,773	>3,989	0
65-79	>22,567	>289	>3,074	>6,140	>10,034	>164	>2,420	>6,262	>4,110	>12,934	>6,773	>3,989	0
72-86	73,077	>289	>3,074	>6,140	>10,034	17	>2,420	>6,262	>4,110	477	>6,773	>3,989	1
84-98	1,028	7	543	12	1	1	15	741	49	231	10	5	8
87-101	115	>289	193	43	217	>164	121	426	346	784	216	279	1
90-104	30	>289	28	6	248	>164	134	3,200	>4,110	37	3	1	6
91-105	9	>289	41	2	248	>164	80	2,000	>4,110	19	1	1	7
93-107	99	>289	172	120	55	13	12	3,000	>4,110	69	1	3	7
96-110	14	16	44	243	1	1	12	>6,262	180	13	172	27	8
99-113	37	13	56	278	4	15	43	>6,262	550	3	4,444	>3,989	7
102-116	4,804	>289	>3,074	1,667	943	>164	>2,420	>6,262	>4,110	2	>6,773	>3,989	1
111-125	2,500	>289	>3,074	>6,140	3,000	108	1,607	>6,262	1,750	2	>6,773	>3,989	1
122-136	3,508	17	>3,074	667	33	2	43	>6,262	>4,110	58	>6,773	>3,989	5
128-142	5	30	11	58	3	>164	7	>6,262	64	141	1,444	1,333	7

^a Peptides encompassing the whole sequence of the survivin Ag were submitted to binding assays specific for HLA-DR and HLA-DP4 molecules. Reference peptides were used to validate each assay. These peptides are the nonbiotinylated forms of the biotinylated peptides used in the assay and correspond to very good binders. Data are expressed as relative activity (ratio of the IC₅₀ of the peptides to the IC₅₀ of the reference peptide) and are the means of three experiments. Good binders have a relative activity <100 and are in boldface type.

response in multiple donors and how this response is supported by the HLA II molecules.

Materials and Methods

Peptides and proteins

Overlapping peptides and biotinylated peptides were synthesized using standard 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry on an Advanced ChemTech Apex synthesizer (Advanced ChemTech Europe) and cleaved from the resin by 95% trifluoroacetic acid. If necessary, peptides were purified by reversed phase-HPLC on a C₁₈ Vydac column (Interchim). Their purity was ~90% as indicated by analytical HPLC. Peptides HA255-270 (RGYFKMRTGKSSIMRS) and HA306-318 (PKYVKQNTLKLAT) were from NeoMPS. Protein survivin (Bir5) and HIV Nef protein were produced in *Escherichia coli* as fusion proteins with the GST protein, purified on glutathione column, and separated from GST by proteolytic cleavage.

Cell transfection

The pcDNA3-survivin (pBir5⁺) (21) (20 μg) was introduced into HeLa cells (3 × 10⁶ cells) by electroporation (0.9 kV, 250 μF, 0.4-cm gap) with a Gene Pulser II (Bio-Rad). The treated cells were suspended in 40 ml of prewarmed DMEM medium with 10% fetal serum and incubated under 5% CO₂/air at 37°C. Forty-eight hours later, transfection efficacy was assessed by flow cytometry. Briefly, cells were permeabilized with 75 μl of fixation/permeabilization solution (BD Biosciences) for 20 min at 4°C and washed twice with BD Perm/Wash buffer plus 2% FCS (BD Biosciences). They were stained for 20 min on ice with anti-survivin-PE (Cell Signaling Technology) or anti-isotype control. Cell staining was assessed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

HLA II peptide binding assays

HLA-DR and HLA-DP4 molecules were immunopurified from homologous EBV cell lines by affinity chromatography using the monomeric mAbs L243 and B7/21, respectively (22-24). The binding to HLA-DR and HLA-DP4 molecules was assessed by competitive ELISA as previously

reported (22-24). Binding specificity for each HLA II was ensured by the choice of the biotinylated peptides as described previously (23, 24). Unlabeled forms of the biotinylated peptides were used as reference peptides to assess the validity of each experiment. Their sequences and IC₅₀ values were as follows: HA 306-318 (PKYVKQNTLKLAT) for DRB1*0101 (4 nM), DRB1*0401 (33 nM), DRB1*1101 (10 nM), and DRB5*0101 (8 nM); YKL (AAYAAKAAALAA) for DRB1*0701 (16 nM); A3 152-166 (EAEQLRAYLDGTGVE) for DRB1*1501 (40 nM); MT 2-16 (AK TIAYDEEARRGLE) for DRB1*0301 (340 nM); B1 21-36 (TERVR LVTRHIYNREE) for DRB1*1301 (600 nM); LOL 191-210 (ESWGVVWRIDTPDKLTGPFT) for DRB3*0101 (16 nM); E2/E168 (AGDLLAIETDKATI) for DRB4*0101 (24 nM); and Oxy 271-287 (EKKYFAATQFEPLAARL) for DPB1*0401 (15 nM) and HLA-DPB1*0402 (25 nM).

Blood samples and HLA-DR genotyping

Blood cells were collected from anonymous healthy donors at the Etablissement Français du Sang (EFS, Rungis, France) as buffy-coat preparations after informed consent and following EFS guidelines. Eight cancer patients (four renal cell carcinomas (RCC), two melanomas, two non-small cell lung carcinomas (NSLC)) were recruited at the Hôpital Européen Georges Pompidou (Paris, France). With respect to cancer patient characteristics: the four RCC patients were staged as pT2N1M0 (*n* = 2) and pT1N2M0 (*n* = 2), the NSLC patients were stage IIIB (*n* = 1) and stage IV (*n* = 1), and the two melanoma patients were classified as having stage IV metastatic melanomas. All patients were men with a mean age of 58 years. These cancer patients were not treated by any immunomodulator before blood collection. This study was conducted in accordance with French laws and after approval by the local ethics committee. PBMC were isolated by density centrifugation on Ficoll-Hyperpaque gradients (Sigma-Aldrich). HLA-DR genotyping was performed by using the Olerup SSP DRB1 typing kit.

Generation of Ag-specific T cell lines from healthy donors

Monocyte-derived dendritic cells (DC) were generated from plastic-adherent cells of PBMC after 5-7 days of culture in AIM V medium (Invitrogen) supplemented with 1000 U/ml of recombinant human (rh)IL-4 and of

rhGM-CSF (Tebu). Immature DC were collected at day 5 or 6. Mature DC were generated after addition of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LPS (Sigma-Aldrich). CD4^+ T lymphocytes were isolated from nonadherent phase by positive selection using an anti- CD4 mAb coupled to magnetic microbeads (Miltenyi Biotec) and by magnetic cell sorting, as recommended by the manufacturer. Mature DC (5×10^5) were incubated at 37°C , 5% CO_2 , for 4 h in 1 ml complete IMDM medium containing a mixture of survivin peptides, with each peptide being at a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Pulsed cells were washed and added at 10^4 per round-bottom microwell to 10^5 autologous CD4^+ lymphocytes in 200 μl IMDM supplemented by 1000 U/ml of IL-6 (R&D Systems) and 10 ng/ml IL-12 (R&D Systems). The CD4^+ T lymphocytes were restimulated on days 7, 14, and 21 with autologous DC freshly loaded with the survivin peptides and were grown in complete IMDM medium supplemented with 10 U/ml IL-2 (R&D Systems) and 5 ng/ml IL-7 (R&D Systems). Flow cytometry analysis confirmed that growing cells were CD4^+ T lymphocytes. Specificity of the T cell lines was investigated by IFN- γ ELISPOT assays at days 28 and 29 as described previously (25). APCs were autologous PBMC, or autologous immature DC or L cells transfected with HLA II molecules (26). For statistical evaluation, a *t* test was used. Values of *p* < 0.05 were considered significant.

Assessment of survivin-specific T cell response in cancer patients

PBMC were cultured for 6 days at 2×10^6 cells/ml in 2 ml per well with complete RPMI medium supplemented with 10% FCS. In each well, a pool of viral hemagglutinin or survivin peptides was added at a concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. On day 2 after the beginning of the culture, IL-2 (Chiron) was added at 20 IU/ml in standard conditions. After 6 days of culture, the ELISPOT assay was performed using peptide-pulsed PHA-activated cells as APCs as described previously (27). Briefly, PHA-activated cells were obtained by a culture of autologous PBMC in RPMI 1640 medium containing 10% FCS and supplemented with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA-P (Sigma-Aldrich). At day 3, IL-2 (20 IU/ml) and IL-7 (10 ng/ml) were added to the culture. At day 6, PHA-activated cells were fixed with 1% PFA for 30 min at 4°C , washed three times with PBS, and pulsed for 2 h at 37°C with the various peptides at 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in serum-free medium (AIM V medium). Ninety-six-well polyvinylidene difluoride plates (Millipore) were coated with 100 μl capture anti-human IFN- γ mAb (Diacclone) and incubated overnight at 4°C . The plates were then saturated with 2% skimmed milk and incubated for 2 h at room temperature. Effector cells (10^5) and PHA-activated T cells (5×10^4) pulsed with the peptides were added to triplicate wells at 10^5 cells/well in AIM V medium for 20 h at 37°C in 5% CO_2 . At the end of incubation, cells were washed and the second biotinylated anti-IFN- γ mAb (Diacclone) was added to the plate for 90 min at 37°C , followed by streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (Diacclone) for 1 h at 37°C and by NBT/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate toluidine mix (Diacclone) as substrate. Spots were counted using an automated stereomicroscope (Zeiss). The number of specific T cells expressed as spot-forming cells/ 10^5 cells was calculated after subtracting negative control values (background). Cells incubated with medium alone or PMA (100 ng/ml) (Sigma-Aldrich) and ionomycin (10 μM) (Sigma-Aldrich) were used as negative and positive controls, respectively.

Immunofluorescence staining

Formalin-fixed paraffin-embedded surgical specimens of two clear cell renal carcinomas were studied. Samples were sectioned at 4–6 μm with a cryostat, deparaffinized in xylene, rehydrated in graded alcohol, and equilibrated in PBS. Slides were treated with avidin/biotin blocker (Vector Laboratories) and 3% hydrogen peroxide and the Fc receptor was blocked by human serum (5%). Slides were then stained with a survivin-specific (Santa Cruz Biotechnology) or with a nonspecific rabbit polyclonal Ab and incubated overnight at 4°C . After washes, the slides were incubated with biotinylated donkey anti-rabbit (Vector Laboratories) and streptavidin-horse-radish peroxidase. The 3,3'-diaminobenzidine was used as a chromogen (DakoCytomation). The various Abs were diluted in PBS.

Results

Survivin peptides bind to multiple HLA-DR and HLA-DP4 molecules

A set of 27 peptides encompassing the whole sequence of the tumor-shared Ag Survivin were synthesized and submitted to binding assays specific for preponderant HLA-DR and HLA-DP4 molecules (Table I). These assays included the seven most commonly expressed alleles encoded by the HLA-DRB1 genes (i.e., DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301, and DRB1*

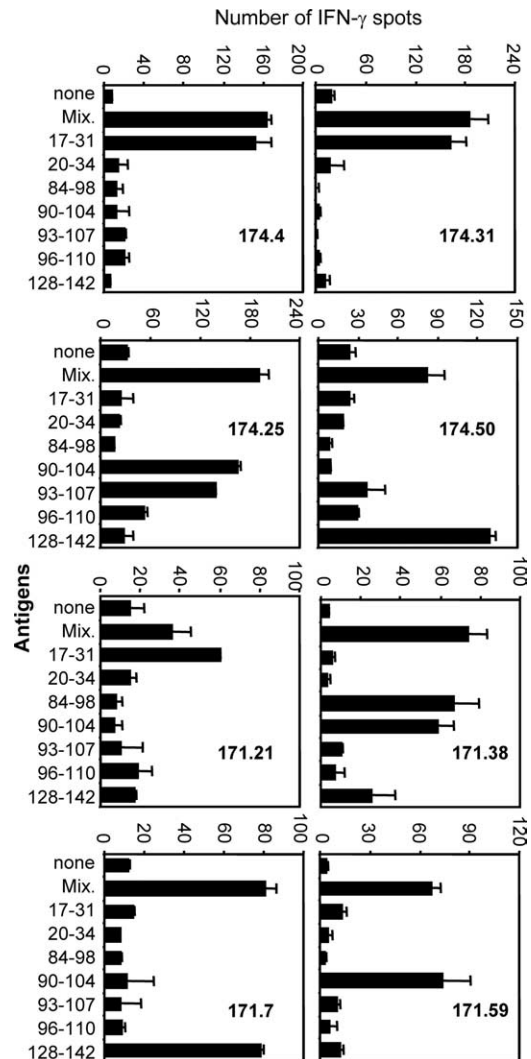


FIGURE 1. Peptide specificity of T cell lines obtained from healthy donors 171 and 174. CD4^+ T cell lines from two healthy donors (patients 171 and 174) were obtained after 3 weekly stimulations by autologous mature DC loaded with a mixture of seven selected peptides (17–31, 20–34, 84–98, 90–104, 93–107, 96–110, and 128–142). The specificity of the T cell lines was assessed by IFN- γ ELISPOT. T lymphocytes (10^4) were incubated in duplicate with 10^5 autologous PBMC in the presence or absence of peptides. Spot staining was done after a 24-h incubation.

1501). Eighty-five percent of people in the United States and Europe possess at least one of these molecules. They also included the main second HLA-DR molecules (DRB3*0101, DRB4*0101, and DRB5*0101) and the two HLA-DP4 molecules, which are carried by ~76% percent of Caucasian individuals. To optimize the binding capacity of the peptides, the overlaps were selected so that the peptides contained an aliphatic or aromatic residue in positions 1–5 in agreement with the binding specificity of HLA-DR and HLA-DP4 molecules (24, 28, 29). The data were presented as relative affinities to easily compare their binding properties to high-binder peptides that we used as references. An upper threshold of relative activity of 100 indicated that active peptides were at most 100 \times less efficient at binding to HLA II molecules than were high-binder peptides. As shown in Table I, some peptides are allele-specific, as exemplified by the peptides 1–15 and 4–18 that bound to DR11 or the peptide 41–55 that bound to DRB4. More interestingly, three regions in the survivin sequence (17–34, 84–113, and 122–142) contained peptides with a broad binding specificity for HLA-DR and HLA-DP4 molecules.

Table II. Capacity of the seven selected peptides to induce peptide-specific T cell lines^a

Donors	HLA II Typing			No. of Peptide-Specific T Cell Lines						
	DRB1	Second DR	DPB1	17-31	20-34	84-98	90-104	93-107	96-110	128-142
P169	1502	DRB5	0402	0	0	0	1	1	12	0
P171	0101, 0401	DRB4	0401	2	1	3	3	0	0	7
P174	0701, 1501	DRB4, DRB5	0401	10	0	0	3	2	1	1
P179	0701, 1301	DRB4, DRB3	— ^b	1	0	2	2	0	2	4
P187	0701, 0401	DRB4	— ^b	4	6	0	1	0	2	1
P188	1101	DRB3 ^c	0401	1	2	3	7	3	1	0
P180	0101, 1101	DRB3 ^c	0401	0	0	3	2	2	1	1
P241	1301, 16	DRB3, DRB5	— ^b	10	0	0	0	1	4	3
Total				28	9	11	19	9	23	17
Responder frequency				5/8	3/8	4/8	7/8	4/8	7/8	6/8

^a T cell lines were derived from seven HLA II unrelated healthy donors. Their peptide specificity was evaluated by ELISPOT as described in Fig. 1.

^b Not HLA-DP4.

^c DRB3*0202, which is different from DRB3 (DRB3*0101).

Eight peptides located in these peptide regions bound to at least one of the HLA-DP4 molecules. Most of them bound to both molecules, in agreement with their very similar binding motifs (24). They also exhibited a good capacity to bind to HLA-DR molecules and bound to five to seven HLA-DR molecules. For example, the peptide 17-31 bound to six HLA-DR molecules (DR1, DR7, DR11, DR13, DR15, and DRB5) and the two DP4 molecules, while the peptide 84-98 is also a binder for six HLA-DR molecules (DR3, DR7, DR11, DR13, DR15, and DRB4) and the two HLA-DP4 molecules. Additionally, peptide 128-142 did not bind to HLA-DP4 but bound to seven different HLA-DR molecules (DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR15, and DRB4). As a result, we retained seven peptides (17-31, 20-34,

84-98, 90-104, 93-107, 96-110, and 128-142) on the basis of their wide specificity for the HLA II molecules and the coverage of the sequence of the survivin Ag.

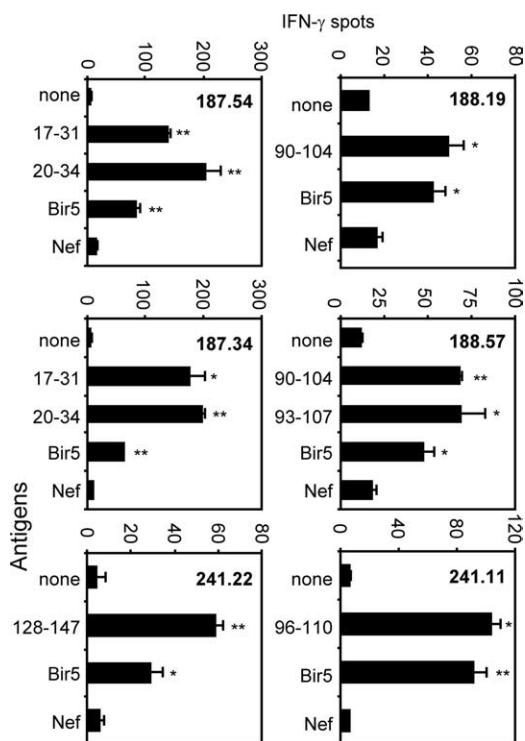


FIGURE 2. Presentation of the recombinant protein survivin to peptide-specific T cell lines. Peptide-specific T cell lines were obtained from two healthy donors (187 and 188). The protein survivin (Bir5) and HIV Nef protein were incubated at 1–3 μ M for 4 h with immature autologous DC. After washings, DC (10^4) were incubated with T lymphocytes. T lymphocyte response was evaluated by IFN- γ ELISPOT. Each bar represents the mean spot number of duplicates \pm SD. **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

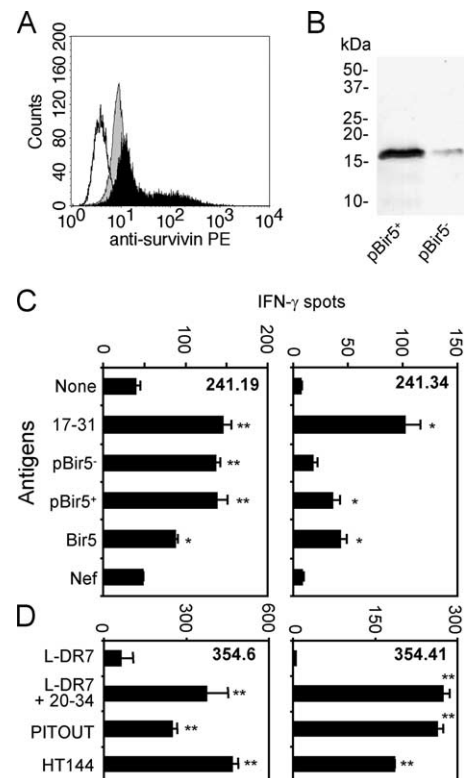


FIGURE 3. Stimulation of peptide-specific T cell lines by immature DC loaded with tumor lysates. *A*, HeLa cells were transfected with the survivin gene. Expression level of survivin was evaluated by flow cytometry after intracellular staining using a survivin-specific Ab. Black, surviving-transfected HeLa; gray, untransfected HeLa; open, isotype control of the transfected HeLa cells. *B*, Cell lysates were obtained by five rapid freeze-thaw cycles in AIM V medium. Survivin content was evaluated by Western blot using survivin-specific Abs. *C*, Immature DC (0.5 M/ml) were pulsed for 4 h with the tumor lysates (equivalent to 2.5 M/ml) of survivin-transfected HeLa (pBir5⁺) or untransfected cells (pBir5⁻) or pulsed with the recombinant proteins Bir5 and Nef at 3 μ M. T cell lines (241.19 and 241.34) were incubated with 5000 pulsed DC for 24 h and subsequently submitted to IFN- γ ELISPOT assay. *D*, HLA-DR7-transfected murine L cells (L-DR7), HLA-DR7⁺ EBV (PITOUT), and melanoma (HT144) cell lines were incubated (30,000 cells/well) with 20-34 specific T cell lines (354.6 and 354.41). T cell activation was revealed by IFN- γ ELISPOT assay. **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

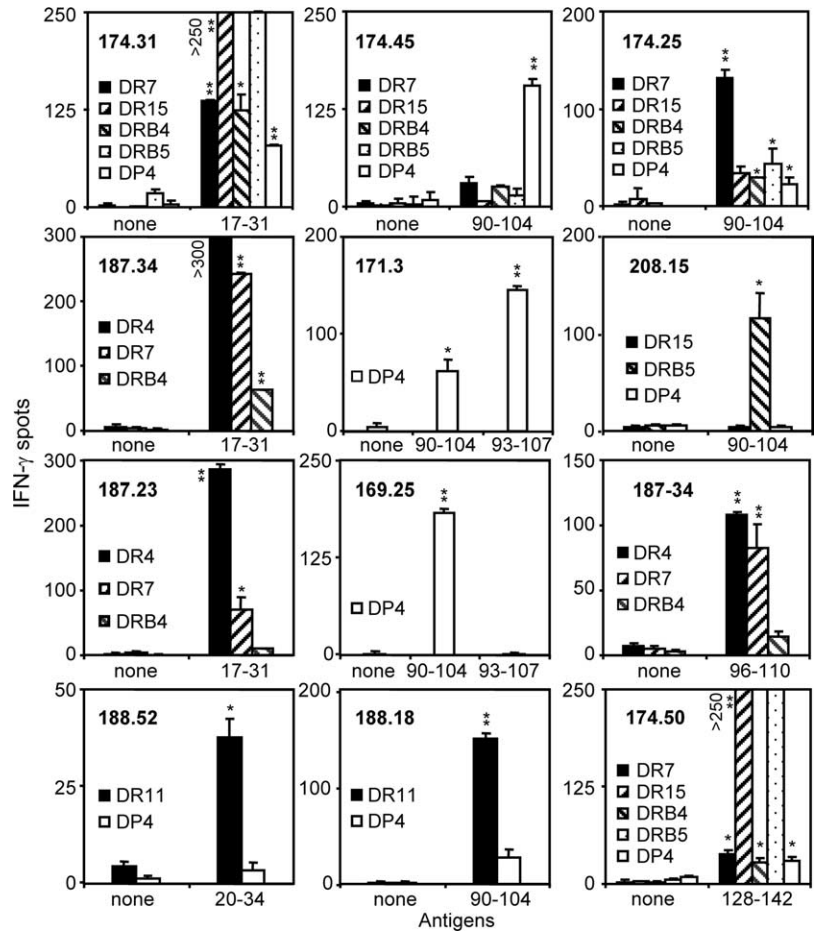


FIGURE 4. HLA-DR and HLA-DP4 restriction of peptide-specific T cell lines. T lymphocyte response was evaluated by IFN- γ ELISPOT. Approximately 10^4 T lymphocytes were incubated in duplicate with 3×10^4 L cells transfected with either an HLA-DR or HLA-DP4 molecules in the presence or absence of the appropriate peptide. Omission of the transfected L cells gave rise to a reduced number of spots (not shown). Each bar represents the mean spot number of duplicates \pm SD. **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

The seven selected peptides induce peptide-specific CD4⁺ T cell lines in HLA II unrelated healthy donors

The capacity of the seven peptides to prime CD4⁺ T cells harvested from healthy donors was evaluated as previously described (25). CD4⁺ T cells were seeded in 96-well plates and stimulated weekly by mature DC loaded with the mixture of the peptides. Their peptide specificity was evaluated by IFN- γ ELISPOT using autologous PBMC as APCs. Fig. 1 shows eight T cell lines derived for healthy donors 171 and 174. Among 60 seeded wells per donors, 12 and 13 peptide-specific T cell lines were discovered for donors 171 and 174, respectively, suggesting that they derived from few T cell precursors, which have been amplified by the weekly restimulation. Accordingly, the T cell lines were generally specific for either a unique peptide or for two overlapping peptides, suggesting that they are specific for the common part of the two peptides. A total of eight healthy donors were recruited and possessed the most frequently encountered HLA-DR alleles, except for DR3 (Table II). Five donors possessed the HLA-DP4 molecules, in agreement with the high frequency of this molecule in the Caucasian population. Although the panel of donors contains multiple HLA II haplotypes, all the peptides induced specific T cell lines in a minimum of three donors. Peptide 17–31 induced 28 T cell lines, 20–34, 9; 84–98, 11; 90–104, 19; 93–107, 9; 96–110, 23; and 128–142, 14 lines. Peptides 90–104 and 96–110 were stimulating in almost all of the donors, while peptides 17–31 and 128–142 induced T cell lines in five and six donors, respectively. Further characterization was performed depending on the quantity of T cells remaining from the microculture.

Peptide-specific T cell lines are stimulated by the survivin protein and tumor lysates presented by immature DC

We evaluated the capacity of eight peptide-specific T cell lines from two different donors to recognize the native protein. As shown in Fig. 2, two T cell lines (187.54 and 187.34) specific for the 17–31 and 20–34 peptides reacted specifically with autologous DC previously loaded with the recombinant survivin protein. They were not, however, stimulated by unloaded DC and by DC fed with the recombinant HIV Nef protein. Similarly, T cell lines 188.19, 188.57, 241.22, and 241.11, which were specific for peptides 90–104, 93–107, 128–142, and 96–110, respectively, specifically recognized the survivin protein. We also investigated the presentation of tumor cell lysates by immature DC to two peptide-specific T cell lines (Fig. 3). All the tumor cell lines we investigated expressed at least a low level of survivin, as shown for the HeLa cells by FACS (Fig. 3A) and Western blot (Fig. 3B). We therefore modulated the level of expression of survivin by using HeLa cells transfected with survivin gene or untransfected. As shown Fig. 3A, survivin is ~ 10 -fold more expressed in the transfected cells as compared with untransfected ones. The 17–31-specific T cell line 214.34 was specifically stimulated by immature DC loaded with the protein survivin and by tumor lysates of transfected HeLa cells (Fig. 3C). It was not, however, stimulated by the HIV Nef protein or by the untransfected cells, demonstrating the specificity of the stimulation and that the level of endogenously expressed survivin was insufficient to stimulate the T cell line. In contrast, the T cell line 214.19 was stimulated by the immature DC loaded with the survivin protein and with tumor lysates produced by transfected and untransfected HeLa cells, but not by the DC

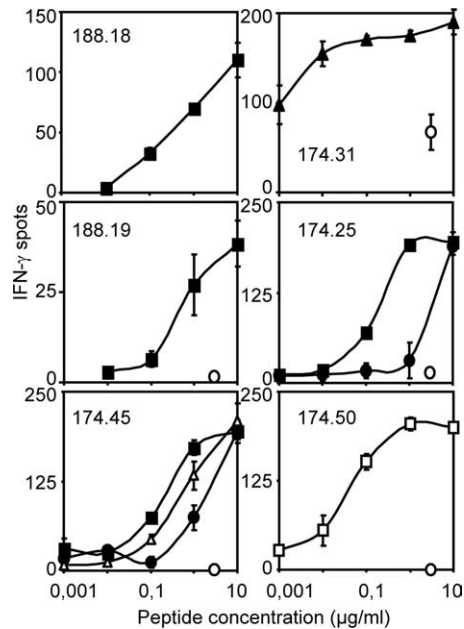


FIGURE 5. Dose response of peptide-specific T cell lines. CD4⁺ T cell lines (188.18, 188.19, 174.45, 174.31, 174.25, and 174.50) were incubated in duplicate with 10⁵ autologous PBMC and a dose range of appropriate peptides for 24 h. The specificity of the T cell lines was assessed by IFN- γ ELISPOT: 17–31 (\blacktriangle), 90–104 (\blacksquare), 93–107 (\bullet), 96–110 (\triangle), 128–142 (\square), no peptide (\circ).

alone or by the DC loaded with the HIV Nef protein. Finally, two HLA-DR7-restricted T cell lines specific for the peptide 20–34 were stimulated by the HLA-DR-matched EBV cell line PITOUT and melanoma cells HT144, although the murine L cells transfected by HLA-DR7 were not recognized unless they were loaded with the peptide 20–34 (Fig. 3D). We concluded from these experiments that the peptides 17–31, 90–104, 93–107, 96–110, and 128–142 are appropriately processed by immature DC loaded with the native protein, while at least the peptide 20–34 is naturally presented by tumor cells. We also observed that the endogenous level of survivin expression could be sufficient to stimulate CD4⁺ T lymphocytes.

Survivin peptides are presented to CD4⁺ T cell lines by multiple HLA-DR and HLA-DP4 molecules

As the seven selected peptides bound to multiple HLA II molecules, HLA II restriction molecules supporting the peptide-specific T cell stimulation was evaluated for 19 T cell lines using L cells transfected by HLA-DR or DP4 molecules. Data presented in Fig. 4 are from 12 of them. T cell lines were mostly stimulated by their corresponding peptide presented by only one HLA II molecule, but degenerate recognition was also observed as shown for the 174.31 and 187.50 T cell lines. In both cases, DR15 and DRB5 molecules emerged as the most stimulating, suggesting that these molecules have contributed to T cell priming. However, significant presentation by other molecules (DR7, DRB4, and DP4) was also observed. A given donor can develop a peptide-specific T cell response using two different restriction elements, as exemplified by the T cell lines 174.45 and 174.25, which recognized the peptide 90–104 presented by HLA-DP4 and HLA-DR7, respectively. As a result, we observed the presentation to T cells of the peptide 17–31 by HLA-DR7, DR15, DRB4, DRB5, and DP4; 20–34 by DR4, DR7, DR11, and DP4; 90–104 by DR7, DR11, DR15, DRB4, DRB5, and DP4; 93–107 by DR11 and DP4; 96–110 by DR4, DR7 and

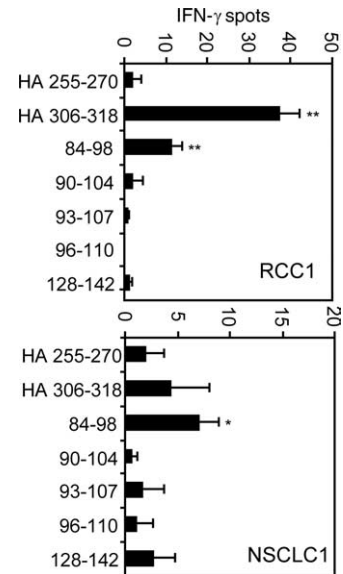


FIGURE 6. Peptide specificity of T lymphocytes collected in cancer patients. Donors RCC1 and NSCLC1 were RCC and NSLC patients, respectively. Peptide reactivity of the T cells was evaluated by IFN- γ ELISPOT after 1 wk in vitro stimulation with the peptides as described in *Materials and Methods*. Each bar represents the mean spot number of triplicates \pm SD. **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

DP4; and 128–142 mainly by DR15 and DRB5. Finally, peptide concentration was evaluated for eight different T cell lines specific for 17–31, 90–104, 93–107, 96–110, or 128–142 (Fig. 5). Midstimulation was reached at a concentration < 0.1 $\mu\text{g/ml}$ for all the peptides, except for peptide 93–107. This indicated an efficient avidity of specific T cell lines against survivin-derived peptides.

T cell antigenicity of survivin peptides in cancer patients

Spontaneous response to survivin peptides was investigated in eight different cancer patients and six healthy donors. None of the healthy donors gave rise to peptide-specific stimulation (data not shown). In contrast, a specific T cell response was detected for the 84–98 peptide in two patients, one with renal cancer and the other with NSLC (Fig. 6). This response appears relatively weak but is in the order of magnitude of that seen for the Flu peptides (HA

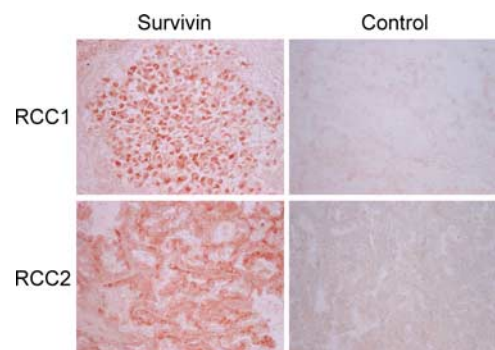


FIGURE 7. Survivin expression in RCC tumors from two patients tested for the presence of anti-survivin CD4⁺ T cells. RCC tumors were stained with anti-survivin Ab (*left*) or negative control Ab (*right*). RCC1 corresponds to the one patient with detection of anti-survivin CD4⁺ T cells, whereas RCC2 corresponds to one patient with no anti-survivin CD4⁺ T cell detection.

255–270 and HA 306–318). At least in these two donors, we therefore observed a spontaneous CD4⁺ T cell response to one survivin peptide, namely 84–98. We had access to the tumor biopsy of one of the responding RCC patients and of another non-responding RCC patients. High levels of survivin expression were observed in both cases (Fig. 7).

Discussion

Although survivin is a small and overexpressed tumor Ag (1), we show herein that it is able to generate a CD4⁺ T cell response in various healthy individuals and cancer patients. This response involves CD4⁺ T cell epitopes restricted to multiple HLA II alleles and is mainly supported by HLA-DR molecules.

Survivin is one of the rare tumor Ags expressed in a large number of tumors of various types (1). It contributes to the resistance of tumor cells to apoptosis (2) and is involved in their proliferative capacity (3). It is not, however, completely absent from normal cells and hence could lead to T cell tolerance. Because the survivin-specific CD4⁺ T cell response, which is required to sustain the tumor-specific cytotoxic response, is poorly documented (17), we characterized this response in multiple donors. Seven peptides were able to prime CD4⁺ T lymphocytes in a specific manner and were clustered in three different sequence regions, namely 17–34, 84–110, and 128–142. Three main properties characterize T cell epitopes for vaccine purposes, namely immunodominance, immunoprevalence, and hierarchy. As defined for protein immunization (30) and viral infection (31), immunodominant T cell epitopes are *sensu stricto* recognized in the context of priming with the native Ag and hence are generated by the processing of the native Ags. As T cell lines had been primed with peptides, we only assessed *in vitro* the appropriate presentation of the native Ag. Peptides 17–31, 90–104, 93–107, 96–110, and 128–142 appeared appropriately processed by immature DC loaded with the native protein. Two T cell lines specific for the peptide 17–31 were stimulated by immature DC loaded with the lysate of survivin-transfected cells, while one was stimulated by the lysate of untransfected cells, suggesting that endogenous expression of survivin could be sufficient for CD4⁺ T cell presentation. Two peptide 20–34-specific T cell lines directly recognized HLA-DR matched tumor cells, suggesting that at least the peptide 20–34 is presented by the tumor cell lines. Finally, a spontaneous response in two cancer patients involved the peptide 84–98, confirming its *in vivo* presentation.

We then investigated the immunoprevalence of the T cell epitopes. Immunoprevalence corresponds to the frequency of responders and was evaluated in eight different donors. As shown in Table II, all the peptides exhibited a good immunoprevalence, as they were all stimulating in at least half of the donors. Two peptides (90–104 and 96–110) primed specific T cell lines in almost all of the individuals. Relatively few peptides with such high immunoprevalence have been described in tumor Ags (26, 32, 33) and in viral or bacterial Ags (25, 34–36). This emphasizes the interest of these peptides for vaccine purposes. Finally, we observed a different hierarchy between the defined epitopes for each healthy donor. Epitope hierarchy is documented by the proportion of the total response produced by one epitope and defined major (>30% of the response) and minor epitopes. For instance, for donor P169, the response was dominated by peptide 96–110, which gave rise to 85% of the generated T cell lines, while peptides 90–104 and 93–107 were minor epitopes for this donor. In contrast, peptide 96–110 became a minor epitope for donor P174, and the major epitope was peptide 17–34. Major epitopes are therefore carried by different peptides and, as suggested by recent investi-

gations in mice, may result from size variation of the naive precursor repertoire (37). Variation in epitope hierarchy was also reported in vaccinated donors (38). Altogether, we suggest introducing in a peptide vaccine at least the peptides 17–31, 90–104, 96–110, and 128–142, which are major epitopes and hence are expected to elicit a strong response in each donor. We do not propose to limit the composition of the vaccine to the most immunoprevalent peptides (90–104 and 96–110). These peptides induce a response in most donors, but may recruit a relatively low number of T cells in some donors. Their combination with the peptides 17–31 and 128–142 is expected to induce a better T cell response.

We also analyzed the restriction of peptide-specific T cell lines to identify the main HLA II molecules implicated in these responses. High immunoprevalence of T cell epitopes may result from a wide specificity for HLA-DR molecules or from the capacity to bind a preponderant molecule as HLA-DP4 (24). HLA-DP4 is present in ~76% of Caucasian individuals and covers approximately the same proportion of the population as six HLA-DR molecules. Four peptides in the survivin Ag bound to HLA-DP4 molecules, while seven peptides including them were retained because of their promiscuity for HLA-DR molecules. In contrast to our previous observations with HIV Ags (39) and the MAGE-A1 tumor Ag (40), survivin-specific T cell epitopes restricted to HLA-DP4 induce few T cell lines and do not appear strongly immunogenic. CD4⁺ T cell response to survivin is essentially HLA-DR restricted, as similarly observed for the NY-ESO-1 Ag (26, 32, 33), although this Ag also contains HLA-DP4-restricted epitopes (32, 41). As a result, immunoprevalence of the survivin-specific CD4⁺ T cell response mainly relies on HLA-DR promiscuity as compared with HLA-DP4. One interesting issue would be to evaluate the role of HLA-DQ molecules, especially as these molecules exhibited different peptide specificity with respect to HLA-DR and HLA-DP4 molecules (42, 43).

Because of its expression during the cell cycle of normal cells, survivin is not exclusively expressed in tumor cells. This low level of expression may induce tolerance by deletion of the efficient Tcr clonotype (44), as shown for P53 Ag (45). However, our data do not support the existence of tolerance induction against survivin in normal donors and cancer patients. Indeed, we observed that all of the healthy donors responded to at least one of the identified peptides, although they exhibited a variety of HLA II molecules. Moreover, the dose response of the T cell lines revealed a good efficiency in recognizing the peptides and thus suggested that clonotypes of high affinity for survivin were not negatively selected. In two of eight cancer patients, we detected a spontaneous CD4⁺ T cell response specific for one survivin peptide, while this spontaneous response was absent in healthy donors. At least in these two cancer patients, survivin produced by the tumor seems to elicit a response and not a tolerance status. Accordingly, spontaneous humoral (18, 19) and cytotoxic responses (46) raised against survivin have been reported. These observations therefore suggest that the basal level of survivin in normal cells is not enough to provoke tolerance, while its overexpression in tumor cells could lead to specific T cell priming, as has been previously shown for cancer germ line Ags such as NY-ESO-1 (33) and TRAG (47).

CD8 T cell response specific for survivin have been investigated in several studies, especially for HLA-A2 patients. Two HLA-A2-restricted T cell epitopes have been delineated, namely 5–14 and 96–104 (6, 7), while peptide 80–88 and peptides 46–54 and 51–59 have been identified as CD8⁺ T cell epitopes restricted by HLA-24 (8) and HLA-B35 (9), respectively. Of note is the proximity of these epitopes to the CD4⁺

T cell epitopes we report in this study. Peptide 96–104 is encompassed by 90–104 and 96–110 immunoprevalent CD4⁺ T cell epitopes, which are therefore able to elicit both CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses, as shown for other combinations of T cell epitopes (41). We have also confirmed the priming capacity of peptide 5–14 and have derived six T cell lines from three independent healthy donors (data not shown). We demonstrated their capacity to recognize HLA-A2⁺ tumor cell lines, although this has not been previously shown (6). Besides the 90–104 and 96–110 sequences, we therefore propose as vaccine candidates the 5–31 and 5–34 peptides, as they also advantageously combine CD8⁺ and CD4⁺ T cell epitopes.

In conclusion, our work demonstrates the efficiency of peptides in eliciting a CD4⁺ T cell response specific for survivin, showing their immunodominance, immunoprevalence, and proximity to CD8⁺ T cell epitopes. We also show that HLA-DR promiscuity rather than specificity for HLA-DP4 molecules supports their priming capacity in multiple donors. Considering the wide distribution of survivin in tumor cells, this work contributes to the design of new peptide vaccines against various cancers.

Acknowledgments

We thank Olivia Hababou for technical assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Li, F. 2003. Survivin study: what is the next wave? *J. Cell. Physiol.* 197: 8–29.
- Ambrosini, G., C. Adida, and D. C. Altieri. 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* 3: 917–921.
- Li, F., G. Ambrosini, E. Y. Chu, J. Plescia, S. Tognin, P. C. Marchisio, and D. C. Altieri. 1998. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396: 580–584.
- Adida, C., C. Haioun, P. Gaulard, E. Lepage, P. Morel, J. Briere, H. Dombret, F. Reyes, J. Diebold, C. Gisselbrecht, et al. 2000. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 96: 1921–1925.
- Olie, R. A., A. P. Simoes-Wüst, B. Baumann, S. H. Leech, D. Fabbro, R. A. Stahel, and U. Zangemeister-Wittke. 2000. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res.* 60: 2805–2809.
- Schmitz, M., P. Diestelkoetter, B. Weigle, F. Schmachtenberg, S. Stevanovic, D. Oeckert, H. G. Rammensee, and E. P. Rieber. 2000. Generation of survivin-specific CD8⁺ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.* 60: 4845–4849.
- Andersen, M. H., L. O. Pedersen, J. C. Becker, and P. T. Straten. 2001. Identification of a cytotoxic T lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein survivin in cancer patients. *Cancer Res.* 61: 869–872.
- Hirohashi, Y., T. Torigoe, A. Maeda, Y. Nabeta, K. Kamiguchi, T. Sato, J. Yoda, H. Ikeda, K. Hirata, N. Yamanaka, and N. Sato. 2002. An HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope of a tumor-associated protein, survivin. *Clin. Cancer Res.* 8: 1731–1739.
- Reker, S., J. C. Becker, I. M. Svane, E. Ralfkiaer, P. T. Straten, and M. H. Andersen. 2004. HLA-B35-restricted immune responses against survivin in cancer patients. *Int. J. Cancer* 108: 937–941.
- Casati, C., P. Dalerba, L. Rivoltini, G. Gallino, P. Deho, F. Rini, F. Belli, D. Mezzanzanica, A. Costa, S. Andreola, et al. 2003. The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 63: 4507–4515.
- Schmidt, S. M., K. Schag, M. R. Müller, M. M. Weck, S. Appel, L. Kanz, F. Grunebach, and P. Brossart. 2003. Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. *Blood* 102: 571–576.
- Fuessel, S., A. Meye, M. Schmitz, S. Zastrow, C. Linne, K. Richter, B. Lobel, O. W. Hakenberg, K. Hoelig, E. P. Rieber, and M. P. Wirth. 2006. Vaccination of hormone-refractory prostate cancer patients with peptide cocktail-loaded dendritic cells: results of a phase I clinical trial. *Prostate* 66: 811–821.
- Nagaraj, S., V. Pisarev, L. Kinarsky, S. Sherman, C. Muro-Cacho, D. C. Altieri, and D. I. Gabrilovich. 2007. Dendritic cell-based full-length survivin vaccine in treatment of experimental tumors. *J. Immunother.* 30: 169–179.
- Otto, K., M. H. Andersen, A. Eggert, P. Keikavoussi, L. O. Pedersen, J. C. Rath, M. Bock, E. B. Brocker, P. T. Straten, E. Kampgen, and J. C. Becker. 2005. Lack of toxicity of therapy-induced T cell responses against the universal tumour antigen survivin. *Vaccine* 23: 884–889.
- Wobser, M., P. Keikavoussi, V. Kunzmann, M. Weininger, M. H. Andersen, and J. C. Becker. 2006. Complete remission of liver metastasis of pancreatic cancer under vaccination with a HLA-A2 restricted peptide derived from the universal tumor antigen survivin. *Cancer Immunol. Immunother.* 55: 1294–1298.
- Toes, R. E., F. Ossendorp, R. Offringa, and C. J. Melief. 1999. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J. Exp. Med.* 189: 753–756.
- Piesche, M., Y. Hildebrandt, F. Zettl, B. Chapuy, M. Schmitz, G. Wulf, L. Trumper, and R. Schroers. 2007. Identification of a promiscuous HLA DR-restricted T-cell epitope derived from the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Hum. Immunol.* 68: 572–576.
- Meghiorino, R., F. D. Shi, X. X. Peng, X. Wang, E. K. Chan, E. M. Tan, and J. Y. Zhang. 2005. Autoimmune response to anti-apoptotic protein survivin and its association with antibodies to p53 and c-myc in cancer detection. *Cancer Detect. Prev.* 29: 241–248.
- Rohayem, J., P. Diestelkoetter, B. Weigle, A. Oehmichen, M. Schmitz, J. Mehlhorn, K. Conrad, and E. P. Rieber. 2000. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients. *Cancer Res.* 60: 1815–1817.
- Charalambous, A., M. Oks, G. Nchinda, S. Yamazaki, and R. M. Steinman. 2006. Dendritic cell targeting of survivin protein in a xenogeneic form elicits strong CD4⁺ T cell immunity to mouse survivin. *J. Immunol.* 177: 8410–8421.
- Tu, S. P., X. H. Jiang, M. C. Lin, J. T. Cui, Y. Yang, C. T. Lum, B. Zou, Y. B. Zhu, S. H. Jiang, W. M. Wong, et al. 2003. Suppression of survivin expression inhibits in vivo tumorigenicity and angiogenesis in gastric cancer. *Cancer Res.* 63: 7724–7732.
- Texier, C., S. Pouvellé, M. Busson, M. Herve, D. Charron, A. Menez, and B. Maillere. 2000. HLA-DR restricted peptide candidates for bee venom immunotherapy. *J. Immunol.* 164: 3177–3184.
- Texier, C., S. Pouvellé-Moratille, M. Busson, D. Charron, A. Menez, and B. Maillere. 2001. Complementarity and redundancy of the binding specificity of HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 and -DRB5 molecules. *Eur. J. Immunol.* 31: 1837–1846.
- Castelli, F. A., C. Buhot, A. Sanson, H. Zarour, S. Pouvellé-Moratille, C. Nonn, H. Gahery-Segard, J. G. Guillet, A. Menez, B. Georges, and B. Maillere. 2002. HLA-DP4, the most frequent HLA II molecule, defines a new supertype of peptide-binding specificity. *J. Immunol.* 169: 6928–6934.
- Castelli, F. A., M. Leleu, S. Pouvellé-Moratille, S. Farci, H. M. Zarour, M. Andrieu, C. Auriault, A. Menez, B. Georges, and B. Maillere. 2007. Differential capacity of T cell priming in naive donors of promiscuous CD4⁺ T cell epitopes of HCV NS3 and core proteins. *Eur. J. Immunol.* 37: 1513–1523.
- Zarour, H. M., B. Maillere, V. Brusic, K. Coval, E. Williams, S. Pouvellé-Moratille, F. Castelli, S. Land, J. Bennouna, T. Logan, and J. M. Kirkwood. 2002. NY-ESO-1 119–143 is a promiscuous major histocompatibility complex class II T-helper epitope recognized by Th1- and Th2-type tumor-reactive CD4⁺ T cells. *Cancer Res.* 62: 213–218.
- Godard, B., A. Gazagne, A. Gey, M. Baptiste, B. Vingert, B. Pegaz-Fiornet, L. Strompf, W. H. Fridman, D. Glotz, and E. Tartour. 2004. Optimization of an elispot assay to detect cytomegalovirus-specific CD8⁺ T lymphocytes. *Hum. Immunol.* 65: 1307–1318.
- Rammensee, H. G., T. Friede, and S. Stevanovic. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41: 178–228.
- Sturniolo, T., E. Bono, J. Ding, L. Radrizzani, O. Tuereci, U. Sahin, M. Braxenthaler, F. Gallazzi, M. P. Protti, F. Sinigaglia, and J. Hammer. 1999. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat. Biotechnol.* 17: 555–561.
- Gammon, G., N. Shastri, J. Cogswell, S. Wilbur, S. Sadegh-Nasseri, U. Krzych, A. Miller, and E. Sercarz. 1987. The choice of T-cell epitopes utilized on a protein antigen depends on multiple factors distant from, as well as at the determinant site. *Immunol. Rev.* 98: 53–73.
- Assarson, E., J. Sidney, C. Oseroff, V. Pasquetto, H. H. Bui, N. Frahm, C. Brander, B. Peters, H. Grey, and A. Sette. 2007. A quantitative analysis of the variables affecting the repertoire of T cell specificities recognized after vaccinia virus infection. *J. Immunol.* 178: 7890–7901.
- Mandic, M., F. Castelli, B. Janjic, C. Almunia, P. Andrade, D. Gillet, V. Brusic, J. M. Kirkwood, B. Maillere, and H. M. Zarour. 2005. One NY-ESO-1-derived epitope that promiscuously binds to multiple HLA-DR and HLA-DP4 molecules and stimulates autologous CD4⁺ T cells from patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J. Immunol.* 174: 1633–1640.
- Gnjatic, S., D. Atanackovic, E. Jager, M. Matsuo, A. Selvakumar, N. K. Altorki, R. G. Maki, B. Dupont, G. Ritter, Y. T. Chen, et al. 2003. Survey of naturally occurring CD4⁺ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 8862–8867.
- Panina-Bordignon, P., A. Tan, A. Termijtelen, S. Demotz, G. Corradin, and A. Lanzavecchia. 1989. Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur. J. Immunol.* 19: 2237–2242.
- Gelder, C. M., J. R. Lamb, and B. A. Askonas. 1996. Human CD4⁺ T-cell recognition of influenza A virus hemagglutinin after subunit vaccination. *J. Virol.* 70: 4787–4790.
- Diepolder, H. M., J. T. Gerlach, R. Zachoval, R. M. Hoffmann, M. C. Jung, E. A. Wierenga, S. Scholz, T. Santantonio, M. Houghton, S. Southwood, et al. 1997. Immunodominant CD4⁺ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 71: 6011–6019.
- Moon, J. J., H. H. Chu, M. Pepper, S. J. McSorley, S. C. Jameson, R. M. Kedl, and M. K. Jenkins. 2007. Naive CD4⁺ T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* 27: 203–213.
- Jing, L., T. M. Chong, B. Byrd, C. L. McClurkin, J. Huang, B. T. Story, K. M. Dunkley, L. Aldaz-Carroll, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, et al. 2007.

- Dominance and diversity in the primary human CD4 T cell response to replication-competent vaccinia virus. *J. Immunol.* 178: 6374–6386.
39. Cohen, W. M., S. Pouvell-Moratille, X. F. Wang, S. Farci, G. Munier, D. Charron, A. Menez, M. Busson, and B. Maillere. 2006. Scanning the HIV genome for CD4⁺ T cell epitopes restricted to HLA-DP4, the most prevalent HLA class II molecule. *J. Immunol.* 176: 5401–5408.
 40. Wang, X. F., W. M. Cohen, F. A. Castelli, C. Almunia, B. Lethe, S. Pouvell-Moratille, G. Munier, D. Charron, A. Menez, H. M. Zarour, et al. 2007. Selective identification of HLA-DP4 binding T cell epitopes encoded by the MAGE-A gene family. *Cancer Immunol. Immunother.* 56: 807–818.
 41. Zeng, G., Y. Li, M. El-Gamil, J. Sidney, A. Sette, R. F. Wang, S. A. Rosenberg, and P. F. Robbins. 2002. Generation of NY-ESO-1-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells by a single peptide with dual MHC class I and class II specificities: a new strategy for vaccine design. *Cancer Res.* 62: 3630–3635.
 42. Radrizzani, L., T. Sturniolo, J. Guenot, E. Bono, F. Gallazzi, Z. A. Nagy, F. Sinigaglia, and J. Hammer. 1997. Different modes of peptide interaction enable HLA-DQ and HLA-DR molecules to bind diverse peptide repertoires. *J. Immunol.* 159: 703–711.
 43. Sidney, J., C. Oseroff, S. Southwood, M. Wall, G. Ishioka, F. Koning, and A. Sette. 1992. DRB1*0301 molecules recognize a structural motif distinct from the one recognized by most DR beta 1 alleles. *J. Immunol.* 149: 2634–2640.
 44. Staveley-O'Carroll, K., E. Sotomayor, J. Montgomery, I. Borrello, L. Hwang, S. Fein, D. Pardoll, and H. Levitsky. 1998. Induction of antigen-specific T cell anergy: an early event in the course of tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1178–1183.
 45. Theobald, M., J. Biggs, J. Hernandez, J. Lustgarten, C. Labadie, and L. A. Sherman. 1997. Tolerance to p53 by A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 185: 833–841.
 46. Andersen, M. H., L. O. Pedersen, B. Capeller, E. B. Brocker, J. C. Becker, and P. thor Straten. 2001. Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. *Cancer Res.* 61: 5964–5968.
 47. Janjic, B., P. Andrade, X. F. Wang, J. Fourcade, C. Almunia, P. Kudela, A. Brufsky, S. Jacobs, D. Friedland, R. Stoller, et al. 2006. Spontaneous CD4⁺ T cell responses against TRAG-3 in patients with melanoma and breast cancers. *J. Immunol.* 177: 2717–2727.

HLA-A*0201	95-104	ELTLGEFLKL	Schmitz et al., 2000 Andersen et al., 2001a
	5-14	TLPPAWQPFL	Schmitz et al., 2000 Siegel et al., 2004
	96-104(2M) ^a	LLLGEFKLK	Andersen et al., 2001a
			Andersen et al., 2001b
HLA-A2	18-28	RISTFKNWPFL	Reker et al., 2004
HLA-A1	92-101	QFEELTLGEF	Reker et al., 2004
	38-46(9Y) ^b	MAEAGFIHY	Reker et al., 2004
	93-101(2T) ^b	FTELTGEF	Reker et al., 2004
	47-56(10Y) ^b	PTENEPDLAY	Reker et al., 2004
HLA-A3	18-27(10K) ^b	RISTFKNWPK	Reker et al., 2004
HLA-A11	53-62	DLAQCFCK	Reker et al., 2004
HLA-A24	80-88	AYACNTSTL	Hirohashi et al., 2002
HLA-B35	46-54	CPTENEPDL	Reker et al., 2004
	51-59	EPDLAQCF	Reker et al., 2004

a La thréonine natif à la position 2 a été changée par le résidu méthionine.

b Par rapport à la séquence native de la Survivine, la cystéine a été substituée par la tyrosine à la position 9 dans le peptide 38-46, l'acide glutamique par la thréonine à la position 2 dans le peptide 93-101, la glutamine par la tyrosine à la position 10 dans le peptide 47-56 et phénylalanine par la lysine à la position 10 dans le peptide 18-27, respectivement.

Tableau 11 : Les épitopes T CD8+ connus de la Survivine

B. Identification d'épitopes T CD8+ dans la séquence de la Survivine

Nous venons de voir que des réponses T CD4+ peuvent être induites contre la Survivine. Avant cette étude, des réponses T CD8+ ont été décrites contre cette protéine et des épitopes T ont été identifiés.

En 2000, Schmitz *et al.* (Schmitz et al., 2000) ont décrit deux épitopes dérivés de la Survivine restreints à la molécule HLA-A*0201 : les peptides 5-14 et 95-104. Des CTL issus de 2 patients sains ont été induits contre ces deux peptides présentés par des DC autologues. De plus, cette équipe a démontré que le peptide 95-104 contient un épitope naturellement présenté, car des cellules B EBV transfectées par l'ADNc de la Survivine sont lysées par des CTL spécifiques de ce peptide. En 2004, l'équipe du Dr Siegel a montré que le peptide 5-14 permet d'induire des CTL capables de lyser des cellules tumorales issues de patients leucémiques exprimant la Survivine et la molécule HLA-A2 (Siegel et al., 2004). Des réponses spontanées en CTL contre la Survivine ont également été observées dans le sang périphérique de 10 patients atteints de leucémie lymphoïde chronique ou de mélanome mais pas dans celui de 6 patients sains. (Andersen et al., 2001). Ces réponses étaient dirigées contre deux peptides dérivés de la Survivine : le peptide 95-104 et le peptide 96-104 modifié dans lequel la thréonine native à la position 2 a été remplacée par une méthionine afin d'augmenter son affinité pour les molécules HLA-A*0201. Dans une étude complémentaire effectuée par la même équipe, des multimères du peptide 96-104 modifié et de la molécule HLA-A2, ont été employés pour isoler des L_T CD8+ dans les ganglions drainant la tumeur de patients atteints de mélanome. Ces cellules reconnaissent spécifiquement le peptide natif et des cellules tumorales issues de patients atteints de cancer du sein ou de mélanomes, exprimant la Survivine et la molécule HLA-A2 (Andersen et al., 2001). Un certain nombre d'épitopes T CD8+ restreints à HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3 et HLA-A11 ont également été décrits par l'équipe du Dr Reker, basé sur des réponses CTL spontanées de lymphocytes infiltrant les tumeurs (Reker et al., 2004). Ils ont notamment identifié un nouvel épitope T CD8+ dérivé de la Survivine et restreint à la molécule HLA-A2 : le peptide 18-28. Dans son étude, il a également observé 6 réponses CTL spontanées spécifiques de ce peptide sur 22 patients atteints d'un mélanome ou de leucémie lymphoïde chronique. Les positions et les séquences de ces peptides sont incluses dans le Tableau 11.

1. Objectifs du travail

Comme nous venons de le voir, quelques études ont identifié 3 épitopes T CD8+ dans la séquence de la Survivine restreint à la molécule HLA-A*0201 : les peptides 95-104, 5-14 et 18-28. Cependant, afin d'avoir une vision globale de la réponse cellulaire T contre la Survivine nous permettant de proposer des épitopes T

Pool 1

Surv 18-28	R	I	S	T	F	K	N	W	P	F	L
Surv 5-14	T	L	P	P	A	W	Q	P	F	L	
Surv 13-21	F	L	K	D	H	R	I	S	T		
Surv 20-28	S	T	F	K	N	W	P	F	L		
Surv 127-135	T	A	K	K	V	R	R	A	I		
Surv 130-138	K	V	R	R	A	I	E	Q	L		
Surv 133-141	R	A	I	E	Q	L	A	A	M		

Pool 2

Surv 88-96	S	V	K	K	Q	F	E	E	L		
Surv 95-104	E	L	T	L	G	E	F	L	K		
Surv 96-104	L	T	L	G	E	F	L	K	L		
Surv 101-109	F	L	K	L	D	R	E	R	A		
Surv 90-98	K	Q	F	E	E	L	T	L			
Surv 97-104	T	L	G	E	F	L	K	L			

Tableau 12 : Positions, séquences et répartition dans les pools des peptides de la Survivine synthétisés

ayant un intérêt pour la vaccination anti-tumorale, nous avons vérifié la pertinence de ces 3 épitopes T en évaluant la fréquence des réponses T CD8+ dirigées contre ces peptides chez des donneurs sains naïf HLA-A*0201. Nous avons également étudié si d'autres épitopes T CD8+ restreints à la molécule HLA-A*0201 pourraient être présents dans la séquence de cette protéine.

Cette étude nous a également permis de tester notre technique d'induction *in vitro* de lignées T CD8+ issues de donneurs contre des peptides synthétiques. Technique que nous avons ensuite employé à l'étude d'autres Ags dont notamment la Survivine.

2. Résultats

La réalisation de cette étude s'est basée sur un protocole comprenant trois étapes :

1. Sélection et synthèse des peptides de la Survivine potentiellement capables de se lier à la molécule HLA-A*0201
2. Évaluation de l'immunogénicité potentielle des différents peptides par des tests d'induction de L_T CD8+ *in vitro* issus de donneurs sains HLA-A*0201
3. Caractérisation des lignées T CD8+ spécifiques identifiées par des tests de restriction, des tests de dose réponse et des tests de reconnaissance directe de cellules tumorales.

2.1. Sélection et synthèse de peptides restreints à la molécule HLA-A2

Nous avons sélectionné 13 peptides de 8 à 11 aa présentant les plus hauts scores de liaison à la molécule HLA-A*0201 comme prédit par les logiciels BIMAS et SYFPEITHI. Nous nous sommes restreint à la molécule HLA-A*0201 car elle est représentative l'allèle HLA-I le plus représenté dans la population Caucasienne (33%). Les positions et les séquences de ces peptides sont regroupées dans le Tableau 12.

Les 13 peptides ont été synthétisés en phase solide, selon la stratégie Fmoc sur un synthétiseur multiple puis ils ont été purifiés par HPLC si nécessaire. La qualité de chaque peptide a ensuite été contrôlée par spectrométrie de masse.

2.2. Génération de lignées de lymphocytes T CD8+ contre les peptides de la Survivine

La capacité des peptides de la Survivine sélectionnés à induire des lignées cellulaires T CD8+ spécifiques de ces peptides a été étudiée chez 3 donneurs sains exprimant la molécule HLA-A2. Les 13 peptides ont été divisés en deux groupes. Le premier groupe (Pool 1) était composé des peptides 18-28, 5-14, 13-21, 20-28, 127-135, 130-138 et 133-141, et le deuxième groupe (Pool 2) était composé des peptides 88-96, 95-104, 96-104, 101-109, 90-98 et 97-104 (Tableau 12).

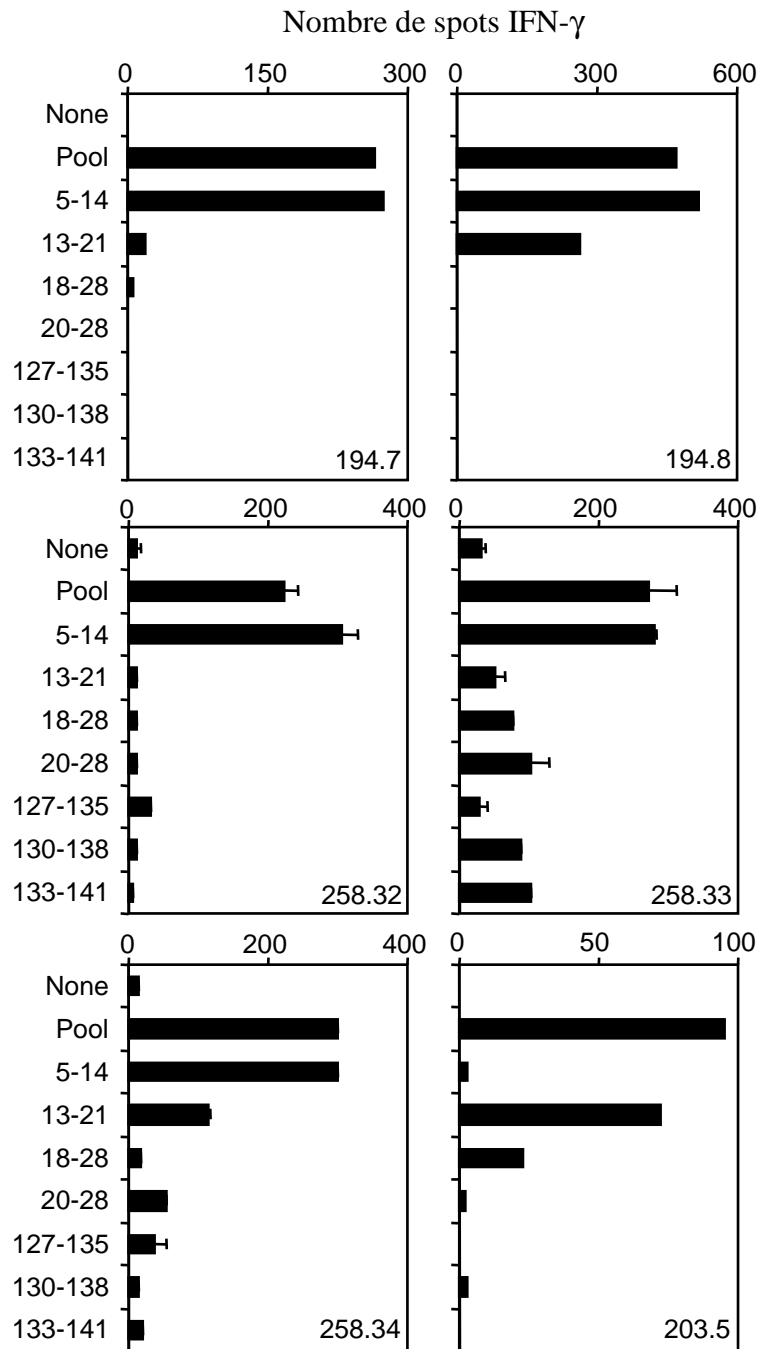


Figure 30 : Spécificité peptidique des lignées T issues de donneurs sains HLA-A2 induites contre des peptides de la Survivine

Des lignées T CD4⁺ issus de 3 donneurs sains (P194, P203 et P258) ont été obtenues après 3 semaines de stimulations par des DC autologues matures chargées avec un mélange de 7 peptides de la Survivine sélectionnés (5-14, 13-21, 18-28, 20-28, 127-135, 130-138 et 133-141). La spécificité de ces lignées T a été évaluée par Elispot IFN- γ . Pour cela, des lymphocytes T (1.10^4 /puits) ont été incubés en duplicate avec 3.10^4 C1R-A2 en présence ou en absence de peptide. Le nombre de spots a été évalué après 24h d'incubation.

Le principe de la technique d'induction des lignées T CD8⁺ est décrit en détail dans la partie « matériels et méthodes » de l'article sur la Midkine. En bref, les cellules T CD8⁺ isolées de 3 donneurs sains ont été stimulées par des DC matures autologues préalablement incubées avec le mélange des peptides de l'un des deux groupes. Après 3 restimulations, nous avons recherché les lignées de L_T CD8⁺ spécifiques des peptides de la Survivine par ELISpot IFN- γ . Pour cela, nous avons utilisé des cellules C1R, transfectées par un vecteur d'expression codant pour la molécule HLA-A2 (C1R-A2), comme cellules présentatrices chargées soit du mélange des peptides du groupe ayant servi à l'induction des lignées testées, soit des peptides individuels de ce même groupe. Les cellules C1R-A2 non chargées ont servi de contrôle négatif. Les résultats des Elispots IFN- γ sont représentés dans la Figure 30 et un bilan des lignées T CD8⁺ induites par peptide et par donneur est exposé dans le Tableau 13.

Donneurs	POOL 1	POOL 2	18-28	5-14	13-21	20-28	127-135	130-138	133-141
P194	2	0	0	2	1	0	0	0	0
P203	2	0	0	1	1	0	0	0	0
P258	3	0	0	3	0	0	0	0	0
Total	7	0	0	6	2	0	0	0	0
Donneurs	3	0	0	3	2	0	0	0	0

Tableau 13 : Nombre de lignées de L_T CD8⁺ spécifiques de peptides de la Survivine induites par peptides et par donneurs sains HLA-A2

Deux peptides du groupe 1 sont capables d'induire des lignées de L_T CD8⁺ : les peptides 5-14 et 13-21. Plusieurs lignées T CD8⁺ ont été induites contre ces deux peptides : 6 lignées L_T CD8⁺ ont été induites contre le peptide 5-14 et 2 contre le peptide 13-21 avec la lignée T 194.8 qui était capable de reconnaître à la fois le peptide 5-14 et 13-21. A l'inverse, aucun peptide du groupe 2 n'a induit de lignées T.

2.3. Étude de la fonctionnalité des lignées T CD8⁺ spécifiques de la Survivine

Le premier criblage a permis d'obtenir des lignées de L_T CD8⁺ spécifiques de 2 peptides de la Survivine (5-14 et 13-21). De manière à mieux caractériser la fonctionnalité de ces différentes lignées, nous avons étudié pour une partie d'entre elles leur restriction, leur efficacité de reconnaissance des peptides et leur capacité à reconnaître des cellules tumorales.

2.3.1. Étude de la restriction des lignées T CD8⁺

Un test de restriction a été effectué sur les lignées T induites afin de vérifier que la reconnaissance des peptides était bien restreinte à la molécule HLA-A2. Pour

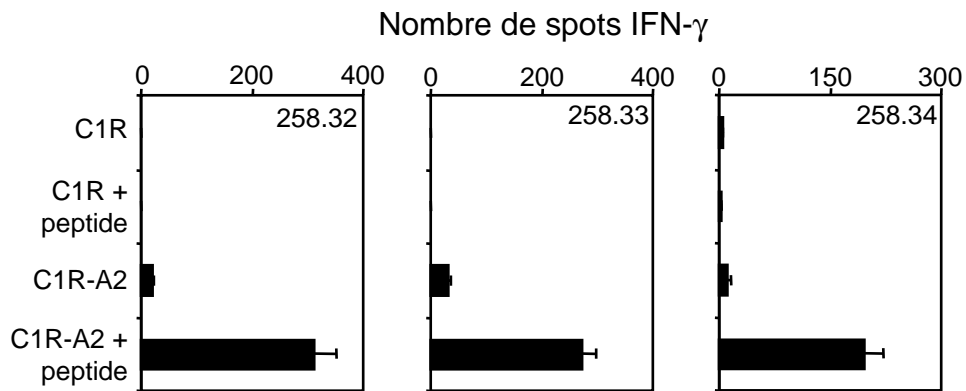


Figure 31 : Étude de la restriction à la molécule HLA-A2 de lignées T spécifiques du peptide 5-14 de la Survivine

Trois lignées de lymphocytes T CD8+, spécifiques du peptide 5-14 ont été incubées (1.10^4 /puits) en présence de cellules C1R ou C1R-A2 (3.10^4 /puits) préalablement chargées ou non avec le peptide 5-14. L'activation de ces lignées a été évaluée par Elispot IFN- γ . Les résultats sont exprimés sous forme du nombre de spots IFN- γ sécrétés comptés sur lecteur AID.

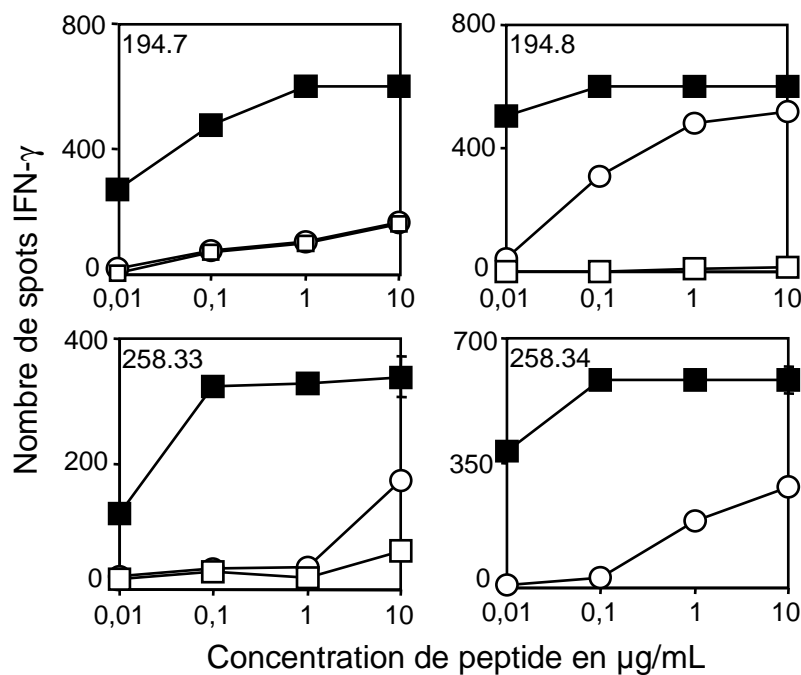


Figure 32 : Tests de dose réponse de lignées de L_T CD8+ spécifiques de peptides de la Survivine

Des L_T CD8+ (1.10^4 /puits) ont été incubées en présence de cellules C1R-A2 (3.10^4 /puits) et des concentrations variables de peptides 5-14 (carré noir), 13-21 (carré vide) ou avec le peptide témoin 20-28 (cercle vide) puis testés en Elispot IFN- γ . Les résultats sont exprimés sous forme du nombre de spots IFN- γ sécrétés comptés sur lecteur AID.

■ 5-14 ○ 13-21 □ 20-28

cela, nous avons incubé des lignées T CD8⁺ spécifiques de peptides de la Survivine avec des cellules C1R et C1R-A2 préalablement chargées ou non avec le peptide cible. Nous avons ensuite évalué l'activation de ces différentes lignées en suivant leur production d'IFN- γ par Elispot. Les résultats de ces tests sont présentés dans la Figure 31.

Trois lignées T (258.32, 258.33 et 258.34), toutes spécifiques du peptide 5-14, ont été testées. Comme le montre la Figure 31, les 3 lignées T ne sont activées qu'en présence de cellules C1R-A2 chargées avec le peptide 5-14. La reconnaissance du peptide 5-14 par ces 3 lignées T est donc bien restreinte à la molécule HLA-A2. Comme nous sommes toujours limités par le nombre de cellules T obtenues au bout de 4 semaines de stimulation *in vitro* à partir de 200 000 cellules de départ, nous n'avons pas pu tester la restriction à la molécule HLA-A2 de lignées T CD8⁺ spécifiques du peptide 13-21.

2.3.2. Étude de la dose réponse

Nous avons également testé la capacité des peptides 5-14 et 13-21 à stimuler des lignées T spécifiques en fonction de leur concentration. Pour cela, des lignées T spécifiques de ces peptides ont été incubées avec des cellules C1R-A2 préalablement chargées avec des doses croissantes du peptide 5-14 ou 13-21 ou le peptide témoin 20-28 et/ou 13-21. La stimulation des lignées T a été évaluée par Elispot IFN- γ . Les résultats de ces tests sont présentés dans la Figure 32.

Quatre lignées T ont ainsi été testées dont 3 étaient spécifiques du peptide 5-14 (194.7, 258.33 et 258.34) et la lignée 194.8 qui était capable de reconnaître à la fois le peptide 5-14 et le peptide 13-21. Toutes ces lignées reconnaissent le peptide 5-14 avec la même efficacité quelque soit la concentration de peptide utilisée, même pour des concentrations très basses de l'ordre de 10^{-2} μ g/mL, ce qui correspond sensiblement à une concentration de 10^{-8} M. A l'inverse, aucune de ces lignées n'est stimulée par les cellules C1R-A2 présentant le peptide témoin négatif.

De plus, pour la lignée 194.8, on peut voir que l'efficacité de stimulation par le peptide 13-21 varie avec la concentration de peptide utilisée. En effet, la stimulation par le peptide 13-21 est du même ordre d'intensité que celle du peptide 5-14 pour une forte concentration de peptide comme à 10 μ g/mL mais elle est du même ordre que celle du peptide témoin (20-28) pour des concentrations plus faibles comme 10^{-2} μ g/mL. D'après ces résultats, nous constatons que les lignées T CD8⁺ spécifiques du peptide 5-14 peuvent être stimulées à des concentrations très faibles de peptide. De plus, le peptide 5-14 semble plus efficace que le peptide 13-21 pour stimuler la lignée 194.8.

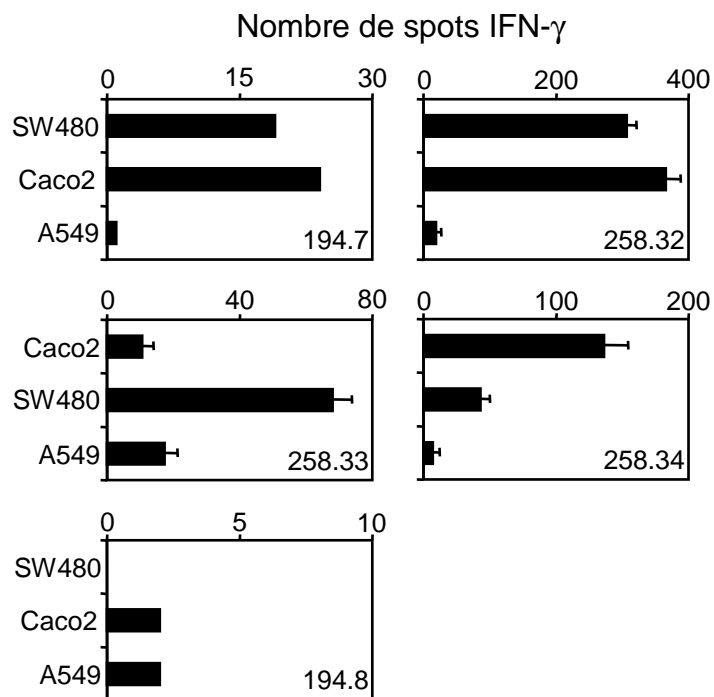


Figure 33 : Reconnaissance directe de cellules tumorales par des L_T CD8+ spécifiques de la Survivine

Quatre lignées de L_T CD8+, spécifiques du peptide 5-14 (194.7, 258.32, 258.33 et 258.34) et une spécifique des peptide 13-21 et 5-14 (194.8), ont été incubées (1.10^4 /puits) en présence de cellules tumorales (3.10^4 /puits) SW480 et Caco2 (HLA-A2^{+/+} et Survivine^{+/+}) et de cellules tumorales A549 (HLA-A2^{-/-} et Survivine^{+/+}). L'activation de ces lignées a été évaluée par Elispot IFN- γ . Les résultats sont exprimés sous forme du nombre de spots IFN- γ sécrétés comptés sur lecteur AID.

2.3.3. Reconnaissance de cellules tumorales

Nous avons analysé 5 lignées T CD8⁺ pour leur capacité à reconnaître des cellules tumorales HLA-A2 exprimant naturellement la Survivine. Ce test est essentiel pour savoir si les peptides mis en évidence contiennent des épitopes qui sont naturellement apprêtés et présentés à la surface des cellules tumorales sur les molécules HLA-A2. Cette étape nous permet également de tester si le taux d'expression endogène de la protéine étudiée dans les cellules tumorales est suffisant pour induire une activation de cellules T CD8⁺. Pour cette étude, nous avons incubé ces 5 lignées de L_T CD8⁺ en présence de cellules d'adénocarcinomes du colon (SW480 et Caco2) qui expriment la Survivine et la molécule HLA-A2. Comme témoin négatif, nous avons utilisé des cellules de carcinome pulmonaire (A549) qui expriment également la Survivine mais qui n'expriment pas la molécule HLA-A2. La production d'IFN- γ a été évaluée pour chacune de ces 5 lignées de L_T. Les résultats sont présentés dans la Figure 33.

Sur les 5 lignées analysées, 4 étaient strictement spécifiques du peptide 5-14 (194.7, 258.32, 258.33 et 258.34) et une (194.8) était spécifique à la fois du peptide 5-14 et 13-21.

Trois des lignées T (194.7, 258.32 et 258.34) spécifiques du peptide 5-14 se sont montrées capable de reconnaître les cellules tumorales SW480 et Caco2 mais pas les cellules tumorales A549 (contrôle négatif non HLA-A2). La lignée 258.33 n'a reconnu que les cellules SW480 et, la lignée 194.8 spécifique des peptides 5-14 et 13-21 n'en a reconnu aucune.

Avec ce test, nous pouvons effectivement dire que le peptide 5-14 comprend un épitope immunodominant, car il est naturellement présenté par les cellules tumorales colorectales. Ces résultats montrent également que le taux d'expression endogène de la Survivine dans ces cellules est suffisant pour induire une ré-activation de lignée T CD8⁺ spécifiques.

A l'inverse, le peptide 13-21 ne semble pas être un épitope immunodominant. Cependant, une seule lignée T spécifique de ce peptide a été testée pour sa capacité de reconnaissance directe de cellules tumorales, ce qui ne nous permet pas de conclure avec certitude sur l'immunodominance de cet épitope T.

Tableau 14: Résumé de l'étude des réponses cellulaires T dirigées contre la Survivine

Epitopes	Nombre de lignées induites	Nombre de donneurs	Restrictions Observées	Protéine native	Reconnaissance lysats CT	Reconnaissance CT	Réponses spontanées
17-31	28	5/8	HLA-DR4, DR7, DR15, DRB4, DRB5, DP4	+	+	ND	ND
20-34	9	3/8	HLA-DR4, DR7, DR11, DP4	+	ND	+	ND
84-98	11	4/8	ND	+	ND	ND	+
90-104	19	7/8	HLA-DR7, DR11, DR15, DRB4, DRB5,	+	ND	ND	-
93-107	9	4/8	HLA-DR7, DP4	+	ND	ND	-
96-110	23	7/8	HLA-DR4, DR7, DP4	+	ND	ND	-
128-142	17	6/8	DR15, DRB5	+	ND	ND	-
5-14	6	3/3	HLA-A*0201			+	ND
13-21	2	2/3	HLA-A*0201			-	ND

CT : Cellules Tumorales

* : Données en cours de confirmation

ND : Non Déterminé

C. Conclusion et Discussion

La Survivine est l'un des rares Ags exprimés dans de multiples tumeurs. Elle est en revanche très peu exprimée dans les tissus sains différenciés. Cet Ag est impliqué dans des fonctions vitales pour les tumeurs notamment la division cellulaire et dans la résistance des tumeurs à l'apoptose. La perte d'expression de la Survivine par des cellules tumorales afin d'échapper aux attaques immunes serait donc néfaste pour la progression de la tumeur. Elle apparaît donc comme une cible privilégiée pour l'immunothérapie anti-tumorale. C'est pourquoi, nous avons étudié l'immunogénicité de la Survivine face à des L_T $CD4^+$ et $CD8^+$ afin d'avoir une vision globale des réponses cellulaires T dirigées contre cette protéine et de pouvoir proposer des cibles peptidiques de choix pour la vaccination antitumorale. Un résumé des résultats obtenus est représenté dans le tableau 14.

La première partie de notre étude nous a permis de démontrer que la Survivine est capable de générer des réponses cellulaires T $CD4^+$ chez plusieurs individus sains et patients atteints de cancer. Ces réponses impliquent sept épitopes T (17-31, 20-34, 84-98, 90-104, 93-107, 96-110, 128-142) restreints à de multiples molécules HLA-II, mais sont principalement supportées par les molécules HLA-DR.

Les sept épitopes que nous avons identifiés présentent tous un intérêt pour la vaccination antitumorale car ils sont tous immunodominants et immunoprévalents. En effet, des L_T $CD4^+$ spécifiques de ces peptides se sont montrés capables de reconnaître des DC chargées avec l'Ag natif ou des lysats de tumeurs (principe d'immunodominance). Deux lignées T spécifiques du peptide 20-34 ont même été capables de reconnaître directement des cellules tumorales, suggérant qu'au moins le peptide 20-34 est présenté à la surface de cellules tumorales. De plus, ces épitopes ont permis d'induire des lignées T $CD4^+$ chez au moins la moitié des donneurs sains étudiés (principe d'immunoprévalence).

Les épitopes immunodominants 90-104 et 96-110 nous semblent les plus intéressants parce qu'ils se sont montrés stimulants chez tous les donneurs sains étudiés qui présentent des typages HLA-II variés. Relativement peu de peptides avec une immunoprévalence aussi importante ont été décrits dans des Ags tumoraux (Gnjatic et al., 2003; Mandic et al., 2005; Zarour et al., 2002) et des Ags d'origine virale ou bactérienne (Castelli et al., 2007; Diepolder et al., 1997; Gelder et al., 1996). Les épitopes T $CD4^+$ que nous avons identifiés sont donc intéressants dans une perspective d'utilisation clinique, car ils permettent d'induire des réponses T $CD4^+$ chez des donneurs exprimant les allèles HLA-II les plus représentés de la population européenne et nord américaine.

De telles réponses T $CD4^+$ pourraient permettre le développement de réponses humorales contre la Survivine chez les patients, réponses dépendantes de l'activation de L_T $CD4^+$ spécifiques de la Survivine. Des taux élevés d'anticorps

dirigés contre la Survivine ont en effet été retrouvés chez des patients atteints de cancer mais pas chez les individus sains (Altieri, 2001; Rohayem et al., 2000). Ces réponses T CD4+ spécifiques de la Survivine pourraient surtout permettre l'induction d'une réponse cytotoxique et son maintien à long terme. Une étude a en effet démontré que le nombre et la fréquence de CTL spécifiques de la Survivine sont augmentés en présence de L_T CD4+ spécifiques du même Ag (Kim et al., 2008).

Récemment des épitopes de la Survivine restreints aux molécules HLA-A2, A1, A3, A11, A24 et B35 et capables d'induire des réponses T cytotoxiques ont été identifiés (Ichiki et al., 2005). Parmi ces épitopes, 3 (5-14, 18-28 et 96-104) ont été décrits comme restreints à la molécule HLA-A2, molécule de classe I la plus représentée dans la population caucasienne (Tableau 11).

Dans la seconde partie de notre étude, nous avons vérifié la pertinence de ces 3 épitopes T CD8+. Nous avons induit des lignées T CD8+ principalement contre un de ces peptides : le 5-14. Nous avons ainsi vérifié que ce peptide est immunodominant car des lignées T CD8+ spécifiques de cet épitope sont capables de reconnaître des cellules tumorales HLA-A2 exprimant la Survivine. Par ailleurs, nous avons démontré que ce peptide 5-14 est également immunoprévalent car il induit des lignées T CD8+ chez tous les donneurs sains étudiés.

Aucune lignée n'a montré de spécificité pour les autres peptides, notamment les peptides 18-28 et 95-104 déjà décrits. Ceci n'indique pas que ces peptides ne soient pas des épitopes T CD8+ mais seulement qu'ils ne sont pas immunoprévalents que le peptide 5-14, c'est-à-dire que la fréquence d'individus HLA-A2 capables d'induire une réponse T CD8+ dirigée contre ce peptide 5-14 est plus importante que pour les autres épitopes T CD8+ identifiés dans la séquence de la Survivine. Le peptide 5-14 semble donc être l'épitope T CD8+ le plus intéressant dans une stratégie de vaccination anti-tumorale visant la Survivine.

Contrairement aux précédentes études, nous avons ciblé l'ensemble des peptides dérivés de la Survivine présentant de hauts scores de liaison aux molécules HLA-A2 selon les logiciels de prédiction BIMAS et SYFPEITHI. En effet, lors de ces études, seuls quelques peptides ont été testés pour leur capacité à induire des réponses T CD8+ car ils étaient préalablement sélectionnés sur leur capacité de stabilisation de molécules HLA-A*0201 *in vitro*. Bien que plusieurs études aient en effet suggéré une relation entre une bonne affinité pour les molécules HLA et l'immunogénicité (Mandic et al., 2005; Zarour et al., 2002), il existe des contre exemples. En effet, dans l'étude que nous avons réalisée portant sur l'identification d'épitopes T CD4+ dérivés de la Survivine, le peptide 17-31 ne présentait pas une forte affinité pour les molécules HLA-DR4, et DRB4 dans les tests de liaison *in vitro*. Cependant, ce peptide était bien présenté par ces deux molécules dans les tests de restriction. Ce résultat peut être expliqué par le fait qu'une médiocre capacité de

liaison à des molécules HLA puisse être compensée par une forte affinité du TCR pour le complexe “molécule HLA/peptide” (Arnold et al., 2002).

L'ensemble de nos résultats permet de définir de nouvelles cibles peptidiques de choix pour la vaccination anti-tumorale dirigée contre la Survivine. Ces cibles sont toutes immunodominantes mais elles sont également immunoprévalentes. Il s'agit des 7 épitopes T CD4+, et plus particulièrement les peptides 90-104 et 96-110, et de l'épitope T CD8+ 5-14. Nous proposons donc de tester une combinaison de ces peptides dans une stratégie de vaccination antitumorale afin d'induire à la fois des réponses T CD8+ et CD4+ chez des patients. En effet, l'utilisation d'épitopes T CD4+ et CD8+ immunoprévalents capables d'être présentés par plusieurs molécules HLA est une manière d'améliorer le pouvoir immunogène des préparations vaccinales et permet d'inclure une population plus large dans les essais cliniques de vaccination peptidique.

Il est également intéressant de constater que l'épitope T CD8+ 96-104 (décrits par d'autres) est contenu dans les épitopes T CD4+ immunoprévalents 90-104 à 96-110. L'épitope T CD4+ 17-31 contient lui aussi un épitope T CD8+, le peptide 18-28. Ces peptides pourraient initier à la fois des réponses T CD4+ et CD8+ comme il a déjà été observé pour d'autres combinaisons d'épitopes T notamment dérivés de l'Ag tumoral NY-ESO-1 (Zeng et al., 2002).

Seul le peptide 96-104 a été utilisé dans une stratégie de vaccination chez des patients atteints de mélanomes (Otto et al., 2005). Cependant, les L_T induits ont montré peu de toxicité vis-à-vis de la tumeur. Nos travaux permettent de proposer les peptides 95-104 et/ou 96-104 afin d'induire à la fois des réponses T CD4+ et CD8+. Le nombre et la fréquence des CTL spécifiques de la Survivine pourraient être augmentés en présence de L_T CD4+ spécifiques du même Ag. Les travaux réalisés *in vitro* par le docteur Kim vont dans ce sens (Kim et al., 2008).

Ainsi les séquences peptidiques qui ont été mises en évidence dans cette étude présentent un intérêt à la fois diagnostique et vaccinal et permettent d'avoir une connaissance générale de la réponse cellulaire T contre la Survivine.

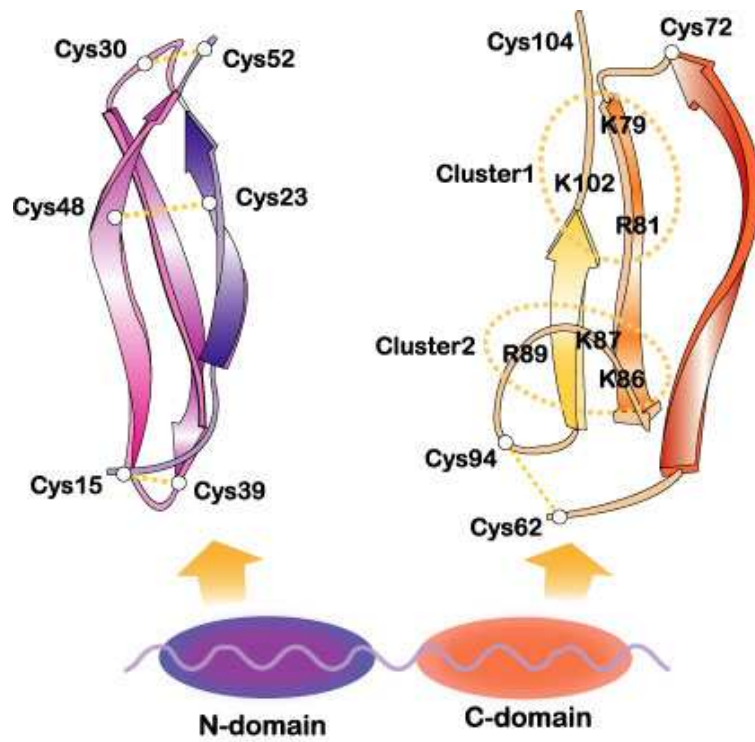


Figure 34 : Organisation des domaines et structure tridimensionnelle de la Midkine

Dans la partie C-terminale, les deux sites de liaison à l'héparine sont encerclés.
(Wiley et al., 2002)

Chapitre 2

Le facteur angiogénique et bio-marqueur Midkine est un nouvel antigène tumoral surexprimé dans les tumeurs

La Midkine (MDK) est une protéine sécrétée appartenant à la famille des facteurs de croissance liant l'héparine. Elle a été découverte en 1988 en tant que protéine induite lors de l'incubation de cellules de carcinome embryonnaire avec de l'acide rétinolique. (Kadomatsu et al., 1988). Elle est principalement exprimée au cours de l'embryogenèse où elle participe au développement neuronal. Chez l'adulte, cette protéine est surexprimée dans de nombreuses tumeurs malignes alors que son expression est faible ou indétectable dans les tissus sains correspondants. Dans les cellules tumorales, elle contribue à leur résistance à l'apoptose et est impliquée dans leur capacité proliférative, par le biais de la régulation de la division cellulaire et de l'angiogénèse. Cette protéine est également un marqueur tumoral qui peut être détectée dans le sérum et dans les urines de patients atteints de cancer. Son expression est généralement associée à un mauvais pronostic de l'évolution de la maladie et son blocage contribue à la régression des tumeurs. Ces propriétés font de la Midkine une cible attrayante pour les nouvelles thérapies anti-cancéreuses.

A. Introduction

1. Notions générales relatives à la Midkine

La Midkine est une protéine de 143 aa riche en résidus basiques et qui possède cinq ponts disulfure (Figure 34). Elle est exprimée sous la forme d'un précurseur comportant un peptide signal de 22 acides aminés. Ce peptide signal permet la sécrétion de la Midkine en dirigeant la protéine en cours de synthèse dans la lumière du RE. Cette protéine comporte deux sites de fixation de l'héparine qui font d'elle un membre de la famille des facteurs de croissance liant l'héparine au même titre que la Pleiotrophine avec laquelle elle partage environ 50% d'homologie. La structure de la Midkine a été résolue par RMN en 1997. La protéine comporte deux domaines différents reliés par une région flexible. Chaque domaine est constitué de trois feuillets bêta anti-parallèles. L'activité biologique (croissance des neurites, fibrinolyse et migration des cellules nerveuses) n'implique que le domaine C-terminal. Ce domaine est conservé et est retrouvé depuis la drosophile jusqu'à l'homme, ce qui confirme son importance fonctionnelle. Notamment, il y a une grande homologie de séquence dans la partie C-terminale de la Midkine humaine avec celle de la Midkine murine. En revanche, cette homologie est faible dans les parties N-terminales

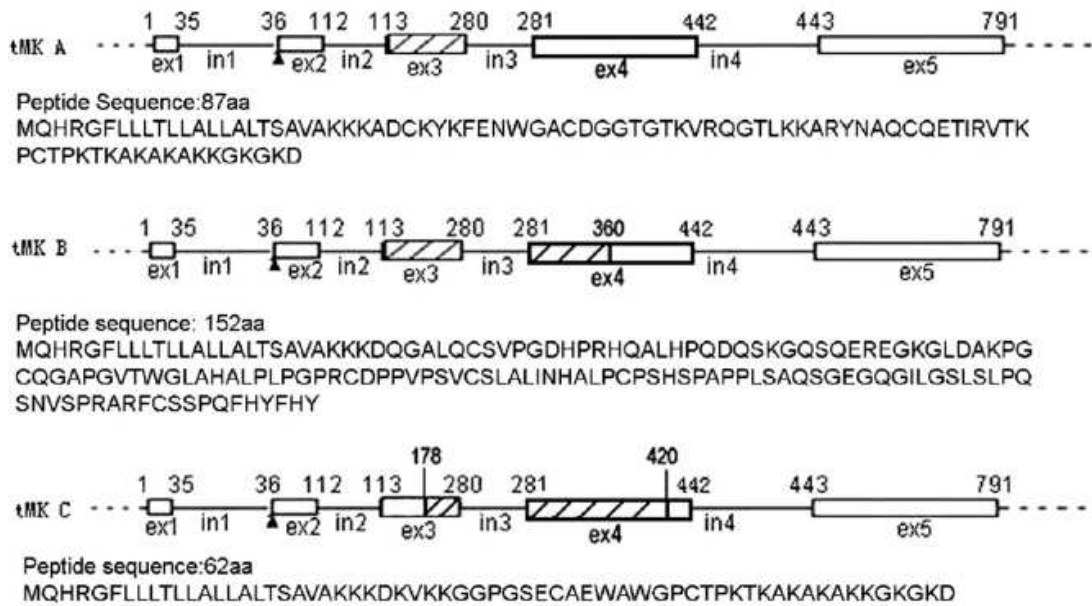


Figure 35 : Représentation schématiques des trois transcrits de la MDK (tMK) et séquences des protéines correspondantes

Les lignes représentent les intron (in), les rectangles représentent les exons (ex), les rectangles hachurés représentent les portions tronquées. (*Tao et al., 2007*)

contenant le peptide signal. Au total, la Midkine murine et humaine partagent 80% d'homologie.

Le gène de la Midkine (MDK) est localisé sur le chromosome 11 en position 11p11.2. Il comporte 4 exons et a une taille de 3,5kb. La région 5' régulatrice contient un site de réponse à l'acide rétinoïque responsable de l'induction de l'expression de la Midkine.

Le gène de la Midkine donne naissance à quatre transcrits différents : le transcrit de la Midkine sauvage (143 résidus), un transcrit résultant de la perte de l'exon 3 (tMKA : 87 résidus avec perte de la fonction du domaine N-terminal), un transcrit résultant de la perte de l'exon 3 et d'une partie de l'exon 4 suite à une mutation sur l'acide aminé 27 juste après le peptide signal (tMKB : 152 résidus), et un transcrit ayant perdu une partie de l'exon 3 et 4 (tMKC : 62 résidus avec perte des domaines de liaison à l'héparine) (Figure 35). Les fonctions différentielles des variants de la Midkine sont peu connues. Cependant, des études montrent que leur expression est strictement restreinte aux cellules tumorales (Tao et al., 2007).

2. Récepteurs et Fonctions physiologiques

Les fonctions de la Midkine sont diverses mais sont très restreintes chez les individus sains et adultes du fait de sa faible expression.

2.1. Les récepteurs de la Midkine

On connaît au moins quatre récepteurs capables de lier la Midkine :

- les récepteurs N-Syndecan qui sont des protéoglycanes comportant des héparine sulfates. La fixation de la Midkine sur ces récepteurs entraîne l'activation de la voie cortactine-src pour la signalisation intracellulaire.
- PTP ξ qui est un récepteur protéique de type tyrosine phosphatase. Son domaine extracellulaire porte des chaînes chondroïtine sulfate et son domaine intracellulaire comporte une activité tyrosine phosphatase. La fixation de la Midkine sur ce récepteur entraîne l'activation des voies intracellulaires PI3-Kinase et Erk.
- ALK (anaplastique lymphoma kinase) qui est un récepteur de type tyrosine kinase. Comme pour le récepteur PTP ξ , la fixation de la Midkine sur ce récepteur entraîne l'activation des voies intracellulaires PI3-Kinase et Erk (Figure 36).
- LRP qui sont des membres de la famille des récepteurs des LDL. Ces récepteurs permettent l'endocytose de différents ligands. L'endocytose de la Midkine est complètement dépendante du récepteur LRP1 et permet son adressage dans le noyau (Chen et al., 2007). Le transport de la Midkine dans le noyau est accompli grâce à son association à la protéine navette nucléo-cytoplasmique Nucléoline ou le précurseur

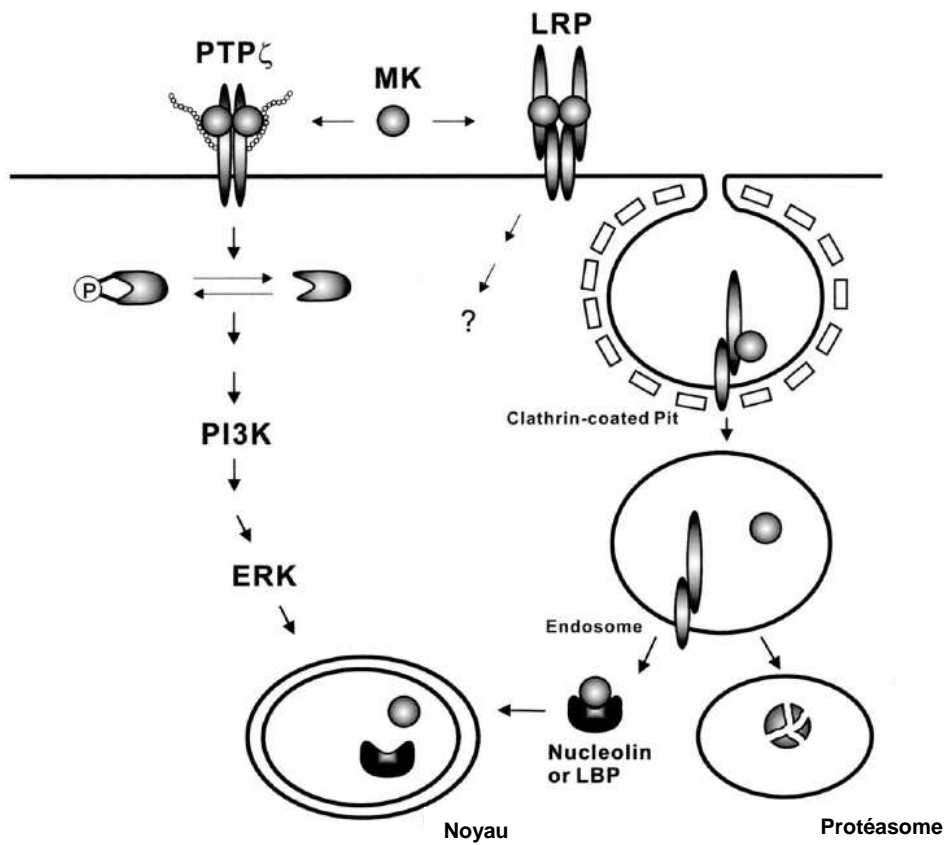


Figure 36 : Les récepteurs de la Midkine et leurs mécanismes d'action

Deux récepteurs de la Midkine PTP ζ et LRP ainsi que leurs cascades de signalisation intracellulaire sont représentés. (Kadomatsu et al., 2002)
 LBP, laminin binding protein precursor.

de la protéine liant la Laminine (LBP) (Salama et al., 2001; Shibata et al., 2002) (Figure 36). Cet adressage de la Midkine au noyau est essentiel pour les fonctions biologiques de la Midkine dans les neurones et dans les cellules tumorales dont nous parlerons plus tard.

Ces quatre récepteurs (N-Syndecan, PTP ξ , ALK et LRP) sont utilisés par la Midkine pour accomplir différentes fonctions.

2.2. Fonctions biologiques

La Midkine est principalement exprimée au cours de l'embryogénèse avec un pic d'expression en milieu de gestation. C'est pourquoi, les fonctions principales de la Midkine ont lieu durant cette période. Chez l'adulte, cette protéine joue principalement un rôle au niveau des cellules neuronales mais également dans certaines pathologies inflammatoires et neurodégénératives. Une faible expression de la Midkine a également été trouvée au niveau de l'intestin grêle. Cependant, le rôle et la fonction de la Midkine à ce niveau restent méconnus.

- Rôle dans le développement embryonnaire

Lors de l'embryogénèse, la Midkine intervient dans le développement des dents (Mitsiadis et al., 1995), des poumons, des reins (Vilar et al., 2002) et des os (Qi et al., 2001). Elle est également impliquée dans le développement des neurones.

- Croissance et protection neuronale

Elle provoque la croissance des neurites (Kaneda et al., 1996), par le biais du récepteur N-Syndecan, et le développement de la jonction neuromusculaire (Zhou et al., 1997), par le biais du récepteur PTP ξ . Elle intervient également dans la protection des neurones par le biais du récepteur LRP (Maeda et al., 1999).

- Migration cellulaire

La Midkine est impliquée dans la migration de nombreux types cellulaires, notamment les polynucléaires éosinophiles (Takada et al., 1997), les cellules ostéoblastiques (Qi et al., 2001), les cellules musculaires lisses, les macrophages (Horiba et al., 2000) et les cellules neuronales (Maeda et al., 1999). Les récepteurs N-Syndecan et PTP ξ sont impliqués dans cette fonction.

- Rôle dans des pathologies

De nombreuses études utilisant des souris KO pour le gène de la Midkine ainsi que des anticorps dirigés contre cette protéine, ont permis de mettre en évidence l'implication de la Midkine dans différentes pathologies telles que des maladies neurodégénératives, inflammatoires et autoimmunes.

La néphrite et la restenose vasculaire

Il a été observé que des souris rendues déficientes pour le gène de la Midkine sont en effet moins affectées que les souris témoin par l'induction de néphrites. Elles sont également moins sujettes à la restenose (rétrécissement des artères dû à la prolifération des tissus artériels endommagés) (Sato et al., 2001). Ces mêmes souris déficientes pour la Midkine ont également montrés moins de formation de néointima que les souris sauvages, lors de la reconstruction vasculaire (Horiba et al., 2000). Dans ces pathologies, la Midkine jouerait un rôle dans le recrutement des cellules inflammatoires et des cellules musculaires lisses car elles ont été trouvées moins nombreuses au site de l'inflammation chez les souris déficientes.

Maladies Neurodégénératives

La Midkine jouerait également un rôle dans des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. De la Midkine a été trouvée au niveau des plaques séniles. Elle serait capable de se lier aux protéines β -amiloïde ($A\beta$) et d'inhiber en partie leur cytotoxicité (Yu et al., 1998).

Arthrites Rhumatoïdes (RA)

Des études montrent une augmentation du taux de la Midkine dans le sérum de patients atteints de RA, suggérant un rôle de cette protéine dans le développement de la maladie. De plus, d'autres travaux montrent que des souris déficientes pour le gène de la Midkine, chez lesquelles on a déclenché une RA à l'aide d'anticorps, ont moins de symptômes que les souris sauvages (Maruyama et al., 2004). Comme pour la néphrite et la restenose vasculaire, le rôle de la Midkine dans la RA serait de recruter des cellules inflammatoires. En effet, ces dernières ont été trouvées moins nombreuses au site de l'inflammation chez les souris KO.

Les mêmes observations ont été faites chez des souris atteintes d'EAE (encéphalomyélite autoimmune expérimentale), qui est un modèle murin de sclérose en plaques (Wang et al., 2008).

La Midkine semble donc jouer un rôle dans des pathologies diverses. Cependant, la fonction précise de la Midkine dans ces maladies ainsi que les mécanismes d'action restent à éclaircir. Il est également important de noter que les souris déficientes pour le gène de la Midkine sont viables et qu'elles ne sont affectées que dans des fonctions neuronales en accord avec le rôle de la Midkine dans le développement du système nerveux.

3. Midkine et cancers

3.1 Expression dans les tumeurs

L'expression de la Midkine chez des individus sains et adultes est moindre et locale (intestin grêle, cerveau). En revanche, cette protéine est surexprimée dans de nombreuses tumeurs. Dans les cellules tumorales, la Midkine est principalement localisée au niveau du noyau, où elle opère ses fonctions biologiques, mais on en retrouve également dans le cytoplasme (Dai et al., 2008). De plus, la Midkine est classée parmi les 40 gènes les plus exprimés dans les tumeurs par rapport aux tissus sains (Velculescu et al., 1999).

Cette protéine est exprimée dans de nombreux cancers humains en particulier dans les carcinomes. Son expression élevée a été observée dans des cancers de l'œsophage, gastriques (Konishi et al., 1999), rénaux (Tsutsui et al., 1993), du colon (Ye et al., 1999), du foie (Koide et al., 1999), du sein (Garver et al., 1994), des poumons (Garver et al., 1993), de la vessie (O'Brien et al., 1996), du col de l'utérus (Moon et al., 2003), des leucémies (Hidaka et al., 2007), mais également dans des tumeurs neuronales incluant des neuroblastomes, des astrocytomes et des neurofibromes (Mashour et al., 2001; Mishima et al., 1997; Nakagawara et al., 1995).

Des études montrent qu'une expression élevée de la Midkine est corrélée avec un mauvais pronostic dans le cancer de la vessie (O'Brien et al., 1996), dans les cas de neuroblastomes (Nakagawara et al., 1995) et de glioblastomes (Mishima et al., 1997). L'expression de la Midkine peut également être détectée à des stades très précoces du développement tumoral, notamment dans le cas de cancers colorectaux et pulmonaires (Konishi et al., 1999; Ye et al., 1999).

3.2. La Midkine est un bio-marqueur tumoral

A l'inverse de certaines protéines tumorales, telles que la p53, l'expression de la Midkine n'est pas que tissulaire. En effet, la Midkine est une protéine sécrétée que l'on peut détecter dans le sérum au même titre que la PSA chez les patients atteints de cancer de la prostate. Un niveau élevé de Midkine a été détecté dans le sérum de plus de 60% des patients atteints de carcinomes (Muramatsu et al., 1996). Ce niveau diminue lorsque la tumeur est retirée chirurgicalement (Ikematsu et al., 2003a).

Plus récemment, des études ont montré que le taux d'expression dans le sérum est corrélé avec l'évolution de la tumeur (Trojan et al., 2005; You et al., 2008).

Des taux élevés de Midkine ont également été mesurés dans les urines de 70 % de patients atteints de carcinomes variés (Ikematsu et al., 2003b). Notamment, la Midkine a pu être détectée dans les urines de 17 patients sur 21 atteints de carcinome gastriques au stade 1. La présence de Midkine dans le sérum et dans les urines semble donc avoir une valeur diagnostique et pronostique.

3.3. Activités biologiques liées aux cellules tumorales

La Midkine possède de nombreuses fonctions liées aux cellules tumorales notamment une activité anti-apoptotique, mitogénique, angiogénique et transformante. Les fonctions biologiques de la Midkine dans les cellules tumorales nécessitent son transfert dans le noyau. Seule la partie C-terminale semble nécessaire à ses activités biologiques. La Midkine nucléaire peut provenir soit de l'expression endogène de cette protéine par les cellules tumorales, soit de Midkine soluble endocytée via les récepteurs LRP1 (Chen et al., 2001; Shibata et al., 2002). Une fois ses fonctions biologiques effectuées, la Midkine est dégradée par la voie du protéasome (Suzuki et al., 2004).

- Midkine et transformation cellulaire

Une des premières fonctions de la Midkine liée aux cellules tumorales est la capacité de transformation. Des études ont en effet montré la capacité de la Midkine à transformer des cellules NIH3T3 *in vitro* (Kadomatsu et al., 1997).

- Rôle de la Midkine dans division cellulaire

La Midkine joue rôle important dans la croissance des cellules tumorales. Son inhibition bloque la croissance des cellules tumorales comme cela a été observé sur des cellules de carcinomes colorectaux (Takei et al., 2005), de cancers hépatiques (Dai et al., 2006) et de cancers gastriques (Wang et al., 2007a). Cette propriété de la Midkine nécessite sa translocation nucléaire et passerait par la stimulation de la transcription d'ARN ribosomiaux et la biogenèse de ribosomes (Dai et al., 2008). Cependant, les mécanismes par lesquels la Midkine augmente ces transcriptions ne sont pas encore élucidés. Deux hypothèses sont envisagées, soit la Midkine interagirait avec la machinerie de l'ARN Pol I, soit elle se lierait directement à l'ADN.

- Rôle de la Midkine dans l'apoptose

Un des rôles principaux de la Midkine est le maintien des cellules tumorales par l'inhibition de l'apoptose. De nombreuses études visant à bloquer l'expression de la Midkine dans ces cellules ont permis de démontrer l'effet anti-apoptotique de cette protéine. La Midkine permettrait notamment d'inhiber les voies de l'apoptose passant par les caspases 3, 9 et 8 (Wang et al., 2007a). Des blocages de la Midkine ont également montré une diminution du taux de protéines anti-apoptotiques telles que la Survivine et Bcl-2, ainsi qu'une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax. Cette inhibition de la Midkine permettrait également la dépolérisation de la membrane mitochondriale avec un relargage de cytochrome C, une protéine pro-apoptotique de la membrane interne des mitochondries. De plus, la Midkine protégerait les cellules tumorales des apoptoses induites par la voie TRAIL (Ohuchida et al., 2004) ainsi que par le TNF- α (You et al., 2008).

- Rôle de la Midkine dans l'angiogénèse

La Midkine semble être également un facteur angiogénique bien que le mécanisme de cette propriété soit encore mal connu. Des études montrent en effet que des cellules tumorales exprimant la Midkine se développent beaucoup plus vite *in vivo* qu'*in vitro*, ce qui n'est pas observé pour les mêmes cellules tumorales dépourvues de Midkine. Cette différence de croissance est corrélée à une augmentation vasculaire et à une plus grande prolifération des cellules endothéliales *in vivo* (Choudhuri et al., 1997; Muramaki et al., 2003). En 2007, l'équipe du Dr Ruan a montré chez 62 patients atteints de carcinomes buccaux, que de hauts niveaux d'expression de Midkine sont associés aux tumeurs présentant les plus hautes densités de micro vaisseaux et les plus forts taux de facteurs de croissance vasculaire endothéliale tel que le VEGF (Vascular endothelial growth factor) (Ruan et al., 2007).

3.4. La Midkine est une cible moléculaire

Compte tenu du fait que la Midkine a des fonctions importantes dans le développement et le maintien des cellules tumorales, de nombreuses études visant à bloquer son expression ont été faites. Les stratégies employées sont aussi diverses que l'utilisation de siRNA ou d'antisens oligonucléotidiques.

Ces études, menées *in vivo* et *in vitro*, montrent que le blocage de l'expression de la Midkine permet la diminution de la croissance de tumeurs, notamment des carcinomes hépatiques (Dai et al., 2006), des adénocarcinomes de la prostate et des carcinomes colorectaux (Takei et al., 2006). Cette diminution de croissance est associée à une augmentation de la sensibilité des tumeurs à des agents chimiothérapeutiques tels que le -Fu, l'ADM, le DDP et le Paclitaxel (PTX).

Ces résultats confirment que la perte d'expression de la Midkine n'a pas d'effets néfastes sur les tissus sains de l'organisme. Ils suggèrent également que la Midkine soit impliquée dans la résistance des cellules tumorales à des agents anticancéreux.

De plus, du fait de l'expression fréquente de la Midkine dans les tumeurs, son promoteur a été utilisé dans des stratégies de gène-suicide (Adachi et al., 2000; Miyauchi et al., 2001).

B. Étude de la capacité de la Midkine à induire des réponses T CD8+ in vitro et in vivo

1. Objectifs

Comme nous venons de le voir, la Midkine est une protéine surexprimée dans de nombreuses cellules tumorales, qui joue un rôle important dans la survie de ces dernières. Du fait de sa large expression et de ses fonctions, nous avons étudié dans quelle mesure la Midkine pourrait être une cible immunothérapeutique.

Pour cela, nous avons tout d'abord étudié la capacité de cette protéine à induire des réponses T cytotoxiques *in vitro* mais également *in vivo*. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Olivier Adotevi qui a réalisé l'étude de l'immunogénicité de la Midkine *in vivo* dans des souris transgéniques HHD.

2. Présentation de l'article

Dans la première partie de notre étude, nous avons vérifié l'expression de la Midkine par cytométrie de flux dans des cellules saines et tumorales. Une forte expression a été mesurée dans des cellules tumorales comme les HepG2 (cellules d'hépatocarcinomes) et A549 (carcinomes de colon). A l'inverse, aucune expression n'a été observée dans des cellules saines telles que les DC ou les lymphocytes.

Nous avons ensuite sélectionné des épitopes T CD8+ restreints à HLA-A2 dans la séquence protéique à l'aide de logiciels de prédiction. Ainsi, 14 peptides de 9 ou 10 acides aminés ont été sélectionnés, synthétisés et purifiés par chromatographie (HPLC).

Nous avons testé la capacité de ces peptides à induire des lignées T CD8+ issues de donneurs sains HLA-A2. Nous avons obtenu des lignées T CD8+ spécifiques pour plusieurs peptides et restreints à la molécule HLA-A2. Nous avons observé que la réponse T était principalement dominée par 2 peptides localisés dans les parties N et C terminales de la protéine (13-21 et 114-122). L'activation des lignées T a été évaluée par Elispot IFN- γ et par marquage à l'aide de tétramères HLA-A2.

De plus, les lignées T CD8⁺ spécifiques pour ces deux peptides se sont montrées capables de reconnaître des cellules transfectées avec un plasmide portant le gène codant pour la Midkine ainsi que des cellules tumorales exprimant naturellement cette protéine. Ces résultats montrent que les peptides 13-21 et 114-122 sont naturellement apprêtés et présentés par les cellules étudiées et que le taux endogène de la Midkine dans des cellules tumorales est suffisant pour qu'une reconnaissance par des CTL spécifiques de cette protéine ait lieu.

Au vu de ces résultats, nous avons étudié la capacité de la Midkine à induire des réponses T *in vivo*. Des expériences réalisées dans des souris transgéniques HLA-A2, immunisées avec les peptides individuels ou un plasmide contenant la séquence codant pour la Midkine, ont permis de confirmer la capacité des deux épitopes T CD8⁺ identifiés à induire des LT spécifiques. De plus, des tests de cytotoxicité (51Cr) montrent que ces cellules T CD8⁺ sont capables de lyser des cellules exprimant la Midkine. Les résultats des immunisations ADN prouvent également que ces deux peptides sont apprêtés et présentés efficacement *in vivo*.

L'épitope T CD8⁺ de la partie N-terminale (peptide 13-21), est localisé dans le peptide signal de la Midkine. Une étude de sa présentation à l'aide de cellules T2 transfectées ou non par le plasmide codant pour la Midkine a permis de démontrer qu'elle est TAP dépendante.

L'ensemble de nos travaux montrent que la Midkine est une nouvelle cible pour la vaccination contre de multiples cancers.

The angiogenic growth factor and biomarker midkine is a tumour-shared antigen¹

Jerome Kerzerho^{*}, Olivier Adotevi^{†‡}, Florence Anne Castelli^{*}, Magalie Dosset^{†‡}, Karine Bernardeau[§], Francois Lang[§], Eric Tartour^{†‡}, Bernard Maillere^{*}

^{*}CEA-Saclay, Institute of Biology and Technologies, SIMOPRO, Gif-sur-Yvette, F-91191, France.

[†]EA 4054 Université Paris-Descartes - ENVA,

[‡]Hôpital Européen Georges Pompidou. Unité d'immunologie biologique. AP-HP., 20 rue Leblanc 75015 Paris Paris.

[§]Inserm U601, Institut de Biologie, 44093 Nantes France

^{*}Corresponding author: Dr Bernard Maillere, CEA, iBiTecS, Institute of Biology and Technologies, SIMOPRO, Gif-sur-Yvette, F-91191, France. Phone: (33) 1 69 08 94 47 - Fax: (33) 1 69 08 90 71 - e-mail: bernard.maillere@cea.fr

Running Title: Midkine is a tumour-shared antigen

Key Words : Midkine, tumour antigen, CTL response, signal peptide, biomarker

¹ Financial support: This work was supported by the CEA and a grant from l'Institut National du Cancer (INCA).

Abstract

The angiogenic factor midkine is overexpressed in various human malignant tumours although its expression is low or undetectable in normal adult tissues. Its expression in tumours and its detection in plasma have been associated with poor disease outcome, while its blockade was found to contribute to tumour regression. By weekly stimulation of T lymphocytes harvested in HLA-A2 healthy donors, we derived CD8 T cell lines specific for several midkine peptides. The T cell response was mostly dominated by two nonamer peptides localized in the signal peptide and in the C terminal part of the protein, as assessed by IFN- γ Elispot and HLA-A2 tetramer labelling. Peptide-specific T cell lines recognized cells transfected with a midkine-encoded plasmid and tumour cell lines naturally expressing the midkine protein but not untransfected cells. T cell presentation of the two midkine epitopes was found to be TAP-dependent. Experiments performed in HLA-A2 transgenic mice (HHD) demonstrated the capacity of the two identified CD8 T cell epitopes to elicit a cytotoxic response. Altogether our data show that the secreted midkine protein is a candidate vaccine for multiple cancers.

Introduction

The number of well characterized tumour antigens has steadily increased in recent years. More than 200 class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte peptide epitopes have been characterized from multiple proteins (1). Tumour antigens differ widely in their expression pattern in tumour and healthy cells, in their contribution to tumour survival and their immunogenic properties. One major group of tumour antigens is represented by cancer-germline antigens encoded by genes that are totally silent in most normal tissues and are over-expressed in a variety of tumour types (2). Members of this group include genes encoding MAGE, BAGE or LAGE. Another important type of antigen is composed of differentiation antigens that are found in both the tumours and the healthy cells from which they derived. The most studied differentiation antigens are probably the MELA/MART-1 and gp100 proteins, which are present in both melanocytes and melanoma. Although both types of antigens appeared able to elicit a tumour-specific immune response, they are dispensable for the tumour and hence facilitate tumour escape from immune attack through loss of antigens (3, 4). Because of their strict tumour-restricted expression, cancer-germline antigens also suffer from inter-individual expression discrepancies in cancer patients (5, 6), while differentiation antigens are only found in a defined type of tumour. As a result, a few identified tumour antigens exhibit a wide expression in multiple cancer patients and contribute to survival and growth of cancer cells. These cancer targets mainly comprise telomerase reverse transcriptase (TERT) (7), which is required for the control of telomere length in the tumour, and survivin (8) and Bcl-2 (9), which provide resistance to apoptosis. T cell epitopes of these proteins (8-10) have been already delineated, but their efficiency in elicit a tumour-eradicating immune response is not formerly demonstrated.

Midkine (MDK) is a heparin-binding growth factor found as the product of a retinoic acid-responsive gene (11). This secreted protein has been found to be overexpressed in various human malignancies, such as bladder, prostate, breast, lung, liver and colon tumours, whereas its expression is typically low or undetectable in normal adult tissues (12-14) Its natural role is mainly to participate in neuronal development during embryogenesis (15). It has also been implicated in ischemic renal injury (16) and autoimmune responses (17). In tumour cells, MDK has not only an angiogenic role (18), but also a mitogenic (19) and anti-apoptotic function (20). Its blockade contributes to tumour regression in a mouse model (21) demonstrating its importance in tumour expansion. Interestingly, its expression in the tumour (12, 22) and its concentration in plasma (23) were found to be related to poor disease outcome. Its expression in tumours can be detected early (13), and it was therefore considered as a relevant biomarker of disease progression. Its expression in tumours can be determined by blood (23, 24) and urinary analysis (25). Because of its functions, its wide expression in tumours and its biomarker status, we have investigated whether MDK can induce a cellular cytotoxic response in humans. Both *in vitro* primary stimulation experiments performed with HLA-A2 healthy donors and immunization trials performed in HLA-A2 transgenic mice revealed the capacity of MDK to elicit tumour-specific CTL response.

Material and Methods

Peptides and proteins

MDK nonamer peptides were synthesized using standard 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry on an Advanced ChemTech Apex synthesizer (Advanced ChemTech Europe) and cleaved from the resin by 95% trifluoroacetic acid. If necessary, peptides were purified by reversed-phase HPLC on a C18 Vydac column (Interchim). Their purity was >90% as indicated by analytical HPLC. Sequences of the 13-21 and 114-122 peptides were ALLALTSAV and AQCQETIRV, respectively.

Construction of midkine expression plasmid

Total RNA was extracted from A549 cells and reverse transcribed into cDNA using reverse transcriptase and oligo(dT) (ImProm-II™ Reverse Transcription System, Promega). MDK cDNA was amplified by PCR using the upstream primer 5'-GTGGTGGGAATTCACCACCATGCAGCACCGAGGCTTCCTC-3' and the downstream primer 5'-AAACTCGAGCCAGGCTTGGCGTCTAGTC-3'. MDK cDNAs were digested with EcoRI and XhoI then ligated into pcDNA3.1 expression vector before digestion. The corresponding plasmid (pMDK) was purified on plasmid kit columns under endotoxin-free conditions (Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit).

Cell culture and transfection

A549 human lung carcinoma, CIR human B lymphoblast, HepG2 human hepatocellular carcinoma and DLD-1 human colorectal adenocarcinoma were from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). The pcDNA3.1-MDK (pMDK) (20 µg) was introduced into C1R-A2 cells (3×10^6 cells) by electroporation (0.9 kV, 250 µF, 0.4-cm gap) with a Gene Pulser II (Bio-Rad). The treated cells were suspended in 40 ml of prewarmed RPMI medium with 10% foetal serum and incubated under 5% CO₂/air at 37°C. Forty-eight hours later, transfection efficacy was assessed by flow cytometry as endogenous MDK expression in matured dendritic cells, HepG2 and DLD1 cells. Briefly, cells were permeabilized with 75 µl of fixation/permeabilization solution (BD Biosciences) for 20 min at 4°C and washed twice with BD Perm/Wash buffer plus 2% FCS (BD Biosciences). They were stained for 30 min on ice with anti-MDK-PE antibody (BD Biosciences) or anti-isotype control. Cell staining was assessed in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

Generation of Ag-specific CD8⁺ T cell lines from healthy donors

Blood cells were collected from anonymous healthy donors at the Etablissement Français du Sang (EFS, Rungis, France) as buffy-coat preparations after informed consent and following

EFS guidelines. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density centrifugation on Ficoll-Hyperpaque gradients (Sigma-Aldrich). HLA-A2 donors were identified by using extracellular staining with anti-HLA-A2-PE antibody (BD Biosciences). Monocyte-derived dendritic cells (DCs) were generated from plastic-adherent cells of PBMCs after 5–7 days of culture in AIM V medium (Invitrogen) supplemented with 1000 U/ml of recombinant human (rh)IL-4 and of rhGM-CSF (Tebu). Immature DCs were collected at day 5 or 6. Mature DCs were generated after addition of 1 µg/ml LPS (Sigma-Aldrich). CD8 T lymphocytes were isolated from the nonadherent phase by positive selection using an anti-CD8 mAb coupled to magnetic microbeads (Miltenyi Biotec) and by magnetic cell sorting, as recommended by the manufacturer. Mature DCs (10^6 cells/ml) were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 4 h in complete IMDM medium containing 5 µg/ml of α 2-microglobulin and a mixture of MDK peptides, each peptide being at a concentration of 10 µg/ml. Pulsed cells were washed and added at 10^4 per round-bottom microwell to $2 \cdot 10^5$ autologous CD8 lymphocytes in 200 µl IMDM supplemented by 1000 U/ml of IL-6 (R&D Systems) and 10 ng/ml IL-12 (R&D Systems). The CD8 T lymphocytes were restimulated on days 7, 14, and 21 with autologous DCs freshly loaded with the MDK peptides and were grown in complete IMDM medium supplemented with 10 U/ml IL-2 (R&D Systems) and 5 ng/ml IL-7 (R&D Systems). Flow cytometry analysis confirmed that growing cells were CD8 T lymphocytes. Specificity of the T cell lines was investigated by IFN- γ Elispot assays at day 28 as described previously (10). Antigen-presenting cells (APCs) were autologous C1R-A2 cells.

In vivo immunogenicity studies

H-2 class I knockout, HLA-A*0201-transgenic mice (HHD II) have been previously described (26). Eight- to 10-week-old female mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions in our animal facility. HHD mice were injected subcutaneously (s.c.) at day 0 and day 14 with 50 µg MDK peptides 13-21 or 114-122 along with 140 µg of I-A^b MHC Class II helper peptide TPPAYRPPNAIL (T13L), which corresponds to amino acids 128–140 of the hepatitis B virus core protein, in incomplete Freund's adjuvant (IFA). For DNA immunizations, HHD mice were injected with 50 µl of cardiotoxin into each regenerating tibialis anterior muscle 5-6 days prior to DNA injection. Fifty µl of pMDK (1 µg/µl in PBS) was injected directly into each pre-treated muscle at day 0 and day 14. Seven to ten days after the last immunization, spleen cells of immunized mice were harvested and Ficoll-purified lymphocytes were isolated. Specific T cells were detected *ex vivo* using Elispot assay. For CTL function analysis, splenocytes were stimulated for 5-6 days with peptide-pulsed (10 µg/ml) γ -irradiated (5000 rads) syngenic splenocytes. Specific cytotoxic activity of effector CTL was measured by standard ⁵¹Cr release assay.

Results

MDK expression in tumour cell lines and healthy cells

As MDK expression has been mostly evaluated at the transcriptional level, we evaluated its protein expression by flow cytometry. As shown in Figure 1, MDK was easily detected in the hepatocarcinoma HepG2 cell line (Fig. 1A), while its expression was extremely low in DLD1 cells (Fig. 1B). MDK was also weakly expressed in the CIR-A2 cell line, while CIR-A2 cells transfected with a plasmid encoding MDK exhibited a high expression of MDK (Fig. 1C). In contrast, human dendritic cells did not express MDK (Fig. 1D). We also observed good expression of MDK in A549 cell lines, while it was not expressed in monocytes, lymphocytes or activated T lymphocytes (data not shown). We thus confirmed that MDK was overexpressed in multiple tumour cell lines in contrast to healthy cells, derived from the blood.

Induction of MDK peptide-specific T cell lines

Based on HLA-A2 scores provided by the prediction programs BIMAS, SYFPEITHI and PROPPRED, 14 peptides of 9 to 10 amino acids were initially selected for preliminary T cell priming experiments. These experiments included three HLA-A2+ healthy individuals. CD8 T cell lines were obtained after 3 weekly stimulations by autologous mature DCs loaded with a mixture of selected peptides and characterized by IFN- γ Elispot. Seven peptides, namely 13-21, 12-21, 13-22, 14-22, 63-72, 113-122 and 114-122, elicited peptide-specific T cell lines and were retained for further experiments. As shown in Figure 1 (upper panels), T cell lines 314.48 and 267.29 were activated by MDK⁻ HLA-A2+ CIR-A2 cells presenting the peptides 113-122 and 114-122 or 12-21 and 13-21, respectively. Omission of the peptides or addition of inappropriate peptides did not activate them. Dose range experiments (lower panels) showed that the optimal peptides were the 9-mers 114-122 and 13-21. They were recognized at low concentration as compared with the 10-mers 113-122 and 12-21, the mid-activating dose being around 0.01 $\mu\text{g/ml}$ (equivalent to 10^{-8} M). The peptide-specific T cells appeared therefore to possess a good affinity for the corresponding peptide/HLA-A2 complexes. As exemplified by T cell lines shown in Figure 2, all the T cell lines were specific for one to two overlapping peptides in agreement with labelling experiments using peptide-specific HLA-A2 tetramers. As shown in Figure 3, the T cell line 314.7, which was specific for the 114-122 peptide in Elispot (not shown), was nicely labelled by the corresponding HLA-A2 tetramers, although very few cells were labelled by the 13-21 specific tetramer. In contrast, the T cell line 297.58, which was specific for the peptide 13-21 in Elispot, was labelled by the 13-21 specific tetramer, but not by the 114-122 specific tetramer. For both T cell lines, approximately 7% of the cells were peptide-specific, confirming their good peptide specificity. From twelve different HLA-A2+ healthy donors, we derived seven T cell lines specific for peptide 13-21 and eight T cell lines specific for peptide 114-122, the other

peptides stimulating few T cell lines (not shown). We therefore demonstrated that peptides 13-21 and 114-122 were able to prime a CD8 T cell response in HLA-A2+ healthy donors.

Restriction, function and tumour specificity of peptide-specific T cell lines

HLA-A2 restriction of five T cell lines was confirmed using HLA-A2 transfected and untransfected APCs. Representative experiments with the T cell lines 314.48 and 297.58 are presented in Fig 4A. In contrast to the HLA-A2⁺ CIR-A2 cells, HLA class I deficient CIR cells were unable to present the appropriate peptide to T cell lines specific for either 13-21 or 114-122. Moreover, transfection of MDK plasmid into MDK⁻ CIR-A2 cells was as efficient as peptides 13-21 or 114-122 in stimulating the T cells, demonstrating that both epitopes were appropriately processed and presented by the APCs. Because transfection led to a higher production of endogenous MDK, we also assessed whether cells (HepG2) naturally expressing MDK could be recognized by the peptide-specific T cell lines. Seven peptide-specific T cell lines were tested for tumour cell line recognition. As shown for four different T cell lines specific for 114-122 (Fig 4B, left panels) and 13-21 (Fig 4B, right panels), very strong stimulation of all the T cell lines occurred in the presence of the MDK⁺ HepG2 cell line, while CIR-A2 and DLD1 were almost unable to activate them. We also evaluated the cytotoxicity of the T cell lines by their capacity to release perforin (Fig 4C). T cell lines 365.55, which were specific for peptides 114-122 and 365.36, and which were specific for peptide 13-21, gave rise to a large number of perforin spots when they were in contact with CIR-A2 loaded with the appropriate peptide or with HepG2. They remained inactivated in contact with unloaded CIR-A2 cell lines. Finally, we also investigated the Tap dependence of the MDK presentation using Tap-deficient T2 cells (Fig 5D). Although the peptides were efficiently presented to peptide-specific T cell, transfection of the T2 cells with MDK plasmid did not restore T cell stimulation. This plasmid was, however, used with success to activate the same T cell lines (Fig 4A) by transfection of CIR-A2. Presentation of both 13-21 and 114-122 appeared to be TAP-dependent. Altogether, MDK peptides 13-21 and 114-122 elicit HLA-A2 restricted T cells in different donors. The T cells were cytotoxic and specifically recognized MDK⁺ tumour cells and MDK transfected cell lines.

Induction of MDK-specific T cells in HHD mice.

We also investigated the immunogenic properties of MDK encoding plasmid and the identified CD8 T cell epitopes in HHD mice. Mice were immunized with the MDK-encoding plasmid (Fig 5A) or the individual peptides (Fig 5B), and the ex vivo T cell response specific to the two HLA-A2 restricted peptides was evaluated by IFN- γ Elispot. All the individual mice immunized with the MDK-encoding plasmid exhibited a T cell response to the peptides 114-122 and 13-21. Immunization with individual peptides led to good peptide-specific T cell responses in all the mice. Finally, cytotoxic activity of the peptide-specific T cells was demonstrated by the ⁵¹Cr release assay (Fig 5C). Our data obtained *in vitro* on human cells or *in vivo* in HLA-A2 transgenic mice show that MDK constitutes a novel tumour-shared antigen.

Discussion

We provide the first evidence that the protein MDK can be considered as a tumour-shared antigen. Human CD8⁺ T cell response specific for MDK-expressing tumour cells was induced *in vitro* using PBMCs from healthy donors and immunized HHD transgenic mice developed a cytotoxic response specific for MDK. Because of its wide expression in cancer tissues and its contribution to tumorigenesis, MDK appears as an attractive candidate for a cancer vaccine. Moreover, as its expression can be detected in the blood, this vaccine could be applied in an adapted manner.

MDK was initially isolated as a protein induced in the early stage of differentiation of embryonal carcinoma cells (11). Further investigations demonstrated its wide expression in tumours (12-14) and its multiple functions in favour of tumour expansion (27). These studies supported therapeutic strategies based on MDK neutralization using anti-sense DNA (21) or antibodies (28) to block the growth of tumour cells. A gene suicide-based strategy using MDK promoter has been also proposed (29). We therefore considered the opportunity to target MDK by the cellular response in order to obtain a T cell response specific for a wide range of tumours. Although a basal level of MDK was seen in healthy individuals, we did not fear some deleterious effect in eliciting an MDK-specific cytotoxic response. Although required for neuronal embryogenesis, its role in adults rarely appears beneficial as MDK seems to participate in ischemic renal injury (16) and autoimmune responses (17). Accordingly, MDK-deficient mice do not exhibit serious developmental abnormalities (16, 30), and mice vaccinated with peptides and DNA in our studies did not show any signs of autoimmunity. Finally, its crucial role in tumour growth is expected to limit tumour escape from immune attack through its selective loss. Its angiogenic function is extremely attractive to limit metastasis as proposed for the angiogenic-cell growth factor-1, for which a mutated form has been found to be the natural target of CTL T cells in patients with multiple myeloma (31).

MDK is a secreted protein as other identified tumour antigens (32-35) and is therefore produced in the endoplasmic reticulum (ER) after cleavage of the signal peptide. As presentation of the MDK peptide 114-122 appeared to be TAP-dependent, three alternative pathways could be employed to present it to CD8 T cells. First, secreted proteins like calreticulin (36) could be present in the cytosol due to an aborted translocation mechanism. Alternatively, the secreted molecule is either translocated from the ER into the cytosol (37) or captured by the APCs through a receptor-mediated mechanism, as shown for MMP-2 (33). Capture by the LRP receptor has indeed been implicated in the targeting of MDK to proteasome degradation (38). Interestingly, the T cell epitope MDK 13-21 we identified in HLA-A2 healthy donors and HLA-A2 transgenic mice is localized in the signal peptide (MDK 1-22). Signal peptides comprise multiple hydrophobic residues that serve to anchor the nascent polypeptide to the membrane (39). They could also serve as anchor residues for HLA class I molecules, especially for HLA-A2, which has a marked preference for hydrophobic residues (40). Accordingly, elution of naturally processed peptides revealed their natural presentation by HLA-A class I molecules (41), and CD8 T cell epitopes derived from signal peptides have been described in virus (42) and tumour antigens (43, 44). In contrast to a recently identified T

cell epitope localized in the peptide signal of preprocalcitonin (34), the 13-21 MDK T cell epitope did not seem to be processed in the lumen of the ER but required translocation from the cytosol to the ER by the TAP transporter and hence should be processed in the cytosol. This is not a particular feature of MDK CD8 T cell epitopes as presentation of other epitopes derived from the signal peptide was also TAP-dependent (42)

Finally, MDK has been proposed as a biomarker for diagnosis of tumour-bearing patients. MDK was found to be expressed at early stages of carcinogenesis of colorectal (13) and prostate (45) cancers. As a secreted protein, MDK can also be quantitated in the serum (46). In healthy donors, the serum level of MK is around 0.15 ng/ml with a cut-off of 0.5 ng/ml, while it is significantly higher in various types of human carcinomas (47), such as hepatocellular (47) oesophageal (48), gastric (49), and neuroblastoma cancers (23). MDK was detectable at early stages (47) and the plasma level has been reported to be correlated with poor outcome (23, 24). Interestingly, MDK was also detectable in urine samples of cancer patients (25). Although significant, the increase in serum concentration observed between healthy and cancer patients remains limited (47). This increase is therefore not expected to dramatically alter the CD8 T cell response observed with healthy donors, because this response seems to be affected by high concentrations of soluble antigens only (50). In contrast to many tumour antigens, MDK expression in tumours could be revealed by its detection in the blood or the urine. MDK-based vaccination using peptides, DNA, the whole protein or viral vectors could be applied to patients, who have a significant level of MDK in their body fluids.

In conclusion, our data show that the secreted MDK protein is a new candidate vaccine for multiple cancers. This novel antigen has multiple advantages as it is widely expressed in tumour cells and its important functions for the tumour hinder tumour escape from immune attack through loss of antigen. Furthermore, MDK could be employed through adaptive vaccination in cancer patients exhibiting elevated serum MDK levels only.

Figure Legends

Figure 1: Flow cytometry analysis of MDK expression in normal and tumour cells.

Cells were stained intracellularly with an MDK-specific antibody and analyzed by flow cytometry. HepG2 DC (Panel A), DLD1 (Panel B), C1R-A2 (Panel C) and DC (Panel D) cells.

Black, endogenous expression of MDK; grey, expression of MDK after transfection with the MDK plasmid; open, isotype control

Figure 2: Peptide specificity of T cell lines derived from HLA-A2 healthy donors 314 and 297.

CD8 T cell lines 314.48 (left panels) and 267.29 (right panels) were obtained after 3 weekly stimulations by autologous mature dendritic cells loaded with a mixture of seven selected peptides (13-22, 13-21, 12-21, 14-22, 63-72, 113-122, and 114-122). Lymphocytes (10^4 /well) were incubated in duplicate with $3 \cdot 10^3$ C1R-A2 cells in the presence or absence of peptides (upper panels) or a dose range of appropriate peptides (lower panels). The specificity of the T cell lines was assessed by IFN- γ Elispot after 24-h incubation.

Figure 3: Tetramer labelling of peptide-specific T cell lines.

T cell lines 314.7 (A and C) and 297.58 (B and D) are specific to the peptides 114-122 and 13-21, respectively. Each line was stained with anti-CD8-FITC and PE-labelled HLA-A2/114-122 (A and B) or HLA-A2/13-21 (C and D) tetramers and analyzed by flow cytometry. The percentage of each cell population is indicated in the corresponding quadrants.

Figure 4: HLA-A2 restriction of peptide-specific T cell lines and stimulation by tumour cells

A) HLA-A2 transfected C1R cells (C1R-A2) and C1R cells were pulsed for 4 h with peptide 13-21 or 114-122. C1R-A2 cells were transfected with the MDK plasmid. These lines were incubated ($3 \cdot 10^4$ cells/well) with 114-122 (314.48) or 13-21 (297.58) specific T cell lines in IFN- γ Elispot assays. B) HLA-A2+ C1R-A2 (MDK-), DLD1 (MDK-) and HepG2 (MDK+) were incubated (30,000 cells/well) with 114-122 (314.48 and 267.21) and 13-21 (297.58 and 267.29) specific lines. T cell activation was revealed by IFN- γ Elispot assay. C) Same conditions as in A) but activation was revealed by perforin Elispot. D) Same conditions as in A) using Tap-deficient T2 cell line.

Figure 5: Induction of MDK-specific CTL responses in HHD transgenic mice

Groups of four HHD transgenic mice (M1, M2, M3 and M4) were immunized with MDK DNA (A) or with the individual peptides 114-122 (B; left panel) and 13-21 (B; right panel). At day 10, splenocytes were harvested and incubated ($1 \cdot 10^5$ cells/well) with 2.5 μ g/ml MDK

peptide 13-21 (grey) or 114-122 (black) or with culture medium (white). T cell activation was evaluated by IFN- γ Elispot assay. Data were reported for each mouse. C) Splenocytes of four HHD transgenic mice immunized with MDK DNA were stimulated with the individual peptides 114-122 (left panel) and 13-21 (right panel) for one week. A standard 4-h ^{51}Cr release assay was then performed using RMAS-HHD cells pulsed for 4 h with the individual MDK peptides (black squares) or an irrelevant peptide (white square) as targets, at the indicated E:T ratios (100 represents $1 \cdot 10^5$ effector cells/well). Results are expressed as the mean specific lysis obtained with four mice.

References

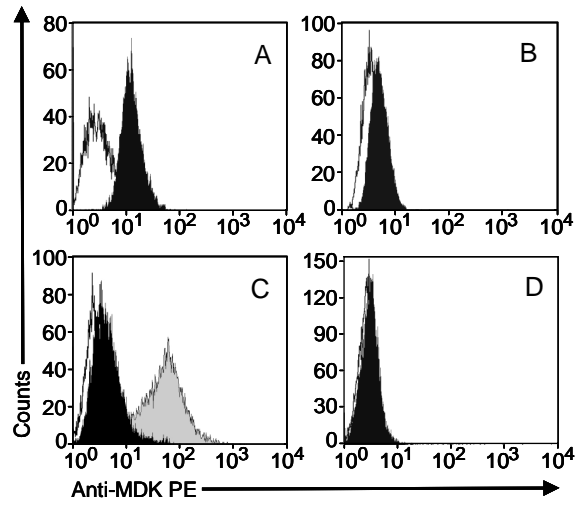
1. Novellino, L., Castelli, C., and Parmiani, G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother*, *54*: 187-207, 2005.
2. Boon, T., Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., and van der Bruggen, P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol*, *24*: 175-208, 2006.
3. Jager, E., Ringhoffer, M., Altmannsberger, M., Arand, M., Karbach, J., Jager, D., Oesch, F., and Knuth, A. Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int J Cancer*, *71*: 142-147, 1997.
4. Riker, A., Cormier, J., Panelli, M., Kammula, U., Wang, E., Abati, A., Fetsch, P., Lee, K. H., Steinberg, S., Rosenberg, S., and Marincola, F. Immune selection after antigen-specific immunotherapy of melanoma. *Surgery*, *126*: 112-120, 1999.
5. Brasseur, F., Marchand, M., Vanwijck, R., Herin, M., Lethe, B., Chomez, P., and Boon, T. Human gene MAGE-1, which codes for a tumor-rejection antigen, is expressed by some breast tumors. *Int J Cancer*, *52*: 839-841, 1992.
6. Serrano, A., Lethe, B., Delroisse, J. M., Lurquin, C., De Plaen, E., Brasseur, F., Rimoldi, D., and Boon, T. Quantitative evaluation of the expression of MAGE genes in tumors by limiting dilution of cDNA libraries. *Int J Cancer*, *83*: 664-669, 1999.
7. Vonderheide, R. H., Hahn, W. C., Schultze, J. L., and Nadler, L. M. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, *10*: 673-679, 1999.
8. Schmitz, M., Diestelkoetter, P., Weigle, B., Schmachtenberg, F., Stevanovic, S., Ockert, D., Rammensee, H. G., and Rieber, E. P. Generation of survivin-specific CD8⁺ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res*, *60*: 4845-4849, 2000.
9. Andersen, M. H., Becker, J. C., and Thor Straten, P. The antiapoptotic member of the Bcl-2 family Mcl-1 is a CTL target in cancer patients. *Leukemia*, *19*: 484-485, 2005.
10. Wang, X. F., Kerzerho, J., Adotevi, O., Nuytens, H., Badoual, C., Munier, G., Oudard, S., Tu, S., Tartour, E., and Maillere, B. Comprehensive Analysis of HLA-DR- and HLA-DP4-Restricted CD4⁺ T Cell Response Specific for the Tumor-Shared Antigen Survivin in Healthy Donors and Cancer Patients. *J Immunol*, *181*: 431-439, 2008.
11. Kadomatsu, K., Tomomura, M., and Muramatsu, T. cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, *151*: 1312-1318, 1988.

12. O'Brien, T., Cranston, D., Fuggle, S., Bicknell, R., and Harris, A. L. The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res*, *56*: 2515-2518, 1996.
13. Ye, C., Qi, M., Fan, Q. W., Ito, K., Akiyama, S., Kasai, Y., Matsuyama, M., Muramatsu, T., and Kadomatsu, K. Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer. *Br J Cancer*, *79*: 179-184, 1999.
14. Koide, N., Hada, H., Shinji, T., Ujike, K., Hirasaki, S., Yumoto, Y., Hanafusa, T., Kadomatsu, K., Muramatsu, H., Muramatsu, T., and Tsuji, T. Expression of the midkine gene in human hepatocellular carcinomas. *Hepatogastroenterology*, *46*: 3189-3196, 1999.
15. Haynes, L. and Rumsby, M. The pleiotropin/midkine family of cytokines: role in glial-neuronal signalling. *Prog Brain Res*, *132*: 313-324, 2001.
16. Sato, W., Kadomatsu, K., Yuzawa, Y., Muramatsu, H., Hotta, N., Matsuo, S., and Muramatsu, T. Midkine is involved in neutrophil infiltration into the tubulointerstitium in ischemic renal injury. *J Immunol*, *167*: 3463-3469, 2001.
17. Maruyama, K., Muramatsu, H., Ishiguro, N., and Muramatsu, T. Midkine, a heparin-binding growth factor, is fundamentally involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, *50*: 1420-1429, 2004.
18. Choudhuri, R., Zhang, H. T., Donnini, S., Ziche, M., and Bicknell, R. An angiogenic role for the neurokines midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res*, *57*: 1814-1819, 1997.
19. Muramatsu, H. and Muramatsu, T. Purification of recombinant midkine and examination of its biological activities: functional comparison of new heparin binding factors. *Biochem Biophys Res Commun*, *177*: 652-658, 1991.
20. Wang, Q., Huang, Y., Ni, Y., Wang, H., and Hou, Y. siRNA targeting midkine inhibits gastric cancer cells growth and induces apoptosis involved caspase-3,8,9 activation and mitochondrial depolarization. *J Biomed Sci*, *14*: 783-795, 2007.
21. Takei, Y., Kadomatsu, K., Matsuo, S., Itoh, H., Nakazawa, K., Kubota, S., and Muramatsu, T. Antisense oligodeoxynucleotide targeted to Midkine, a heparin-binding growth factor, suppresses tumorigenicity of mouse rectal carcinoma cells. *Cancer Res*, *61*: 8486-8491, 2001.
22. Maeda, S., Shinchu, H., Kurahara, H., Mataka, Y., Noma, H., Maemura, K., Aridome, K., Yokomine, T., Natsugoe, S., Aikou, T., and Takao, S. Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma. *Br J Cancer*, *97*: 405-411, 2007.
23. Ikematsu, S., Nakagawara, A., Nakamura, Y., Ohira, M., Shinjo, M., Kishida, S., and Kadomatsu, K. Plasma midkine level is a prognostic factor for human neuroblastoma. *Cancer Sci*, *99*: 2070-2074, 2008.

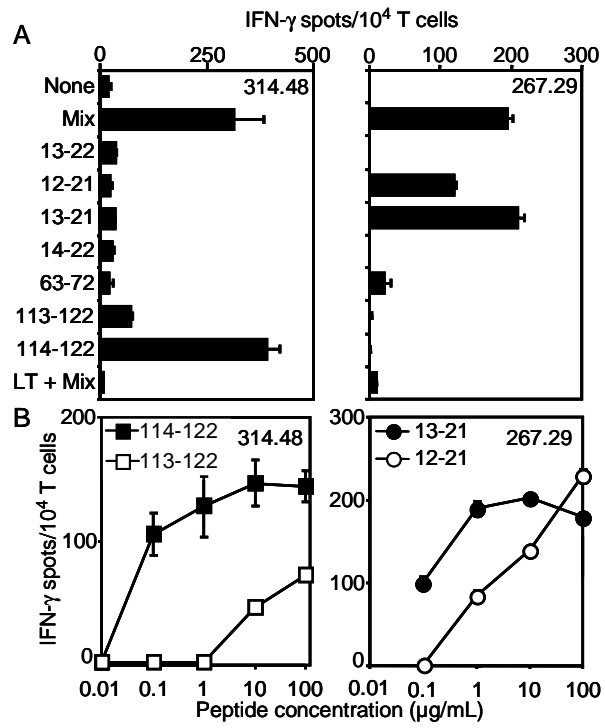
24. Kaifi, J. T., Fiegel, H. C., Rafnsdottir, S. L., Aridome, K., Schurr, P. G., Reichelt, U., Wachowiak, R., Kleinhans, H., Yekebas, E. F., Mann, O., Ichihara-Tanaka, K., Muramatsu, T., Kluth, D., Strate, T., and Izbicki, J. R. Midkine as a prognostic marker for gastrointestinal stromal tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*, *133*: 431-435, 2007.
25. Ikematsu, S., Okamoto, K., Yoshida, Y., Oda, M., Sugano-Nagano, H., Ashida, K., Kumai, H., Kadomatsu, K., Muramatsu, H., Takashi, M., and Sakuma, S. High levels of urinary midkine in various cancer patients. *Biochem Biophys Res Commun*, *306*: 329-332, 2003.
26. Firat, H., Garcia-Pons, F., Tourdot, S., Pascolo, S., Scardino, A., Garcia, Z., Michel, M. L., Jack, R. W., Jung, G., Kosmatopoulos, K., Mateo, L., Suhrbier, A., Lemonnier, F. A., and Langlade-Demoyen, P. H-2 class I knockout, HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies. *Eur J Immunol*, *29*: 3112-3121, 1999.
27. Kadomatsu, K. and Muramatsu, T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett*, *204*: 127-143, 2004.
28. Maehara, H., Kaname, T., Yanagi, K., Hanzawa, H., Owan, I., Kinjou, T., Kadomatsu, K., Ikematsu, S., Iwamasa, T., Kanaya, F., and Naritomi, K. Midkine as a novel target for antibody therapy in osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun*, *358*: 757-762, 2007.
29. Miyauchi, M., Yoshida, Y., Tada, Y., Narita, M., Maeda, T., Bahar, R., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Matsubara, S., Nakagawara, A., Sakiyama, S., and Tagawa, M. Expression of herpes simplex virus-thymidine kinase gene controlled by a promoter region of the midkine gene confers selective cytotoxicity to ganciclovir in human carcinoma cells. *Int J Cancer*, *91*: 723-727, 2001.
30. Zou, P., Muramatsu, H., Sone, M., Hayashi, H., Nakashima, T., and Muramatsu, T. Mice doubly deficient in the midkine and pleiotrophin genes exhibit deficits in the expression of beta-tectorin gene and in auditory response. *Lab Invest*, *86*: 645-653, 2006.
31. Slager, E. H., Honders, M. W., van der Meijden, E. D., van Luxemburg-Heijs, S. A., Kloosterboer, F. M., Kester, M. G., Jedema, I., Marijt, W. A., Schaafsma, M. R., Willemze, R., and Falkenburg, J. H. Identification of the angiogenic endothelial-cell growth factor-1/thymidine phosphorylase as a potential target for immunotherapy of cancer. *Blood*, *107*: 4954-4960, 2006.
32. Correale, P., Walmsley, K., Zaremba, S., Zhu, M., Schlom, J., and Tsang, K. Y. Generation of human cytolytic T lymphocyte lines directed against prostate-specific antigen (PSA) employing a PSA oligopeptide peptide. *J Immunol*, *161*: 3186-3194, 1998.

33. Godefroy, E., Moreau-Aubry, A., Diez, E., Dreno, B., Jotereau, F., and Guilloux, Y. alpha v beta3-dependent cross-presentation of matrix metalloproteinase-2 by melanoma cells gives rise to a new tumor antigen. *J Exp Med*, *202*: 61-72, 2005.
34. El Hage, F., Stroobant, V., Vergnon, I., Baurain, J. F., Echchakir, H., Lazar, V., Chouaib, S., Coulie, P. G., and Mami-Chouaib, F. Preprocalcitonin signal peptide generates a cytotoxic T lymphocyte-defined tumor epitope processed by a proteasome-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*: 10119-10124, 2008.
35. Yokoyama, Y., Grunebach, F., Schmidt, S. M., Heine, A., Hantschel, M., Stevanovic, S., Rammensee, H. G., and Brossart, P. Matrilysin (MMP-7) is a novel broadly expressed tumor antigen recognized by antigen-specific T cells. *Clin Cancer Res*, *14*: 5503-5511, 2008.
36. Shaffer, K. L., Sharma, A., Snapp, E. L., and Hegde, R. S. Regulation of protein compartmentalization expands the diversity of protein function. *Dev Cell*, *9*: 545-554, 2005.
37. Lilley, B. N. and Ploegh, H. L. A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature*, *429*: 834-840, 2004.
38. Suzuki, N., Shibata, Y., Urano, T., Murohara, T., Muramatsu, T., and Kadomatsu, K. Proteasomal degradation of the nuclear targeting growth factor midkine. *J Biol Chem*, *279*: 17785-17791, 2004.
39. Hegde, R. S. and Bernstein, H. D. The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem Sci*, *31*: 563-571, 2006.
40. Rammensee, H. G., Friede, T., and Stevanoviic, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, *41*: 178-228, 1995.
41. Wei, M. L. and Cresswell, P. HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature*, *356*: 443-446, 1992.
42. Gueguen, M., Biddison, W. E., and Long, E. O. T cell recognition of an HLA-A2-restricted epitope derived from a cleaved signal sequence. *J Exp Med*, *180*: 1989-1994, 1994.
43. Wolfel, C., Drexler, I., Van Pel, A., Thres, T., Leister, N., Herr, W., Sutter, G., Huber, C., and Wolfel, T. Transporter (TAP)- and proteasome-independent presentation of a melanoma-associated tyrosinase epitope. *Int J Cancer*, *88*: 432-438, 2000.
44. Mitchell, M. S., Lund, T. A., Sewell, A. K., Marincola, F. M., Paul, E., Schroder, K., Wilson, D. B., and Kan-Mitchell, J. The cytotoxic T cell response to peptide analogs of the HLA-A*0201-restricted MUC1 signal sequence epitope, M1.2. *Cancer Immunol Immunother*, *56*: 287-301, 2007.

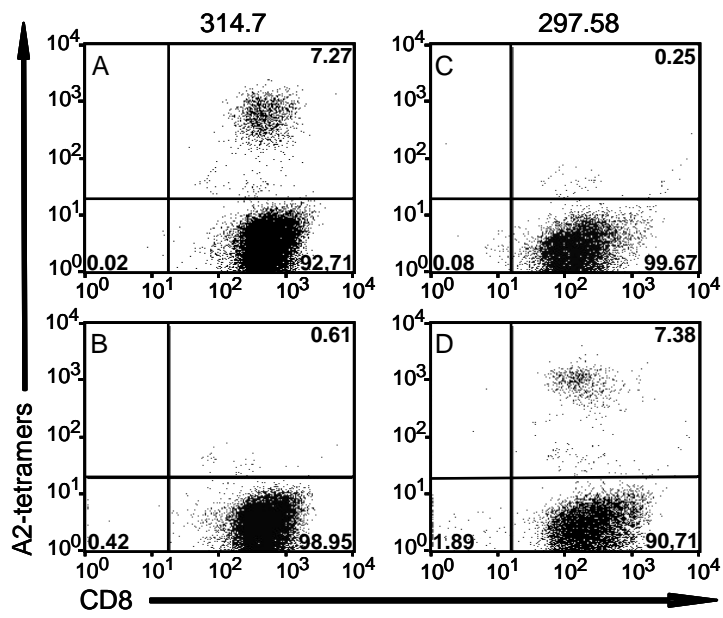
45. Konishi, N., Nakamura, M., Nakaoka, S., Hiasa, Y., Cho, M., Uemura, H., Hirao, Y., Muramatsu, T., and Kadomatsu, K. Immunohistochemical analysis of midkine expression in human prostate carcinoma. *Oncology*, 57: 253-257, 1999.
46. Muramatsu, H., Song, X. J., Koide, N., Hada, H., Tsuji, T., Kadomatsu, K., Inui, T., Kimura, T., Sakakibara, S., and Muramatsu, T. Enzyme-linked immunoassay for midkine, and its application to evaluation of midkine levels in developing mouse brain and sera from patients with hepatocellular carcinomas. *J Biochem*, 119: 1171-1175, 1996.
47. Ikematsu, S., Yano, A., Aridome, K., Kikuchi, M., Kumai, H., Nagano, H., Okamoto, K., Oda, M., Sakuma, S., Aikou, T., Muramatsu, H., Kadomatsu, K., and Muramatsu, T. Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas. *Br J Cancer*, 83: 701-706, 2000.
48. Shimada, H., Nabeya, Y., Tagawa, M., Okazumi, S., Matsubara, H., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Ikematsu, S., Sakuma, S., and Ochiai, T. Preoperative serum midkine concentration is a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, 94: 628-632, 2003.
49. Obata, Y., Kikuchi, S., Lin, Y., Yagyu, K., Muramatsu, T., and Kumai, H. Serum midkine concentrations and gastric cancer. *Cancer Sci*, 96: 54-56, 2005.
50. Loirat, D., Mancini-Bourgine, M., Abastado, J. P., and Michel, M. L. HBsAg/HLA-A2 transgenic mice: a model for T cell tolerance to hepatitis B surface antigen in chronic hepatitis B virus infection. *Int Immunol*, 15: 1125-1136, 2003.



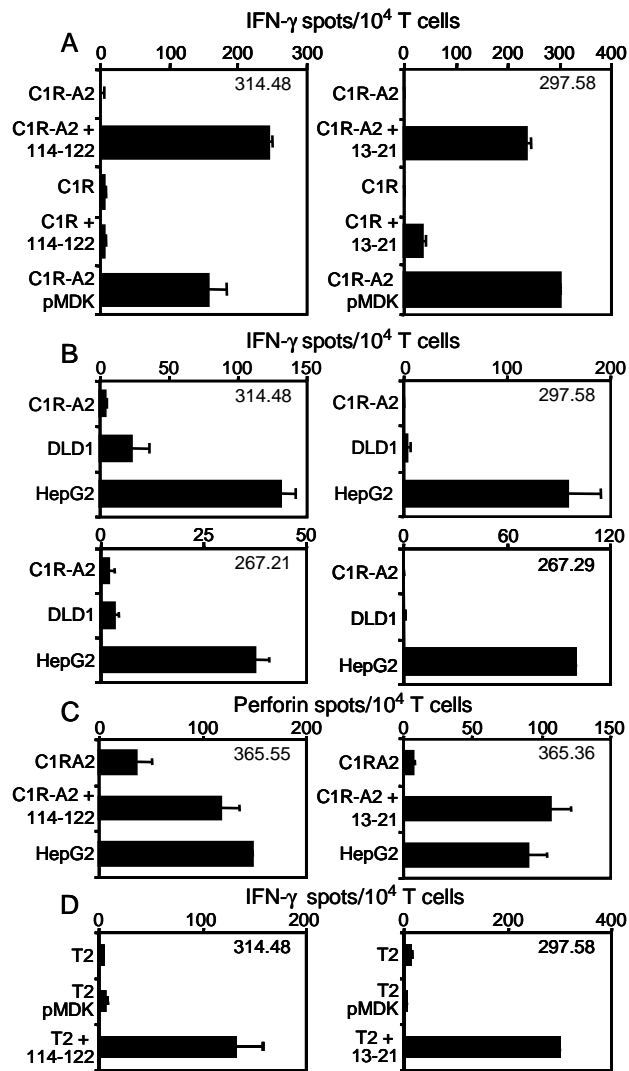
Kerzerho
Figure 1



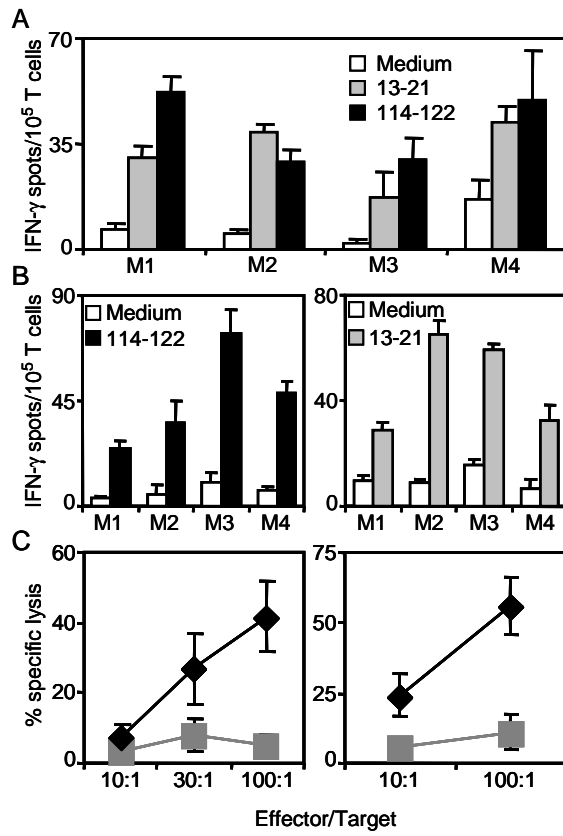
Kerzerho
Figure 2



Kerzerho
Figure 3



Kerzerho
Figure 4



Kerzerho
Figure 5

Pool 1

MDK1-15	M	Q	H	R	G	F	L	L	L	T	L	L	A	L	L
MDK4-19	R	G	F	L	L	L	T	L	L	A	L	L	A	L	T
MDK 9-23	L	T	L	L	A	L	L	A	L	T	S	A	V	A	K
MDK14-28	L	L	A	L	T	S	A	V	A	K	K	K	D	K	V
MDK18-32	T	S	A	V	A	K	K	K	D	K	V	K	K	G	G
MDK25-39	K	D	K	V	K	K	G	G	P	G	S	E	C	A	E
MDK 38-52	A	E	W	A	W	G	P	C	T	P	S	S	K	D	C
MDK 52-66	C	G	V	G	F	R	E	G	T	C	G	A	Q	T	Q
MDK64-78	Q	T	Q	R	I	R	C	R	V	P	C	N	W	K	K

Pool 2

MDK70-84	C	R	V	P	C	N	W	K	K	E	F	G	A	D	C
MDK74-88	C	N	W	K	K	E	F	G	A	D	C	K	Y	K	F
MDK78-92	K	E	F	G	A	D	C	K	Y	K	F	E	N	W	G
MDK84-98	C	K	Y	K	F	E	N	W	G	A	C	D	G	G	T
MDK89-103	E	N	W	G	A	C	D	G	G	T	G	T	K	V	R
MDK99-113	G	T	K	V	R	Q	G	T	L	K	K	A	R	Y	N
MDK105-119	G	T	L	K	K	A	R	Y	N	A	Q	C	Q	E	T
MDK110-124	A	R	Y	N	A	Q	C	Q	E	T	I	R	V	T	K
MDK118-132	E	T	I	R	V	T	K	P	C	T	P	K	T	K	A

Tableau 15 : Positions, séquences et répartition dans les pools des peptides de la Midkine synthétisés.

C. Identification d'épitopes T CD4+ dans la Midkine

Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, les cellules T CD4+ jouent un rôle crucial dans l'initiation et l'entretien de cellules T CD8+ effectrices ainsi que dans l'activation de cellules B pour la production d'anticorps. L'identification des épitopes T CD4+ est donc importante non seulement pour l'étude des réponses immunes spontanées spécifiques d'Ag des patients atteints de cancer mais également pour le développement des vaccins anticancéreux. C'est pourquoi, après avoir identifié les épitopes T CD8+ dans la séquence de la Midkine, notre objectif a été d'étudier la capacité de la Midkine à induire des réponses T CD4+.

1. Objectifs de travail

L'objectif de cette étude est d'identifier des épitopes T CD4+ dérivés de la Midkine qui présentent un intérêt à la fois pour la préparation de vaccins anti-tumoraux mais aussi pour le suivi de la réponse immune dirigée contre la Midkine. Notre stratégie s'est appuyée sur un protocole comprenant trois étapes :

1. Identifier des peptides de la Midkine se liant avec une bonne affinité à plusieurs molécules HLA-II par des tests de liaison *ex vivo*
2. Évaluer l'immunogénicité potentielle des différents peptides par des tests d'induction de L_T CD4+ *in vitro*.
3. Caractériser les propriétés des L_T CD4+ spécifiques induits par l'étude de leur restriction, des tests de dose réponse ainsi que l'évaluation de leur capacité de reconnaissance de lysats de tumeurs présentés par des cellules dendritique autologues.

2. Résultats

2.1 Synthèse de peptides et tests de liaisons aux molécules HLA-II

Dix-huit peptides chevauchants de 15 acides aminés couvrant la séquence de la Midkine ont été sélectionnés. Le découpage de la séquence de la Midkine en peptides n'a pas été effectué au hasard. Nous n'avons en effet retenu que les peptides contenant un résidu aliphatique ou aromatique dans leur partie N-terminale qui est nécessaire à la fixation aux molécules HLA-DR et HLA-DP4. Ils ont été synthétisés chimiquement en phase solide (stratégie Fmoc) sur un synthétiseur multiple et purifiés si nécessaire par chromatographie (HPLC). La qualité de chaque peptide a été contrôlée par spectrométrie de masse. Les positions et les séquences de ces 18 peptides dérivés de la Midkine sont données dans le Tableau 15.

Peptides	Activités relatives												Liaison
	DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR13	DR15	DRB3	DRB4	DRB5	DP401	DP402	HLA II
1-15	21	>419	226	49	7	>2 537	211	267	204	161	20	19	5
4-18	21	>419	136	20	94	>2 537	19	37	65	46	6	18	9
9-23	0,2	>419	1	13	0,3	>2 537	5	>485	>28 868	2	94	29	8
14-28	34	>419	401	590	48	45	>529	>485	>28 868	0,1	>879	>976	4
18-32	>5 291	>419	>1 812	>2 479	>1 086	132	>529	>485	>28 868	>2 100	>879	>976	0
25-39	1 251	>419	>1 812	>2 479	>1 086	>2 537	>529	>485	>28 868	>2 100	>879	>976	0
38-52	1 305	>419	1 859	>2 479	923	>2 537	>529	>485	>28 868	>2 100	>879	239	0
52-64	32	>419	701	>2 479	833	>2 537	>529	>485	>28 868	>2 100	>879	>976	1
64-78	246	>419	558	2 066	504	>2 537	>529	>485	1 155	61	>879	>976	1
70-84	53	>419	1 562	>2 479	>1 086	>2 537	>529	621	>28 868	>2 100	7	>976	2
74-88	333	2	>1 812	>2 479	1 231	>2 537	>529	877	>28 868	714	>879	>976	1
78-92	299	1	457	>2 479	800	>2 537	216	226	>28 868	114	167	378	1
84-98	187	>419	362	>2 479	>1 086	>2 537	141	>485	>28 868	292	52	49	2
89-103	1 460	>419	>1 812	>2 479	>1 086	>2 537	>529	2 333	>28 868	>2 100	>879	>976	0
99-113	3 000	>419	>1 812	>2 479	>1 086	74	>529	>485	>28 868	215	>879	>976	1
105-119	97	>419	492	>2 479	1 008	>2 537	225	>485	>28 868	>2 100	>879	>976	1
110-124	10	>419	6	158	69	>2 537	>529	>485	>28 868	15	>879	>976	4
119-133	2	>419	1 289	819	763	>2 537	>529	>485	>28 868	26	>879	>976	2

Tableau 16 : Tests de liaison des peptides de la Midkine aux molécules HLA-DR et HLA-DP4

Des peptides couvrant toute la séquence de la Midkine ont été soumis à un test de liaison sur des molécules HLA-DR et HLA-DP4. Des peptides référence ont été utilisés pour valider chaque test. Ces peptides sont les formes non biotinylés des peptides biotinylés utilisés dans les tests et correspondent à de très bons ligands. Les résultats sont exprimés sous forme d'activité relative (ratio IC50 peptide testé / IC50 du peptide de référence) et correspondent à la moyenne de trois expériences. Les bons liants ont une activité relative < 100 et sont en rouge.

Ces 18 peptides ont ensuite été testés pour leur capacité de liaison à des molécules HLA-II (DR et DP4). Le test de liaison est un ELISA en compétition dont le protocole est décrit en détail dans la partie « matériels et méthodes » de l'article Survivine.

Nous avons ainsi testé les 18 peptides sur 10 molécules HLA-DR et 2 molécules HLA-DP4 incluant les 7 molécules codées par le gène HLA-DRB1 (à savoir : HLA-DRB1*0101, HLADRB1*0301, HLA-DRB1*0401, HLADRB1*0701, HLADRB1*1101, HLADRB1*1301, et HLA-DRB1*1501), 3 molécules codées par les gènes HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5, et les molécules HLA-DPB1*0401 et *0402. Les résultats sont exprimés sous forme d'activité relative (ratio IC50 peptide testé / IC50 du peptide de référence) de façon à comparer facilement leurs propriétés de liaison aux peptides les plus efficaces utilisés comme référence. Ainsi, une activité relative supérieure à un seuil de 100 indique que l'affinité du peptide testé est au moins 100 fois moins efficace pour lier les molécules HLA-II que le peptide de référence. Nous avons choisi un seuil d'activité relative de 100 pour discriminer les peptides actifs des peptides inactifs. Les résultats de ces tests de liaison sont présentés dans le Tableau 16.

Nous avons trouvé 5 peptides capables de se lier à au moins 4 molécule HLA-II sur douze : 4 peptides localisés dans la région N-terminale (peptides 1-15, 4-18, 9-23 et 14-28) et le peptide 110-124 localisé dans la région C-terminale. Les peptides issus du reste de la séquence présentent une activité de liaison significative pour moins de trois molécules HLA-II sur douze étudiées.

Les 4 peptides sélectionnés dans la partie N-terminale de la Midkine présentent des capacités de liaison à de multiples molécules HLA-DR et DP4. On notera notamment que les peptides 4-18 et 9-23 sont capables de se lier respectivement à 9 et 8 molécules HLA-II différentes.

Ensemble, les peptides 1-15, 4-18, 9-23, 14-28 et 110-124 de la Midkine sont capables de se lier à 11 des 12 molécules HLA-II étudiées couvrant ainsi la grande majorité de la population caucasienne.

De plus, les 4 peptides sélectionnés dans la partie N-terminale de la Midkine sont localisés dans le peptide signal de cette protéine. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, un peptide signal contient un grand nombre d'acides aminés hydrophobes, ce qui explique la forte proportion de bons ligands aux molécules HLA-II dans cette région et que 4 des 5 meilleurs ligands que identifiés y soient localisés.

Du fait du faible nombre de peptides synthétisés, les 18 peptides dérivés de la Midkine ont été étudiés pour leur immunogénicité vis-à-vis de T_H CD4+, sans tenir compte des résultats des tests de liaison.

Donneurs	Typage HLA II	9-23	14-28	18-32	64-78	70-84	74-88	78-92	99-113	105-119	119-133
P341	DR0401, DR1501 DRB4/B5	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
P343	DR1101, DR1501 DRB3/B5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P331	DR0701, DRB4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P343	DR1101, DR1501 DRB3/B5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P402	DR0401, DR130 DRB4/B3	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
P403	DR0301, DR1301 DRB3	0	7	1	1	0	1	1	1	1	0
P409	DR0102, DR1201 DRB3, DP0401	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
P494	DR1101, DR1502 DRB3/B5	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Total		6	13	1	1	1	1	1	3	2	1
Donneurs		4	5	1	1	1	1	1	3	2	1

Tableau 17 : Bilan des lignées de L_T CD4⁺ spécifiques de peptides de la Midkine induites par peptides et par donneurs sains

La capacité des 18 peptides de la Midkine à induire des lignées de L_T CD4⁺ spécifiques a été étudiée sur 11 donneurs sains naïfs présentant des typages HLA-II très différents. Dix peptides sur les 18 testés, ont permis d'induire des lignées de L_T CD4⁺ chez 8 donneurs étudiés (P341, P343, P331, P343, P402, P403, P409 et P494). Aucune lignée de L_T CD4⁺ n'a été induite chez les 3 autres donneurs sains étudiés (P244, P332 et P406) (Résultats non montrés).

2.2. Génération de lignées de lymphocytes T CD4+ contre les peptides de la Midkine

La capacité des 18 peptides de la Midkine à induire des lignées cellulaires T CD4+ spécifiques de ces peptides a été étudiée sur 11 donneurs sains naïfs présentant des typages HLA-II très différents, nous permettant de couvrir l'ensemble des allèles HLA-II les plus représentés dans la population. Ces peptides ont été divisés en deux groupes de 9 peptides. Le premier groupe se composait des peptides situés entre les positions 1-78 et le second groupe se compose de ceux situés entre les positions 70-133 (Tableau 15).

Le principe de la technique d'induction est décrit en détail dans la partie « matériels et méthodes » de l'article Survivine. En bref, des cellules T CD4+ ont été purifiées à partir de PBMC collectées à partir du sang de donneurs sains préalablement typés pour leur molécules HLA-DR et -DP. Les monocytes ont été isolés puis différenciés en DC immatures en présence d'IL-4, de Gm-CSF, puis maturées en présence de LPS. Les DC matures obtenues ont été chargées avec le mélange de peptides d'un des groupes puis mis en coculture en présence d'IL-12 et d'IL-6 avec les cellules T CD4+ autologues purifiées, dans des plaques 96 puits. Les cocultures ont été restimulées chaque semaine pendant 4 semaines avec des DC chargées et un cocktail de cytokines (IL-2 et IL-7). La spécificité des cellules T CD4+ a ensuite été étudiée par Elispot IFN- γ au bout de 28 jours de coculture. Pour cela, les cellules T CD4+ ont été incubées avec des PBMC autologues, comme cellules présentatrices, chargées du mélange des peptides de l'un des deux groupes ou des peptides individuels. Des PBMC autologues non chargées ont été utilisées comme contrôle négatif. Un bilan des lignées T CD4+ induites par peptide et par donneur est exposé dans le Tableau 17. Les résultats des Elispots obtenus pour une partie des lignées T CD4+ sont représentés dans la Figure 37.

Des lignées T CD4+ spécifiques issues de 8 donneurs sur les 11, ont été induites contre 10 peptides dérivés de la Midkine parmi les 18 testés. Par exemple, le peptide 9-23 a permis d'induire 6 lignées, le peptide 14-28 a permis d'en induire 13, les peptides 99-113 et 105-119 en ont induit respectivement 3 et 2 et les peptides 18-32, 64-78, 70-84, 74-88, 78-92 et 119-133 n'ont induit qu'une lignée chacun. A l'inverse, aucune lignée n'a été induite contre les 8 autres peptides.

D'après ces résultats, nous pouvons constater que la réponse T est principalement dominée par 4 peptides : MDK 9-23, 14-28, 99-113 et 105-119. De plus, nous pouvons voir que les peptides 9-23 et 14-28, identifiés comme faisant parti de ceux capables de lier un plus grand nombre de molécules HLA-II, ont permis d'induire le plus grand nombre de lignées T.

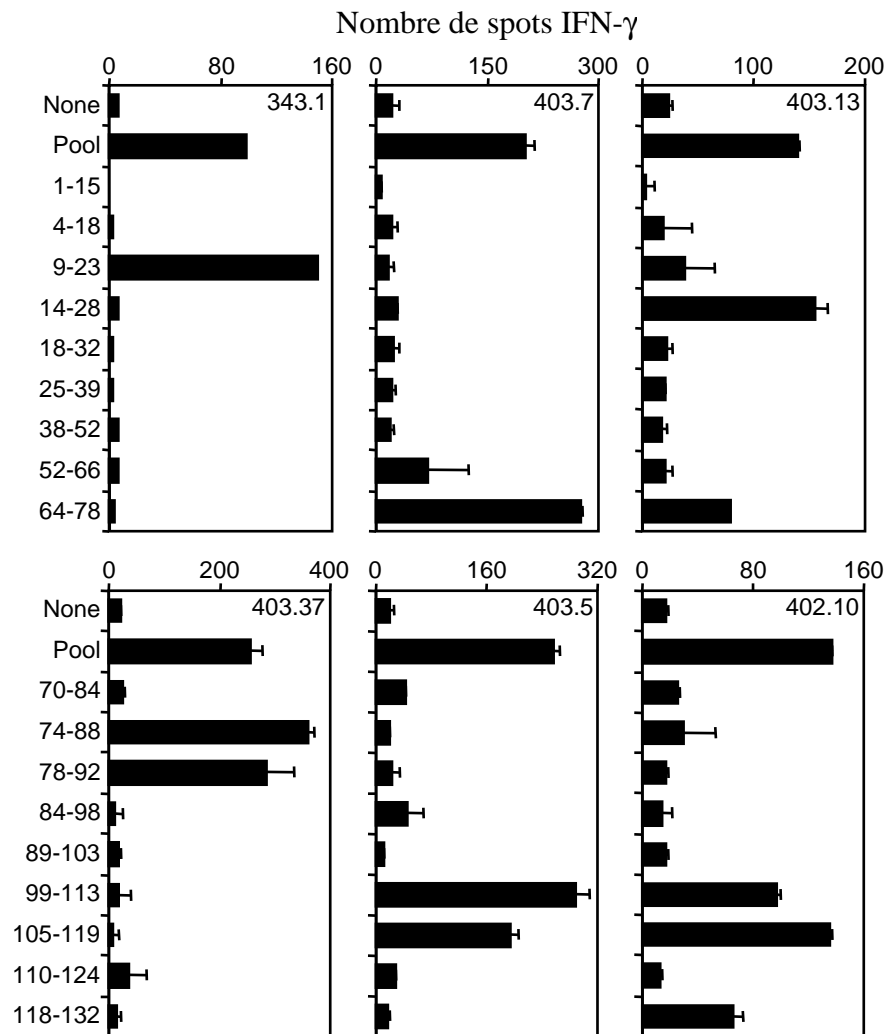


Figure 37 : Spécificité peptidique des lignées de L_T CD4⁺ induits contre des peptides de la Midkine

Des lignées de L_T CD4⁺ issues de donneurs sains (343, 402 et 403) ont été obtenues après 3 semaines de stimulations par des DC matures autologues chargées avec un mélange de 9 peptides d'un des deux pools (1-15, 4-18, 9-23, 14-28, 18-32, 25-39, 38-52, 52-66, 64-78 ou 70-84, 74-88, 78-92, 84-98, 89-103, 99-113, 105-119, 110-124, 118-132). La spécificité des lignées T a été évaluée par Elispot IFN- γ . Pour cela, des L_T CD4⁺ (1.10^4 /puits) ont été incubés en duplicate avec des PBMC autologues (1.10^5 /puits) en présence ou en absence de peptides. Le comptage des spots a été fait après 24h d'incubation.

2.3. Caractérisations de lignées de lymphocytes T CD4⁺ induites par les peptides

Après le premier criblage, nous avons principalement obtenu des lignées de L_T CD4⁺ spécifiques de 4 peptides dérivés de la Midkine : les peptides 9-23, 14-28, 99-113 et 105-119. De manière à mieux caractériser les spécificités de ces différentes lignées, nous avons étudié pour une partie d'entre elles leur restriction et leur capacité à reconnaître des cellules tumorales directement ou sous forme de lysats présentés par les DC immatures.

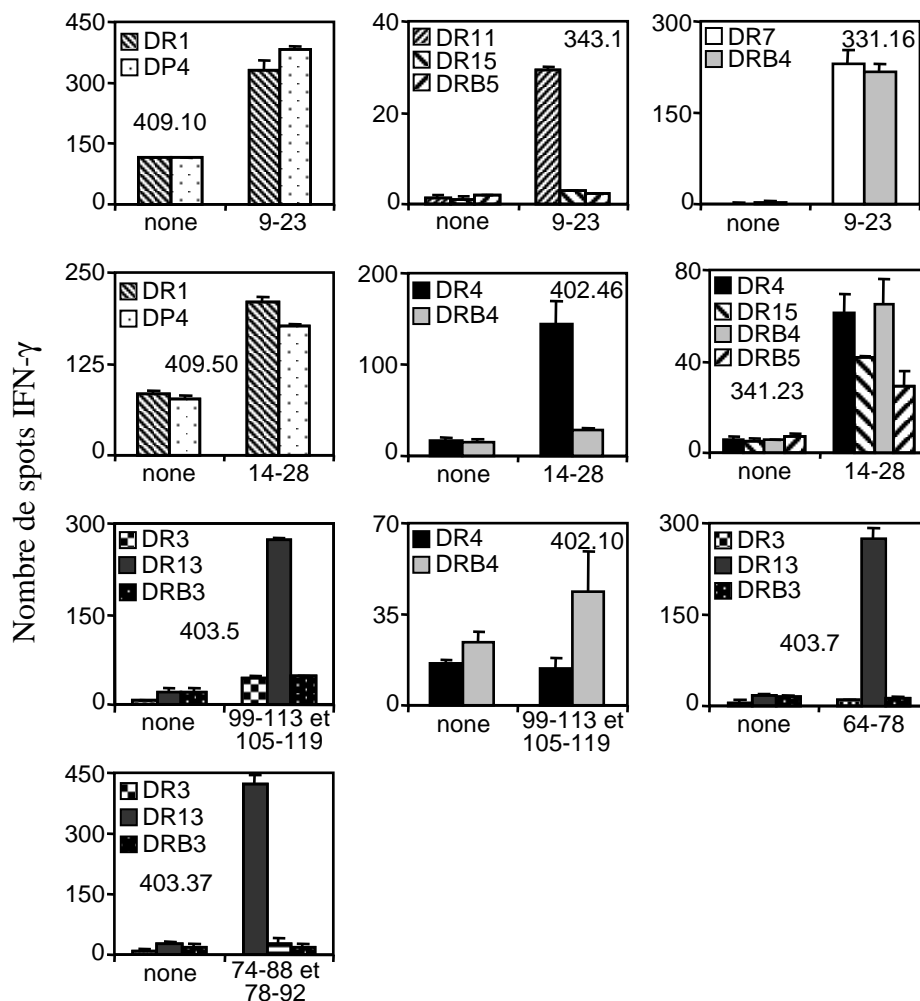


Figure 38 : Restriction HLA-DR et HLA-DP4 de lignées de LT CD4+ spécifiques de peptides de la Midkine

Des de LT CD4+ spécifiques de peptides de la Midkine ont été incubés (1.10^4 /puits) en duplicate avec des cellules murines L (3.10^4 /puits) exprimant stablement l'une des molécules HLA-DR ou HLA-DP4 en présence ou en absence du peptide approprié. L'activation des de LT CD4+ a été évaluée par Elispot IFN- γ après 24h d'incubation. L'incubation des lymphocytes T seuls avec les peptides appropriés ont donnés un nombre de spots moins important (résultats non montrés).

2.3.1. Mise en évidence de l'élément de restriction

Afin de savoir quelle molécule HLA-II est responsable de la présentation des 4 peptides Midkine précédemment identifiés, un test de restriction a été fait sur des lignées T spécifiques de ces peptides. Ces tests ont été réalisés au moyen de cellules L transfectées avec un gène codant pour une molécule HLA-DR ou HLA-DP4 (cellules L-HLA II). L'activation de lignées T CD4⁺ a été évalué en regardant leur production d'IFN- γ en présence de ces cellules L-HLA II chargées ou non avec le peptide qui est leur cible. Compte tenu du fait que chaque donneur exprime une ou plusieurs molécules HLA-DR et/ou HLA-DP différentes, la production d'IFN- γ a été évaluée avec différentes cellules L-HLA II, en accord avec le typage des donneurs, de manière à identifier la molécule présentatrice. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la Figure 38.

Onze lignées provenant de 6 donneurs ont été étudiées pour leur restriction. Parmi elles, 4 lignées spécifiques du peptide 9-23 ont été étudiées (343.1, 331.16, 331.24 et 409.10) montrant que ce peptide peut être présenté par les molécules HLA-DR7, -DR11, -DRB4 et HLA-DP4. La restriction de 3 lignées (341.23, 402.46 et 409.50) spécifiques du peptide 14-28 a été étudié montrant que ce peptide peut être présenté par les molécules HLA-DR1, -DR4, -DR15, -DRB4, -DRB5 et HLA-DP4. Le peptide 64-78 peut être présenté par la molécule HLA-DR13, les peptides 99-113 et 105-119 peuvent qu'en a eux être présentés par les molécules HLA-DR13 et -DRB4. Pour finir, les peptides 74-88 et 78-92 peuvent être présentés par la molécule HLA-DR3.

D'après ces résultats, les peptides 9-23 et 14-28 sont capables d'être présentés par de multiples molécules HLA-II. Ceci peut expliquer pourquoi ces deux peptides ont induit le plus grand nombre de lignées de L_T par rapport aux autres peptides (Tableau 17).

De plus, on peut voir qu'une même lignée T CD4⁺ spécifique d'un peptide peut le reconnaître en utilisant des éléments de restriction différents, comme pour la lignée 341.23 qui reconnaît le peptide 14-28 présenté par 4 molécules HLA-II différentes.

2.3.2. Reconnaissance de lysats de tumeurs

Des lignées T spécifiques de la Midkine ont été testés pour leur capacité de reconnaissance de lysats de tumeurs. Pour cela, nous les avons incubées avec des DC autologue immatures préalablement chargées ou non avec des lysats de cellules tumorales. Des lysats de deux types de cellules tumorales ont été utilisés ; Des cellules HepG2 exprimant naturellement la Midkine ainsi que des cellules HeLa qui ne l'expriment pas, comme témoin négatif. Des DC autologues immatures chargées avec le peptide approprié ont été utilisées comme témoin positif de présentation.

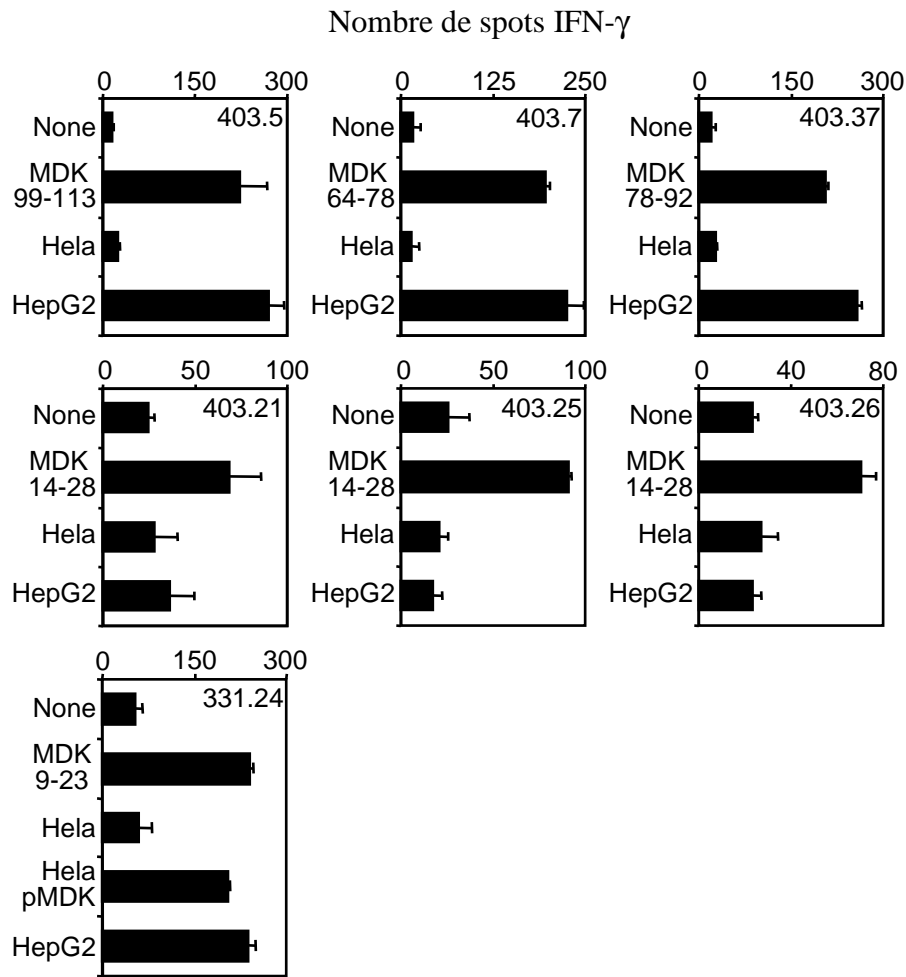


Figure 39 : Reconnaissance de lysats de tumeurs par des lignées de T_H CD4+ spécifiques de peptides de la Midkine

Des DC immatures (0.5M/mL) ont été chargées pendant 4h avec des lysats de cellules tumorales (2.5M/mL) Hela ou de carcinome hépatique (HepG2). Des lignées de lymphocytes T CD4+ (331.24, 403.5, 403.7, 403.37, 403.21, 331.24 et 403.26) ont été incubées (1.10^4 /puits) avec 5000 DC chargées. L'activation des cellules T CD4+ a été évaluée par Elispot IFN- γ après 24h d'incubation. Des DC chargées avec le peptide MDK dont sont spécifiques les lignées testées ainsi que des DC non chargées ont été utilisées comme témoins positifs et négatifs respectivement. La lignée de lymphocytes T CD4+ 331.24 a également été incubée avec des DC immatures (0.5M/mL) chargées avec des lysats de cellules tumorales Hela transfectées avec un plasmide codant pour la Midkine (Hela pMDK)

Les lysats de cellules tumorales ont été obtenus par 5 cycles de congélation et décongélation successifs. La stimulation de 12 lignées T CD4⁺ issues de 3 donneurs (P331, P343 et P403) a été ainsi évaluée par Elispot IFN- γ . Les résultats de ces tests sont représentés dans la Figure 39.

Parmi les lignées testées, deux étaient spécifiques du peptide 9-23 (331.24 et 343.1), une du peptide 64-78 (403.7), une autre des peptides 99-113 et 105-119 (403.5), une était spécifique des peptides 74-88 et 78-92 (403.37) et 7 du peptide 14-28 (403.13, 403.21, 403.25, 403.26, 403.30, 403.47 et 403.48)

Toutes les lignées T spécifiques des peptides 9-23, 64-78, 99-113, 105-119, 74-88 et 78-92 ont reconnu spécifiquement des DC immatures autologues préalablement chargées avec les lysats de cellules HepG2. Une lignée spécifique du peptide 9-23 testée a reconnu des lysats de cellules HeLa transfectées. Ces 6 peptides sont donc naturellement apprêtés par les DC et présentés à leur surface sur les molécules HLA-II. Ils sont donc tous immunodominants. De plus, ces résultats montrent que le taux d'expression endogène de la Midkine dans ces cellules tumorales est suffisant pour que ces cellules soient reconnues par des lymphocytes T CD4⁺ spécifique de peptides de la Midkine.

A l'inverse, aucune des 7 lignées T spécifiques du peptide 14-28 n'a reconnu les lysats de cellules tumorales HepG2 présentés par des DC immatures autologues. Cependant, ces lignées T ont été capables de reconnaître ces mêmes DC chargées avec le peptide approprié. Ces résultats montrent que le peptide 14-28 n'est pas naturellement apprêté suite à la dégradation de l'Ag natif dans les CPA.

Tableau 18: Résumé de l'étude des réponses cellulaires T dirigées contre la Midkine

Epitopes	Nombre de lignées induites	Nombre de donneurs	Restrictions Observées	Reconnaissance lysats CT	Reconnaissance CT
13-21	7	7/12	HLA-A*0201		+
114-122	8	6/12	HLA-A*0201		+
9-23	6	4/8	DR11, DR7, DRB4, DP4	+	+*
14-28	13	5/8	HLA-DR1, DR4, DR15, DRB4, DRB5, DP4	-	-*
18-32	1	1/8	ND	ND	ND
64-78	1	1/9	HLA-DR13	+	ND
70-84	1	1/10	ND	ND	ND
74-88	1	1/11	DR3	+	ND
78-92	1	1/12	DR3	+	ND
99-113	3	3/8	HLA-DR13, DRB4	+	ND
105-119	2	2/8	HLA-DR13, DRB4	+	ND
119-133	1	1/8	ND	ND	ND

CT : Cellules Tumorales

* : Données en cours de confirmation

ND : Non Déterminé

D. Conclusions et Discussion

La Midkine est une protéine sécrétée, surexprimée dans la majorité des tumeurs et jouant un rôle important dans la progression tumorale. Notre étude a permis de déterminer pour la première fois que cette protéine est également un Ag tumoral. Un résumé des résultats obtenus est représenté dans le tableau 18.

Nous avons identifié 2 peptides (13-21 et 114-122) restreints à la molécule HLA-A2 capables d'induire des lignées T CD8+ issues de donneurs sains. Les CTL spécifiques de ces deux peptides reconnaissent spécifiquement des cellules tumorales HLA-A2 exprimant naturellement la Midkine. Ces résultats montrent que ces deux peptides sont immunodominants et que le taux d'expression endogène de la protéine Midkine est suffisant pour qu'il y ait une reconnaissance par les lymphocytes T. Les expériences réalisées *in vivo* dans des souris transgéniques HHD immunisées avec les peptides individuels ou avec un plasmide contenant la séquence codant pour la Midkine, ont confirmé la capacité de ces deux épitopes T CD8+ à induire des cellules T CD8+ *in vivo*, capables de détruire spécifiquement des cellules exprimant la Midkine. Les résultats des immunisations ADN montrent également que ces deux peptides sont apprêtés et présentés efficacement *in vivo*. Ces résultats suggèrent également qu'il existe dans le répertoire lymphocytaire de sujets sains, des précurseurs de CTL anti-Midkine et donc qu'il n'y a pas de tolérance induite contre cette protéine.

Nous avons également démontré la capacité de la Midkine à induire des réponses T CD4+. Dix neuf lignées T CD4+ issues de donneurs sains ont en effet été induites principalement contre trois peptides dérivés de la Midkine, les peptides 9-23, 14-28 et 99-113. L'étude de restriction a montré que ces peptides peuvent être présentés par plusieurs molécules HLA-II. Des lignées T spécifiques des peptides 9-23 et 99-113 sont également capables de reconnaître spécifiquement des lysats de tumeurs exprimant naturellement la Midkine présentées par des DC immatures autologues. Une lignée spécifique du peptide 9-23 testée s'est également montrée capable de reconnaître des lysats de cellules Hela transfectées. Ces résultats montrent que ces deux peptides sont immunodominants et que le taux endogène de la Midkine est suffisant pour induire une reconnaissance par des cellules T CD4+ spécifiques.

A l'inverse, aucune des lignées T spécifiques du peptide 14-28 n'a montré ces capacités de reconnaissance. Ce peptide ne semble donc pas apprêté de façon efficace par les CPA.

La localisation ectopique du peptide 14-28 pourrait expliquer son absence de présentation aux cellules T CD4+ à partir de lysats de tumeurs. En effet, ce peptide est à cheval entre le peptide signal et la partie sécrétée de la Midkine. Le peptide signal permet l'adressage de la protéine à sécréter au niveau de la membrane du RE. A ce niveau, il est clivé du corps de la protéine par la Signal Peptidase (SP). Le peptide 14-28 doit donc être clivé en son centre par la SP et n'est donc pas apprêté.

A l'inverse, le peptide 9-23 est localisé en grande partie dans le peptide signal de la Midkine (1-22). A notre connaissance, notre étude a permis d'identifier pour la première fois un épitope T CD4+ localisé dans le peptide signal d'un Ag tumoral. Ce peptide présente l'intérêt de contenir à la fois un épitope T CD4+ associé à un épitope T CD8+ caractérisé par le peptide 13-21. Cependant, la voie de présentation de ce peptide aux cellules T reste méconnue. Les tests de reconnaissance de cellules T2 transfectées avec le plasmide codant pour la Midkine que nous avons effectués, montrent que la présentation du peptide 13-21 est TAP dépendante. Ceci suggère que ce peptide doit être envoyé dans le cytosol après son clivage par la SP. Le peptide 14-28 doit donc suivre la même voie. Ce peptide pourrait ensuite suivre la voie de l'autophagie pour être présenté sur les molécules HLA-II.

L'origine de la Midkine dont sont issus les épitopes T CD8+ et CD4+ contenus dans la partie sécrétée et présentés à la surface des cellules tumorales par les molécules HLA reste encore à être déterminée. Deux hypothèses sont envisagées. Ces épitopes T peuvent provenir de l'apprêtement de la Midkine endogène aux cellules tumorales et/ou de l'apprêtement de la Midkine exogène. La Midkine est en effet une protéine sécrétée dont l'endocytose par les cellules tumorales est dépendante des récepteurs LRP (Chen et al., 2007). Cette endocytose permettrait la présentation des épitopes T CD4+ sur les molécules HLA-II selon la voie classique de présentation HLA-II. De plus, une étude a montré que la Midkine ainsi endocytée pouvait être dégradée par le protéasome (présentation croisée) (Suzuki et al., 2004). Les peptides résultants suivraient alors la voie classique de présentation sur les molécules HLA-I.

Cependant, il est possible qu'une partie des épitopes T dérivés de la Midkine et présentés à la surface des cellules tumorales, proviennent de la dégradation de la Midkine endogène. Cela suppose que soit une partie de la Midkine n'est pas sécrétée. Cette Midkine endogène peut provenir soit d'une translocation avortée dans le RE, ce qui a déjà été observée pour d'autres protéines sécrétées notamment la calréticuline (Shaffer et al., 2005), soit d'une translocation des protéines « mal repliées » du RE dans le cytosol (Lilley et al., 2004). La Midkine non transloquée serait alors dégradée par le protéasome et les peptides résultants suivraient la voie classique de présentation sur les molécules HLA-I. Ainsi, la non présentation du peptide 9-23 ne proviendrait pas de la coupure du peptide signal par la SP mais du non apprêtage correcte de cet épitope T faisant de ce dernier un néo-épitope. La Midkine non

transloquée pourrait également suivre la voie de la macrophagie permettant la présentation des épitopes T CD4+ sur les molécules HLA-II. Des études ont montré que cette voie de présentation pouvait être empruntée par des protéines anormalement exprimées (Nimmerjahn et al., 2003).

L'hypothèse selon laquelle une partie de la Midkine endogène emprunte la voie de la macrophagie, suppose également que la non présentation du peptide 14-28 serait due au fait qu'il n'est pas apprêté de façon correcte.

Des expériences visant à bloquer les récepteurs LRP à la surface des cellules tumorales ou la sécrétion des protéines par ces dernières, pourraient être envisagées afin de vérifier ces hypothèses.

Actuellement, nous testons la capacité de lignées T CD4+ spécifiques de la Midkine à reconnaître directement des cellules tumorales. Pour le moment, nous avons obtenus une lignée de lymphocyte T spécifique du peptide 9-23 capable de reconnaître directement une lignée tumorale exprimant naturellement la Midkine (résultats non montrés).

L'ensemble de nos résultats démontrent que la Midkine est un nouvel Ag tumoral universel dont nous avons caractérisé les réponses T CD8+ et T CD4+. Notre étude permet de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques dérivant de cette protéine, à savoir deux épitopes T CD8+ et 3 épitopes T CD4+. Le peptide 9-23 semble le plus intéressant car il contient à la fois les deux types d'épitopes T.

L'ensemble des épitopes T identifiés pourrait être utilisé dans des essais de vaccination chez des patients atteints de cancers variés du fait de la surexpression de la Midkine dans de nombreuses tumeurs et de la restriction des peptides identifiés. En effet, les épitopes T CD8+ sont restreints à la molécule HLA-A2 qui est la plus représentée dans la population et les épitopes T CD4+ sont restreints à de multiples molécules HLA-II parmi celles les plus représentées dans la population caucasienne. De plus, une immunothérapie visant la Midkine permettrait de limiter le risque d'échappement immunitaire des tumeurs par perte de l'Ag, car cette protéine est impliquée dans de multiples fonctions vitales pour les cellules tumorales au même titre que la Télomérase et la Survivine.

Par ailleurs, la Midkine est un bio-marqueur d'évolution de nombreux cancers. Son expression dans les tumeurs peut être détectée dans le sang mais également dans les urines. Des analyses pourraient être effectuées chez des patients atteints de cancers afin de déterminer si leur tumeur exprime la Midkine et cela avant d'envisager de faire des essais de vaccinations avec les épitopes T dérivés de cette protéine.

Discussion générale et perspectives

Dans les années passées, de nombreux épitopes immunodominants présentés par les molécules HLA-I et II ont été décrits dans la littérature. En particulier, les épitopes restreints aux HLA I ont été beaucoup testés sous différentes formes et formulations de vaccination. Comme nous l'avons déjà montré, l'efficacité de ces vaccins demeure faible et la régression de tumeurs est rare par rapport au nombre de personnes vaccinées. Pour expliquer cette défaillance, une cause possible pourrait être liée à la nature des Ags employés. En effet, certains Ags tumoraux ciblés sont aussi exprimés dans les cellules normales. Ainsi, les Ags ont été exposés au système immunitaire et ont induit un certain degré de tolérance chez l'hôte. Une solution est de cibler des Ags spécifiques de tumeurs ou des Ags surexprimés dans les cellules tumorales en comparaison des tissus sains correspondants. Une autre cause possible, celle-ci liée à l'Ag, serait la pression de sélection de tumeurs. Il se peut que les tumeurs n'expriment plus l'épitope ou que sa séquence soit modifiée. Une analyse immunohistochimique des biopsies a été effectuée chez des patients qui avaient initialement répondu à un peptide d'Ag du mélanome puis rechuté alors que l'étude montrait la présence des CTL spécifiques de ce peptide. Cette analyse a montré une perte progressive de l'expression de l'Ag en association avec une progression de la maladie (Parmiani et al., 2002). Un moyen d'éviter ces échappements serait l'induction d'une réponse immunitaire polyclonale capable de reconnaître de multiples déterminants antigéniques, en employant des vaccins multi-épitopiques. Cependant, cette solution n'est envisageable que pour des tumeurs pour lesquelles de nombreux Ags ont été identifiés. Une autre solution serait d'induire des réponses immunitaires contre des Ags exprimés dans un grand nombre de tumeurs et ayant un rôle indispensable à la survie de ces dernières. Cependant, un nombre encore très restreint d'Ags ayant ces caractéristiques a été identifié. De plus, malgré les études démontrant l'importance de l'induction de réponses T CD4+ dans l'initiation et le maintien de réponses cytotoxiques efficaces, peu d'épitopes T CD4+ dérivés de tels Ags ont été identifiés.

Mon travail de thèse a permis d'identifier de nouvelles cibles peptidiques pertinentes pour la vaccination anti-tumorale dérivées de protéines appartenant à ce groupe d'Ags tumoraux : la Survivine et la Midkine. Pour cela, nous avons étudié l'ensemble des réponses T dirigées contre ces deux protéines.

Dans la première partie de ma thèse, j'ai étudié l'ensemble des réponses T CD4+ et CD8+ spécifiques de la Survivine, un Ag tumoral connu pour être surexprimé dans de nombreuses tumeurs et jouant un rôle dans l'inhibition de l'apoptose.

Dans la deuxième de ma thèse, j'ai démontré que la Midkine, une protéine surexprimée par de nombreuses tumeurs et jouant de multiples rôles vitaux pour ces dernières, est un Ag tumoral capable d'induire à la fois des réponses T CD8+ et CD4+.

Le choix d'étudier les propriétés immunologiques de la Midkine s'est fait après des analyses d'études transcriptomiques. Nous nous sommes intéressés aux données de transcriptomiques afin de définir de nouvelles cibles protéiques exprimées de manière générique dans les tumeurs, et peu voire pas exprimées dans les cellules saines correspondantes. En effet, les progrès réalisés dans le domaine de la transcriptomique, notamment avec le développement des puces à ADN, ont permis d'identifier à grande échelle de nombreux gènes surexprimés dans des cellules tumorales fournissant ainsi de nouvelles cibles pertinentes pour des études immunologiques. L'une de ces études, menée par le Dr Velculescu, a classé une quarantaine de gènes surexprimés dans de nombreuses cellules tumorales en fonction de leur rapport d'expression dans des tumeurs d'origine histologiques différentes et les saines correspondantes (Velculescu et al., 1999). A partir de cette étude, nous avons sélectionné deux gènes codant pour les protéines Midkine et S100A4. L'étude bibliographique de ces deux protéines confirme qu'elles sont bien exprimées dans de nombreuses tumeurs mais également qu'elles sont impliquées dans des fonctions vitales au développement du phénotype malin.

En effet, comme nous l'avons vu, la Midkine joue de multiples fonctions dans les cellules tumorales notamment en contribuant à leur résistance à l'apoptose et en régulant la division cellulaire et de l'angiogénèse.

La protéine S100A4 appartient à la famille des protéines S100 liant le calcium, dont les membres ont diverses activités de régulations biologiques. Il a été montré que la protéine S100A4 est impliquée dans la formation des métastases et que différentes tumeurs humaines l'expriment. Elle peut se lier à différentes protéines cibles intracellulaires telles que des composants du cytosquelette, l'E-cadhérine, la p53, la thrombospondine 1 et des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMP). Elle régule donc ainsi des fonctions spécifiques impliquées dans la progression des tumeurs telles que la motilité cellulaire, la prolifération et l'apoptose aussi bien que le remodelage de la matrice extracellulaire (Garrett et al., 2006).

De part leur large expression dans les tumeurs et leurs fonctions vitales, ces deux protéines nous semblaient constituer des cibles privilégiées pour des stratégies d'immunothérapies. De plus et de manière intéressante, ces deux protéines n'avaient jamais été étudiées d'un point de vue immunologique. C'est pourquoi, nous avons envisagé d'étudier leur propriété immunologiques et plus précisément leur capacité à induire des réponses T CD8+ puis CD4+.

Avant d'entreprendre cette étude, nous avons vérifié les taux d'expression de la Midkine et de la protéine S100A4 dans des dans des cellules saines telles que des PBMC et des DC, par cytométrie de flux. Nous n'avons observé aucune d'expression de la Midkine dans ces deux types cellulaires. Au contraire, nous avons observé une forte expression de la protéine S100A4 dans ces cellules. Nous avons donc écarté cette protéine de notre étude malgré le grand intérêt qu'elle présentait.

Comme pour la Survivine, nous avons étudié l'ensemble des réponses T CD4+ et CD8+ spécifiques de la Midkine. Ces études ont permis d'identifier des épitopes T CD8+ et CD4+ dérivés de la Midkine et de la Survivine capables d'induire des réponses T chez de nombreux individus.

La présentation des déterminants antigéniques par les DC aux L_T CD4+ est restreinte aux molécules HLA-II. Ces protéines présentent un fort taux de polymorphisme. Ainsi, les fragments d'un même Ag présentés aux L_T CD4+ seront différents d'un individu à un autre selon les molécules HLA-II qu'ils expriment. Du fait de ce polymorphisme et afin de cibler de nombreux patients, nous avons identifié des épitopes T CD4+ dérivés de la Survivine et de la Midkine capables de se lier à plusieurs molécules HLA-II parmi celles les plus représentées dans la population. La large capacité de liaison de ces peptides ainsi que la vaste expression dans les tumeurs des Ags dont ils sont issus font de ces épitopes T CD4+ des candidats pertinents pour des essais de vaccination chez des patients de typage HLA-II différents et atteints de cancers variés.

Dans le cadre de vaccination à base de peptides, un moyen de passer outre le problème du polymorphisme et de cibler une large part de la population est d'utiliser des peptides présentés par les molécules HLA-DP4. En effet, 76 % de la population caucasienne exprime la molécule HLA-DPB1*0401 et/ou HLA-DPB1*0402. Deux épitopes T CD4+ restreints aux molécules HLA-DP4 ont été identifiés dans la séquence de la Survivine et deux autres dans celle de la Midkine. Cependant, les résultats de nos études d'immunogénicité de la Survivine et de la Midkine face à des L_T CD4+ ont clairement montré que les réponses étaient essentiellement restreintes à HLA-DR malgré la présence d'au moins deux épitopes T restreints à HLA-DP4. Nos études nous ont donc également permis de comparer l'importance des réponses restreintes aux molécules HLA-DR et à celles restreintes à HLA-DP4. On peut toutefois remarquer que la littérature décrit principalement des épitopes T restreints à HLA-DR et que compte tenu de la fréquence des molécules HLA-DP4, le nombre d'épitopes T connus est peu important. Aussi, il ne paraît pas impossible que les molécules HLA-DP4 soit moins immunoréactives que les molécules HLA-DR d'autant plus que les molécules HLA-DR sont plus exprimées à la surface des cellules présentatrices que les autres molécules HLA-II (2ème DR, DQ et DP) (colombani, 1993). Toutefois, des épitopes T CD4+ restreints aux molécules

HLA-DP4 permettant d'induire des lignées T chez de nombreux donneurs ont été trouvés dans un Ag tel que MAGE (Wang et al., 2007b). Baser une stratégie de recherches d'épitopes T restreints à HLA-DP4 est donc peut-être plus risqué qu'une recherche d'épitopes T restreints aux molécules HLA-DR mais elle peut-être extrêmement fructueuse.

Il existe également un polymorphisme important pour les molécules HLA-I. C'est pourquoi les épitopes T CD8+ que nous avons identifiés sont tous restreints à la molécule HLA-A2 qui est, comme la molécule HLA-DP4, exprimée par une grande majorité de la population (~33%). Les épitopes T CD8+ identifiés sont tous immunodominants et ils ont permis d'induire des L_T CD8+ *in vitro* à partir de donneurs sains HLA-A2, capables de reconnaître des cellules tumorales. Nous avons également démontré que les épitopes T CD8+ dérivés de la Midkine sont également immunogènes *in vivo*. En effet, des L_T CD8+ spécifiques de ces épitopes T et capables de détruire des cellules tumorales ont été induits chez des souris transgéniques HHD immunisées avec ces peptides. De plus, ce travail montre la concordance des résultats entre les études d'immunogénicité menées *in vitro* et celles menées *in vivo* dans des souris transgéniques.

Notre étude donne une vision globale des réponses T dirigées contre la Survivine et la Midkine. Cette vision globale nous a permis d'identifier des peptides immunogènes contenant à la fois un épitope T CD4+ et CD8+. En effet, un épitope de ce type a été identifié dans la séquence de la Midkine et de la Survivine. De tels peptides ont été identifiés dans les séquences d'autres Ags notamment la gp100 et la protéine NY-ESO-1. Des essais de vaccination ont montré qu'ils sont capables d'induire à la fois des réponses T CD8+ et CD4+ (Celis, 2007; Shirai et al., 1994).

Nous avons également identifié un épitope T CD4+ immunodominant (MDK 9-23) dans le peptide signal de la Midkine. Ce peptide présente également la particularité de contenir un épitope T CD8+ (MDK 13-21). Des épitopes T CD8+ ont déjà été décrits dans le peptide signal de plusieurs Ags. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'avait encore identifié un épitope T CD4+ dans le peptide signal d'une protéine. Une telle découverte pose la question de la voie de présentation à la surface cellulaire sur les molécules HLA-II. Au cours de notre étude, nous avons démontré que la présentation du peptide 13-21 par les molécules HLA-I est dépendante des transporteurs TAP. Ce résultat suggère donc que ce peptide 13-21 est envoyé dans le cytoplasme après la coupure du peptide signal de la Midkine, du reste de la protéine, par la SP. Du fait que le peptide 13-21 soit entièrement chevauchant avec le peptide 9-23, nous supposons que ce dernier soit également envoyé dans le cytoplasme après la coupure du peptide signal au niveau de la face luminale de la membrane du RE.

En conclusion, notre étude a permis de fournir de nouvelles séquences peptidiques immunogènes utilisables dans des essais de vaccination anti-tumorale chez de nombreux patients atteints de cancer variés. Ces peptides pourraient notamment être utilisés dans des essais de vaccination chez des patients porteurs de tumeurs pour lesquelles peu d'Aggs tumoraux sont connus, tout en évitant le risque d'échappement aux attaques immunes. De plus, comme nous l'avons vu, la Midkine est, au même titre que la PSA, une protéine sécrétée qu'il est possible de détecter dans le sang et les urines de patients atteints de cancer par des techniques Elisa. Cependant, à l'inverse de la PSA, la Midkine est sécrétée par de nombreuses tumeurs et peut être détectée à des stades très précoces d'évolution de la maladie. De plus, des taux élevés de Midkine dans le sang de patients sont corrélés à des tumeurs de mauvais pronostiques. Il est donc envisageable de réaliser une analyse simple afin de cibler les patients que l'on peut ou non vacciner avec des peptides immunogènes issus de la Midkine. Le dosage de la Midkine dans le sang et/ou les urines pourrait également servir à suivre l'évolution des tumeurs des patients après traitement.

Actuellement, nous sommes entrain de confirmer la capacité de lignées T CD4+ spécifiques de la Midkine à reconnaître spécifiquement des cellules tumorales exprimant naturellement cette protéine et dans différents haplotypes. Nous analysons également la présence de réponses T CD4+ spontanées dirigées contre la Midkine chez une cohorte patientes atteintes d'un cancer du sein. Ces résultats permettront de confirmer l'intérêt d'utiliser la Midkine dans des essais de vaccination anti-tumorale.

Projets en cours

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur des projets autres que la Midkine et la Survivine. Notamment, j'ai initié une étude ayant pour objectif l'identification d'épitopes T CD4+ dans la Cycline B1.

J'ai également travaillé en collaboration sur un projet subventionné par l'INCa dirigé par le Dr Eric Tartour. Ce projet a pour objectif d'identifier des peptides restreints à l'allèle HLA-DP4 et dérivés d'Aggs tumoraux tels que la Télomerase (TERT), la Survivine, et Her2/neu, sélectionnés en raison de leur fréquence d'expression dans différents types de cancers, de leur immunogénicité et de leur intérêt vaccinal. Ce programme est construit autour des molécules HLA-DPB1*0401 et HLA-DPB1*0402 car 76% des personnes caucasiennes expriment au moins une de ces molécules. Les peptides restreints à ces allèles sont souvent immunodominants et se lient à de multiples allèles HLA couvrant ainsi une large population. Notre participation à ce projet a consisté en l'identification *in vitro* d'épitopes T CD4+ dérivés des Ag tumoraux TERT, Her2/neu et Survivine et restreints aux molécules HLA-DP4.

Afin de conserver la possibilité de breveter les peptides identifiés, nous n'avons pas mis les séquences et les positions des épitopes T identifiés.

Identification d'épitopes T CD4+ dans la Cycline B1

Les cyclines forment une famille de molécules qui contrôle le cycle cellulaire en s'associant et en activant des cdk (cyclines dépendant des kinases). La dérégulation de l'expression des cyclines et/ou des cdk entraîne une perte de contrôle de la croissance cellulaire et le développement d'un phénotype malin (Hartwell and Kastan, 1994). Les cyclines C, D1-3 et E régulent le passage de la phase G1 à la phase S, alors que les cyclines A et B agissent durant la phase S et la mitose, respectivement.

La Cycline B1 est une protéine de 433 résidus (~48 kDa) codée par un gène unique localisé sur le chromosome 5 en 5q12. C'est une molécule importante du cycle cellulaire car elle permet la transition de la phase G2 à la phase M (King et al., 1994). Cette protéine s'associe avec la cdc2 (cdk1) dans le cytoplasme pour former le facteur d'initiation de la mitose (MPF). Ce complexe est transloqué dans le noyau où il initie la condensation des chromosomes, la destruction de la membrane nucléaire et l'assemblage du fuseau mitotique. La Cycline B1 est ensuite rapidement ubiquitinylée et dégradée par le protéasome (Murray, 1995). L'anaphase est alors initiée et le cycle cellulaire achevé. Cette protéine est exprimée à la phase S, avec un pic d'expression à la phase G2/M (Nurse, 1994) et elle est principalement retrouvée dans le noyau.

Une surexpression de la Cycline B1 a été détectée dans de nombreuses tumeurs incluant des cancers du sein, du colon, de la prostate, de l'œsophage, et des poumons (Kawamoto et al., 1997; Kushner et al., 1999; Mashal et al., 1996; Murakami et al., 1999; Soria et al., 2000). Cette expression anormale contribue à la croissance des tumeurs (Kadomatsu et al., 1997; Keyomarsi and Pardee, 1993) et résulte de la perte de fonction de la protéine p53 (Yu et al., 2002). Dans les cellules tumorales, la Cycline B1 présente également une localisation ectopique car elle est principalement localisée dans le cytoplasme plutôt que dans le noyau. Une corrélation a été trouvée entre l'expression de la Cycline B1 dans les tumeurs primaires et l'évolution clinique pour des patients atteints de cancers des poumons, de l'œsophage et de la langue (Geddert et al., 2002; Hassan et al., 2001; Milde-Langosch et al., 2001; Nozoe et al., 2002; Saito et al., 2006; Soria et al., 2000). En 2001, la Cycline B1 a été identifiée comme étant un Ag tumoral faisant parti de la famille des Ags surexprimés au même titre que PRAME et p53. Des CTL issus de patients atteints de cancer du sein, du cerveau et de la gorge se sont en effet montrés capables de reconnaître 2 peptides dérivés de la Cycline B1 et présentés par des molécules HLA-A2 (Kao et al., 2001).

Des réponses spontanées en anticorps contre la Cycline B1 ont également été trouvées chez des patients atteints de tumeurs variées (Covini et al., 1997; Koziol et al., 2003). Cette sécrétion d'anticorps est dépendante des L_T CD4+ suggérant qu'en plus des CTL, des réponses T CD4+ spécifiques de la Cycline B1 peuvent être générées (Suzuki et al., 2005). Cependant, aucune réponse T CD4+ spécifique de la Cycline B1 et aucun épitope T CD4+ n'ont été décrit.

A. Objectifs de travail

L'objectif de cette étude est premièrement de démontrer que la Cycline B1 est capable d'induire des réponses T CD4+ qui soient spécifiques des tumeurs, puis d'identifier les peptides dérivés de cette protéine qui présentent un intérêt à la fois pour la préparation de vaccins anti-tumoraux mais aussi un intérêt diagnostique, pour le suivi de la réponse immune dirigée contre la Cycline B1.

Notre stratégie s'est appuyée sur un protocole comprenant trois étapes :

1. Identifier des peptides de Cycline B1 se liant avec une bonne affinité à plusieurs molécules HLA-II par des tests de liaison *ex vivo*.
2. Évaluer l'immunogénicité potentielle des différents peptides par des tests d'induction de L_T CD4+ *in vitro*.
3. Ces L_T CD4+ spécifiques de peptides sont caractérisés par des tests de restriction, des tests de dose réponse et des tests de reconnaissance de tumeurs directement ou sous forme de lysats présentés par les cellules dendritique autologues.

B. Résultats

1. Synthèse de peptides de la Cycline B1 et tests de liaison aux molécules HLA-II

Soixante quinze peptides chevauchants couvrant la séquence entière de la Cycline B1 ont été synthétisés chimiquement en phase solide selon la stratégie Fmoc, purifiés par chromatographie en phase liquide, et mis en solution. Chaque séquence peptidique retenue contient un résidu aliphatique ou aromatique dans sa partie N-terminale qui est nécessaire à la fixation aux molécules HLA-DR et HLA-DP4. La qualité de chaque peptide est contrôlée par spectrométrie de masse. Les peptides ont été numérotés de 1 à 75 en fonction de leur position dans la séquence de la Cycline B1, de la région N-terminale à la région C-terminale. L'ensemble de ces peptides a ensuite été testé pour sa capacité de liaison aux molécules HLA-II (DR et DP4) les plus représentées dans la population caucasienne.

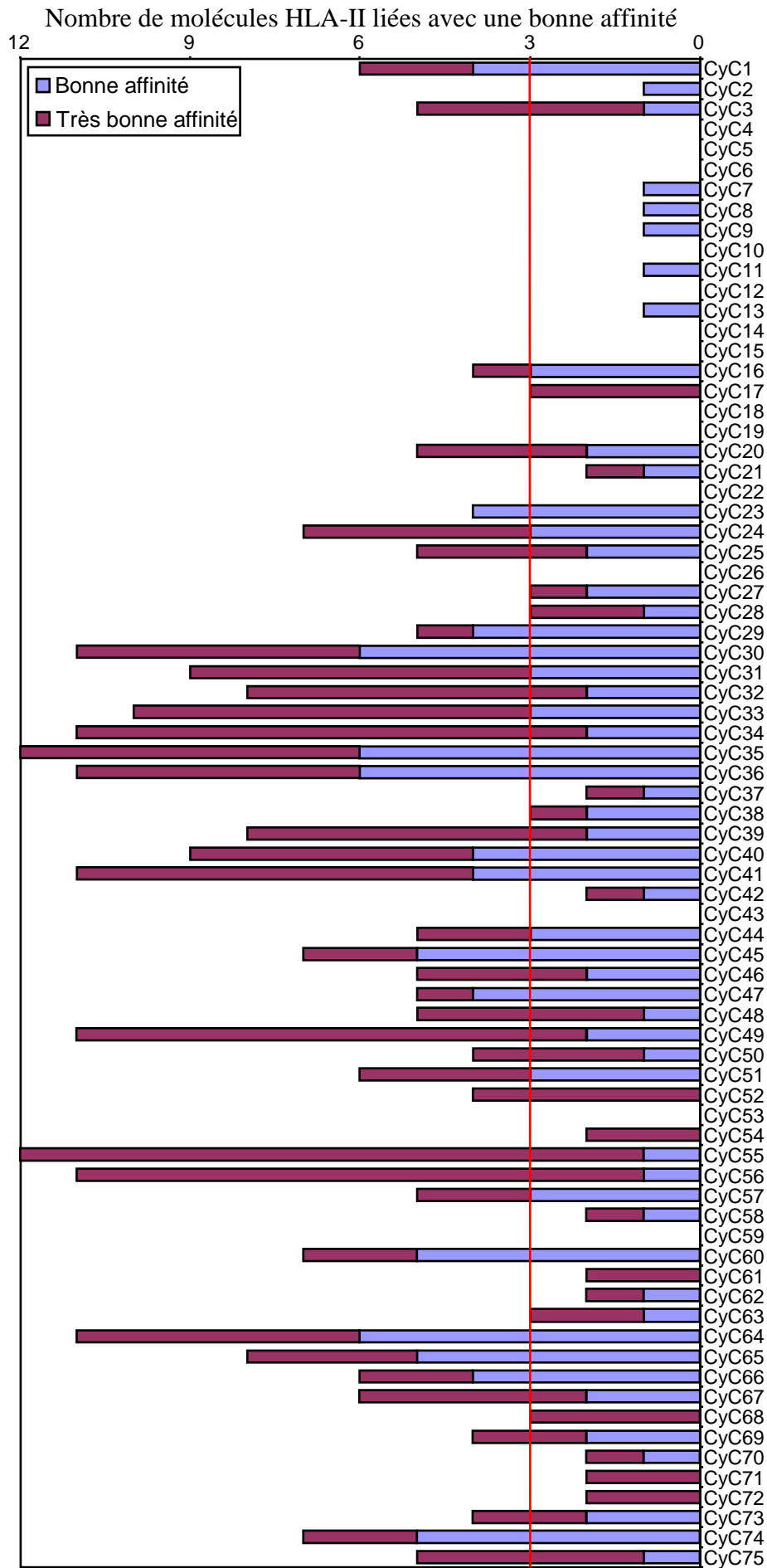


Figure 40 : Capacité de liaison des peptides de la Cycline B1 aux molécules HLA-DR et HLA-DP4

Des peptides couvrant toute la séquence de la Cycline B1 ont été soumis à un test de liaison sur 12 molécules HLA-DR et HLA-DP4. Des peptides référence ont été utilisés pour valider chaque test. Ces peptides sont les formes non biotinylés des peptides biotinylés utilisés dans les tests et correspondent à de très bons liants. Les résultats ont été exprimés sous forme d'activité relative (ratio IC50 peptide testé / IC50 du peptide de référence) et correspondent à la moyenne de trois expériences. Les histogrammes correspondent aux nombres de molécules HLA-II, parmi les 12 testés, que les peptides de la Cycline B1(CyC) sont capables de lier avec une bonne affinité (20 < activité relative < 100; histogrammes bleus) et une très bonne affinité (activité relative < 20; histogrammes rouges). La lignée rouge permet de discriminer les peptides de la Cycline B1 capables de se lier à plus de 3 molécules HLA-II différentes avec une bonne affinité, de ceux qui le ne sont pas. Les peptides ont été numérotés de 1 à 75 en fonction de leur position dans la séquence de la Cycline B1, de la région N-terminale à la région C-terminale.

Le principe du test de liaison est celui d'un test ELISA en compétition décrit dans la partie « matériel et méthode » de l'article Survivine. Nous avons testé la capacité de liaison de ces peptides vis-à-vis de douze molécules HLA-II. Ces dernières correspondent à 10 molécules HLA-DR : sept molécules codées par les gènes HLADRB1 (HLA-DRB1*0101, *0301, *0401, *0701, *1101, *1301, *1501), trois molécules codées par les gènes HLA-DRB3*0101, HLA-DRB4*0101, HLA-DRB5*0101 et deux molécules HLA-DP codées par les gènes HLA-DPB1*0401 et HLA-DPB1*0402. Les résultats ont été exprimés sous forme d'activité relative (ratio IC50 peptide testé / IC50 du peptide de référence) et correspondent à la moyenne de trois expériences différentes. Le seuil d'activité pour discriminer les peptides actifs des peptides inactifs est toujours une activité relative inférieure à 100. Le nombre de molécules HLA-II, sur les 12 testées, que les différents peptides de la Cycline B1 testés sont capables de lier avec une bonne affinité est représenté dans la Figure 40.

Les tests de liaison montrent que 39 peptides sur les 75 sont capables de se lier à plus de 3 molécules HLA-II avec une bonne, voir très bonne, affinité. La Figure 40 montre que ces 39 peptides sont principalement localisés dans la région centrale et C-terminale de la protéine Cycline B1. Nous pouvons également voir que les peptides 30 à 36, présents dans la région centrale de la protéine, sont capables de se lier à plus de 8 molécules HLA-II. Les peptides 35 et 55 sont qu'en à eux capables de se lier à l'ensemble des molécules HLA testées.

Au vu du grand nombre de peptides capables de se lier à plusieurs molécules HLA-II, nous avons décidé d'induire des lignées T CD4+ issues de donneurs sains à l'aide de la protéine entière chargée sur des DC immatures. Cette technique d'induction présente l'avantage de tester l'immunogénicité de l'ensemble des peptides dérivés de la Cycline B1 et d'identifier les épitopes T CD4+ immunodominants. Cependant, elle nécessite au préalable la production en quantité suffisante de l'Ag natif.

2. Synthèse et purification de la Cycline B1

La Cycline B1 a été produite dans des bactéries *Escherichia coli* sous forme de protéine recombinante comportant une série de 7 Histidines dans la partie N-terminale appelée Tag Histidine. Cette protéine recombinante a ensuite été purifiée par passage sur une colonne d'affinité HisTrap couplée avec du Nickel (Ni²⁺). Les ions Nickel sont en effet affins pour les Tag Histidine.

La qualité et la pureté de la protéine ont été évaluées par Western Blot et un séquençage N-terminal. La protéine était pure à plus de 75%.

Donneurs	Typage HLA II	Protéine	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5	Pool 6	Pool 7
P388	DR0701, DR1104, DRB4, DRB3	0	0	0	0	0	0	0	0
P425	DR0401, DR1301, DRB4 DRB3	39	0	0	0	0	3	0	0
P391	DR0301, DR0401, DRB3, DRB4	12	1	0	0	0	0	0	0
P423	DR701, DR1101, DRB4, DRB3	0	0	0	0	0	0	0	0
Total		51	1	0	0	0	3	0	0
Donneurs		2	1	0	0	0	1	0	0

Tableau 19 : Bilan des lignées de L_T CD4⁺ induites la protéine recombinante Cycline B1 et des pools de peptides par donneurs sains

3. Induction de lignées de lymphocytes T CD4+ contre la protéine Cycline B1

La capacité de la protéine Cycline B1 recombinante à induire des lignées cellulaires T CD4+ spécifiques a été étudiée sur 4 donneurs sains présentant des typages HLA-II différents. Le principe de la technique est le même que celui utilisé pour l'induction de lignées contre des peptides (voir la partie « matériels et méthodes » du papier portant sur la Survivine). La seule différence réside dans le fait que les cellules présentatrices d'Ag utilisées sont des DC autologues immatures préalablement chargées avec la protéine recombinante puis maturées avec du LPS.

Après 3 stimulations, on a recherché les lignées de L_T CD4+ spécifiques de la Cycline B1 par ELISpot IFN- γ en utilisant des DC immatures autologues comme cellules présentatrices préalablement incubées avec 10 μ M de l'Ag natif. Des DC immatures autologues non chargées ont été utilisées comme contrôle négatif. Un bilan des lignées T CD4+ induites par donneur est exposé dans le Tableau 19.

Des lignées T CD4+ spécifiques ont été induites chez deux donneurs : 39 issues du donneur P425 et 12 issues du donneur P391. Aucune lignée T n'a été induite chez les deux autres donneurs.

4. Identification d'épitopes T CD4+ dans la séquence de la Cycline B1

Après ce premier criblage, les lignées T CD4+ sélectionnées ont été testées pour leur capacité à reconnaître des peptides dérivés de la Cycline B1. Pour cela, les 75 peptides préalablement synthétisés ont été regroupés en 7 groupes (Pool) de 11 à 10 peptides. Chaque lignée de lymphocytes T a ensuite été incubée avec des PBMC autologues chargées avec l'un des groupes. L'activation de ces lignées a été évaluée par ELISpot IFN γ . Des PBMC autologues non chargées ont été utilisées comme témoin négatif. Les résultats de ces tests sont regroupés dans le Tableau 19.

Parmi les 51 lignées T CD4+ testées, 3 issues du donneur P425 et 1 issue du donneur P391 ont montré une faible activation en présence des peptides du groupe 5 et du groupe 1 respectivement. Cependant, ces 4 lignées n'ont montré aucune reconnaissance spécifique des peptides individuels issus de ces deux Groupes.

C. Discussion et perspectives

Nous avons réussi à induire de 51 lignées T CD4+ à partir de la préparation de Cycline B1 purifiée et présentée par des DC autologues. Cependant, aucune de ces lignées n'a montré de spécificité pour l'un des 75 peptides couvrant l'ensemble de la séquence de la Cycline B1. Cependant, au vu des résultats des tests de liaison, il nous semble très peu probable qu'aucun de ces peptides ne soit immunogène. Cette absence d'induction de lignées T CD4+ spécifiques de la Cycline B1 pourrait s'expliquer par la présence d'un contaminant très immunogène dans notre préparation de Cycline B1 recombinante.

La Cycline B1 utilisée pour les inductions était pure à plus de 75%. Une augmentation de la quantité de protéine analysée par Western Blot a permis de faire ressortir une bande correspondant à un contaminant d'environ 27 kDa. A l'aide d'un séquençage N-terminal, nous avons pu l'identifier comme étant la protéine SlyD d'*Escherichia coli*. C'est une propyl isomérase riche en histidine et donc capable de lier spécifiquement aux ions métalliques divalents comme le Nickel présent sur la colonne HisTrap. Lors de la purification de la Cycline B1, cette protéine s'est décrochée en même temps que notre protéine d'intérêt. Les lignées T CD4+ induites étaient donc probablement spécifiques de cette protéine bactérienne SlyD.

Un passage de la protéine recombinante Cycline B1 sur une colonne échangeuse d'ions (Colonne MonoQ) ne nous a pas permis d'éliminer ce contaminant. Après quelques recherches, nous avons trouvé une étude montrant que ce type de contaminant bactérien peut être éliminé par passage sur une colonne d'affinité HisTrap couplée non pas avec du Nickel mais avec du Cobalt. Les ions Cobalt sont en effet moins affins que les ions Nickel pour les séquences Histidine répétées. Cette différence d'affinité permet de réduire le taux de fixation non spécifique de protéines contaminantes. Nous sommes actuellement entrain de tester cette solution.

Les endotoxines sont une autre source probable de contamination. Les endotoxines sont des lipopolysaccharides solubles de la couche externe des membranes de toutes les bactéries gram négatives telles que les bactéries *Escherichia coli*. Elles sont relarguées lors de la lyse des bactéries. Lors de la synthèse de la Cycline B1, des endotoxines ont donc été libérées et ont pu se coller à notre protéine. Ces endotoxines, tels que le LPS, induisent une activation non spécifique des L_T ce qui peut expliquer nos résultats. C'est pourquoi, après avoir éliminé la protéine SlyD de notre préparation protéique, nous la passerons sur une colonne permettant d'éliminer ces endotoxines.

Une fois tous ces problèmes de purification résolus, nous re-testerons la capacité de la Cycline B1 à induire des réponses T CD4+.

Identification d'épitopes T CD4+ HLA-DP4 restreint dans les protéines TERT et Her2/neu

La Télomérase est une ribonucléoprotéine qui permet la synthèse d'ADN télomérique d'une façon dépendant de l'ARN. Cette synthèse permet le maintien de l'intégrité des télomères et donc une stabilité des chromosomes. Les cellules normales expriment peu ou pas de Télomérase et perdent donc de l'ADN télomérique à chaque division cellulaire (Cortez-Gonzalez et al., 2006). En revanche, cette enzyme est exprimée précocement dans de nombreuses tumeurs et dans certaines cellules qui ont un pouvoir de réplication élevé comme les cellules souches hématopoïétiques (Broccoli et al., 1995; Kim et al., 1994). Cette activation de la Télomérase est suffisante pour induire l'immortalisation cellulaire, événement clé dans le processus de transformation maligne (Meyerson et al., 1997). La sous-unité catalytique de la Télomérase appelée transcriptase inverse de la Télomérase (hTERT, human telomerase reverse transcriptase) est surexprimée dans plus de 90 % des cancers humains (Kim, 1997; Nakamura et al., 1997). Cette expression préférentielle de hTERT par les cellules tumorales, a fait de cette protéine une cible très attractive pour les thérapeutiques anticancéreuses (Shay and Wright, 2002).

La protéine Her2/neu (human epidermal growth factor receptor 2) est une glycoprotéine transmembranaire de 185 kDa appartenant à la famille des récepteurs de facteurs de croissance épidermique. Cette protéine est faiblement exprimée par de nombreuses cellules saines dans lesquelles elle joue un rôle dans la régulation de la croissance et de la prolifération cellulaire. En revanche, la protéine Her2/neu est surexprimée par de nombreux carcinomes tels que les cancers du sein, des ovaires, gastriques et colorectaux (Correa and Plunkett, 2001). Cette surexpression permet une dérégulation de la croissance des tumeurs et les rend moins sensibles aux chimiothérapies (Choudhury and Kiessling, 2004). Dans certains cancers du sein, cette surexpression est associée à une amplification du gène codant pour la protéine Her2/neu (Disis et al., 1999).

A. Objectifs de travail

Plusieurs études ont montré que la Télomérase (TERT) et la protéine Her2/Neu sont immunogéniques car des réponses T dirigées contre ces Ags ont été rapportées et des épitopes T CD8+ ainsi que quelques épitopes T CD4+ ont été identifiés (Adotevi et al., 2006; Correa and Plunkett, 2001; Schroers et al., 2003a; Vonderheide, 2008). Ces dernières années, certains de ces épitopes ont été inclus dans des essais de vaccination (Adotevi et al., 2004; Correa and Plunkett, 2001; Salazar et al., 2003; Su et al., 2005).

Les épitopes T CD8+ dérivés de ces Ags peuvent être utilisés pour une stratégie de vaccination chez de nombreux patients car ils sont restreints aux molécules de classe I les plus représentés dans la population notamment les molécules HLA-A2 et HLA-A24. Cependant, aucun épitope T CD4+ identifié n'est restreint aux molécules HLA-DP4 qui sont les molécules de classe II les plus représentées dans la population.

Notre objectif a été d'identifier des épitopes T CD4+ restreints aux molécules HLA-DP4 dans les séquences de la Télomérase et de la protéine Her2/neu. De tels peptides pourraient servir à la fois à la préparation de vaccins anti-tumoraux mais aussi pour le suivi de réponses immunes dirigées contre ces Ags.

Afin de réaliser cette étude, nous nous sommes basé sur un protocole comprenant 3 étapes :

- ❖ Prédiction des peptides ligands des molécules HLA-DP4
- ❖ Évaluation de la liaison aux molécules HLA-DP4
- ❖ Induction *in vitro* de lignées de L_T CD4+ issus de sujets naïfs HLA-DP4+

B. Résultats

1. Prédiction des peptides ligands des molécules HLA-DP4

Les Ags TERT et Her2/neu sont de très grosses protéines qui contiennent respectivement 1130 et 1250 acides aminés. Du fait de la taille de ces deux protéines, les approches basées sur la synthèse et l'analyse des peptides chevauchants ne sont pas applicables pour identifier des épitopes T CD4+ dérivés de ces deux Ags. Les séquences de la Télomérase et de la protéine Her2/neu ont donc été analysées à l'aide d'une matrice de prédiction de liaison aux molécules HLA-DP4 (HLA-DP*0401 et HLA-DP*0402) développée dans le laboratoire afin de sélectionner des peptides potentiellement capables de se lier à ces deux molécules HLA-II (Busson et al., 2006; Castelli et al., 2002). Cette analyse permet de réduire le nombre de peptides à synthétiser et à tester. Les résultats de ces prédictions de liaison aux molécules HLA-DP4 sont présentés dans le Tableaux 20.

Ainsi, nous avons sélectionné 22 et 20 peptides de 15 résidus dérivés de la Télomérase et de la protéine Her2/neu respectivement avec un seuil de prédiction inférieur à 500nM. Ces peptides ont été synthétisés chimiquement en phase solide selon la stratégie Fmoc sur un synthétiseur multiple et purifiés si nécessaire par chromatographie (HPLC). La qualité de chaque peptide a été contrôlée par spectrométrie de masse.

Nous avons ensuite évalué la capacité de liaison de ces 42 peptides aux molécules HLA-DP4 à l'aide d'un test de liaison *in vitro*.

	IC50				IC50		
	prédites	observées			prédites	observées	
	DP401	DP401	DP402		DP401	DP401	DP402
TERT 1	30	2	6	HER2 1	60	7	12
TERT 2	60	1 497	210	HER2 2	60	305	130
TERT 3	120	15	10	HER2 3	60	235	187
TERT 4	120	1 149	2 329	HER2 4	60	11	9
TERT 5	160	186	3	HER2 5	60	186	144
TERT 6	160	6	5	HER2 6	140	7 000	6 604
TERT 7	160	70	2	HER2 7	140	126	97
TERT 8	180	400	>2 263	HER2 8	156	512	386
TERT 9	180	11	40	HER2 9	220	6	4
TERT 10	220	62	105	HER2 10	240	>100000	1 007
TERT 11	240	424	84	HER2 11	311	923	152
TERT 12	240	75	6	HER2 12	320	>100000	9 283
TERT 13	240	695	206	HER2 13	360	>100000	4 899
TERT 14	240	>1 605	372	HER2 14	360	632	796
TERT 15	255	216	165	HER2 15	360	4 327	1 754
TERT 16	255	>1 605	>2 263	HER2 16	360	>100000	5 966
TERT 17	270	1	1	HER2 17	360	574	4 327
TERT 18	360	9	3	HER2 18	360	16	13
TERT 19	360	13	12	HER2 19	360	6	4
TERT 20	360	21	88	HER2 20	360	716	29
TERT 21	360	1 530	174				
TERT 22	360	81	1 017				

Tableau 20 : Tests de liaison des peptides sélectionnés dérivés de la Télomérase et de la protéine Her2/neu aux molécules HLA-DPB1*0401 et DPB1*0402

Les valeurs d'IC50 sont exprimées en nM et correspondent à la valeur moyenne d'au moins deux expériences indépendantes. La spécificité de chaque test est estimée sur les valeurs d'IC50 des peptides de référence, qui ne doivent pas varier de plus d'un facteur 3 (Données non présentées). Les IC50 inférieurs à 1000 nM sont indiqués en rouge.

2. Évaluation de la liaison aux molécules HLA-DP4

Le principe du test de liaison est celui d'un test ELISA en compétition dont le protocole est décrit en détail dans la partie « matériels et méthodes » de l'article Survivine. Les résultats sont exprimés sous forme d'IC50. Nous avons fixé le seuil d'activité pour discriminer les peptides actifs à une IC50 inférieure à 1000 nM. Les résultats de tests de liaison aux molécules HLA-DP4 des 22 peptides de la Télomérase et des 20 peptides de la protéine Her2/neu sont présentés dans le Tableau 20.

Les résultats du Tableau 20 montrent que 14 peptides dérivés de la Télomérase (TERT) sur les 22 sélectionnés sont capables de lier efficacement les molécules HLA-DP*0401 et/ou HLA-DP*0402.

Pour la protéine Her2/neu, ce sont également 14 peptides sur les 20 sélectionnés, qui ont une forte affinité pour les molécules HLA-DP*0401 et/ou HLA-DP*0402 (Tableau 18). Ces résultats montrent que la matrice de prédiction de liaison aux molécules HLA-DP4 développée dans notre laboratoire est très fiable.

Les 28 peptides dérivés de la Télomérase et de la protéine Her2/neu identifiés comme étant affins pour les molécules HLA-DP4, ont ensuite été testés pour leur capacité d'induction de lignées T CD4+ issues de donneurs sains naïfs HLA-DP4+.

3. Induction *in vitro* de lignées de lymphocytes T CD4+ issues de sujets naïfs HLA-DP4

Pour ces tests d'induction *in vitro*, les 14 peptides de la Télomérase (TERT) et ceux de la protéine Her2/neu ont été divisés en deux groupes. La répartition des peptides dans les groupes a été faite en fonction des IC50 obtenues lors des tests de liaison sur les molécules HLA-DP4. Ainsi, deux groupes (A) de forte affinité ont été créés, comprenant les peptides TERT 1, 3, 6, 9, 17, 18, 19, et HER2 1, 4, 5, 7, 9, 18, 19, et deux groupes (B) d'affinités plus faibles comprenant les peptides TERT 5, 7, 10, 12, 13, 20, 22, et HER2 2, 3, 8, 11, 14, 17, 20.

Le principe de la technique d'induction utilisée est décrit en détail dans la partie « matériels et méthodes » de l'article Survivine. En bref, des cellules T CD4+ ont été purifiées à partir de PBMC collectées à partir du sang de donneurs sains préalablement typés pour leurs molécules HLA-DP. Les monocytes ont été séparés et différenciés en DC. Les DC matures obtenues ont été chargées avec le mélange de peptides d'un des groupes puis mises en culture avec des cellules T CD4+ autologues purifiées, dans des plaques 96 puits. Ces cocultures ont été restimulées chaque semaine avec des DC chargées et un cocktail de cytokines. La spécificité des cellules T CD4+ a ensuite été étudiée par Elispot IFN- γ après 28 jours de coculture. Pour cela,

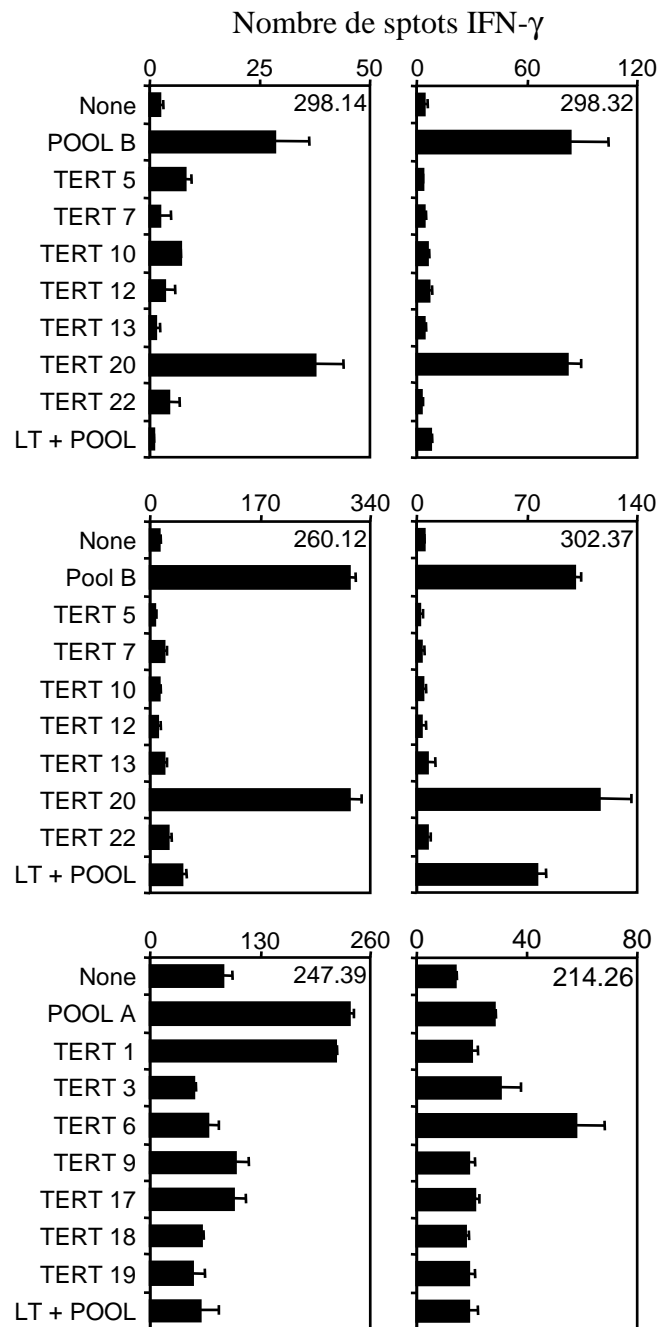


Figure 41 : Spécificité peptidique des lignées de L_T CD4⁺ issues de donneurs sains HLA-DP4 induites contre des peptides TERT

Des lignées de L_T CD4⁺ issues de 5 donneurs sains (P298, P260, P302, P247 et P214) ont été obtenues après 3 semaines de stimulations par des DC autologues matures chargées avec un mélange de 7 peptides TERT du pool A (TERT 1, 3, 6, 9, 17, 18, 19) ou du pool B (TERT 5, 7, 10, 12, 13, 20, 22). La spécificité de ces lignées T a été évaluée par Elispot IFN- γ . Pour cela, des lignées de L_T CD4⁺ ($1 \cdot 10^4$ /puits) ont été incubés en duplicate avec des cellules L-DP4 ($3 \cdot 10^4$ /puits) en présence ou en absence de peptide TERT. Le nombre de spots a été évalué après 24h d'incubation.

les cellules T CD4⁺ ont été incubées avec des cellules murines L transfectées stablement avec un plasmide codant pour les molécules HLA-DP4*0101 et HLA-DP4*0201 (L-DP4), comme cellules présentatrices, chargées soit avec le mélange de peptides soit avec les peptides individuels. Des cellules L-DP4 non chargées ont été utilisées comme contrôle négatif. L'utilisation de cellules L-DP4 nous permet d'avoir directement accès à la restriction des lignées de L_T CD4⁺ étudiées.

La capacité d'induction de lignées T CD4⁺ par les peptides de la Télomérase et de la protéine Her2/neu a été étudiée respectivement chez 11 et 8 donneurs sains HLA-DP4⁺. Les résultats de ces inductions sont représentés dans la Figure 41 pour la Télomérase et dans la Figure 42 pour la protéine Her2/neu.

Les résultats de la Figure 41 montrent que des lignées T CD4⁺ restreintes à HLA-DP4 ont été induites contre 4 peptides de la Télomérase : les peptides TERT 1, 3, 6 et 20 qui ont permis d'induire respectivement 1, 8, 8 et 10 lignées T CD4⁺ issues de 8 donneurs sains sur les 11 étudiés. Une lignée T CD4⁺ spé du peptide TERT 20 s'est même montrée capable de reconnaître un lysat de cellules tumorales TERT^{+/+} présenté par des cellules dendritiques immatures autologues.

Trois peptides de la protéine Her2/neu ont également induit des lignées T CD4⁺ restreintes à HLA-DP4 chez 2 sur les 7 donneurs sains étudiés (Figure 42) : les peptides HER2 3, 11 et 19 qui ont permis d'induire respectivement 2, 1 et 1 lignées.

L'ensemble de ces résultats montrent que les peptides Her2/neu sont moins immunogènes que les peptides TERT car ils ont permis d'induire moins de lignées T CD4⁺ pour un nombre équivalent de donneurs sains étudiés.

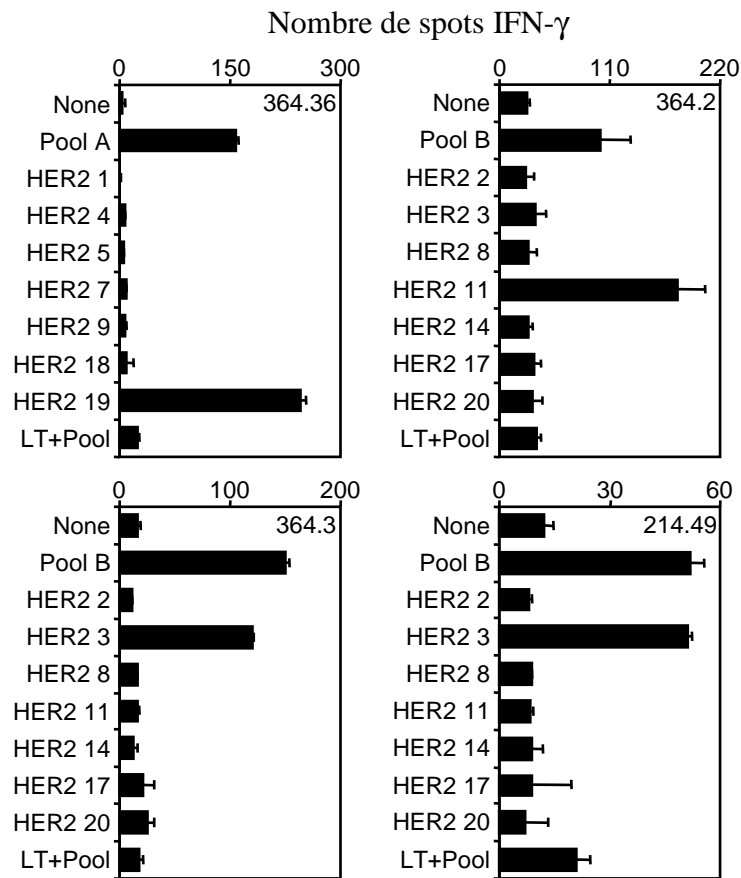


Figure 42 : Spécificité peptidique des lignées de L_T CD4+ issues de donneurs sains HLA-DP4 induites contre des peptides Her2/Neu

Des lignées de L_T CD4+ issues de 2 donneurs sains HLA-DP4 (P364 et P214) ont été obtenues après 3 semaines de stimulations par des DC autologues matures chargées avec un mélange de 7 peptides de la protéine Her2/Neu du pool A (HER2 1, 4, 5, 7, 9, 18, 19) ou du pool B (HER2 2, 3, 8, 11, 14, 17, 20). La spécificité de ces lignées T a été évaluée par Elispot IFN- γ . Pour cela, des lignées de L_T CD4+ (1.10^4 /puits) ont été incubées en duplicate avec des cellules L-DP4 (3.10^4 /puits) en présence ou en absence de peptide. Le nombre de spots a été évalué après 24h d'incubation.

C. Discussion et perspectives

La Télomérase et la protéine Her2/neu sont des cibles de choix pour l'immunothérapie anti-tumorale du fait de leur expression dans de nombreuses cellules tumorales et parce qu'elles permettent d'induire des réponses T CD8+ et T CD4+. Notre participation à ce projet a permis d'identifier 3 nouveaux épitopes T CD4+ HLA-DP4 restreints dérivés de la Télomérase et 3 dérivés de la protéine Her2/neu.

Actuellement, nous confirmons la capacité de lignées T CD4+ spécifiques de peptides de la Télomérase à reconnaître des lysats de cellules tumorales et nous testons leur capacité à reconnaître directement des tumorales.

Bibliographie

- Aarnoudse, C. A., van den Doel, P. B., Heemskerk, B., and Schrier, P. I. (1999). Interleukin-2-induced, melanoma-specific T cells recognize CAMEL, an unexpected translation product of LAGE-1. *Int J Cancer* 82, 442-448.
- Abelev, G. I., Tsvetkov, V. S., Biriulina, T. I., El'gort, D. A., and Olovnikov, A. M. (1971). [Evaluation of the use of highly sensitive methods of determining alpha-fetoprotein for the diagnosis of hepatocellular cancer and teratoblastoma]. *Biull Eksp Biol Med* 71, 75-81.
- Acuto, O., and Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 3, 939-951.
- Adachi, Y., Reynolds, P. N., Yamamoto, M., Grizzle, W. E., Overturf, K., Matsubara, S., Muramatsu, T., and Curiel, D. T. (2000). Midkine promoter-based adenoviral vector gene delivery for pediatric solid tumors. *Cancer Res* 60, 4305-4310.
- Adorini, L., Appella, E., Doria, G., and Nagy, Z. A. (1988). Mechanisms influencing the immunodominance of T cell determinants. *J Exp Med* 168, 2091-2104.
- Adotevi, O., Mollier, K., Neuveut, C., Cardinaud, S., Boulanger, E., Mignen, B., Fridman, W. H., Zanetti, M., Charneau, P., Tartour, E., *et al.* (2006). Immunogenic HLA-B*0702-restricted epitopes derived from human telomerase reverse transcriptase that elicit antitumor cytotoxic T-cell responses. *Clin Cancer Res* 12, 3158-3167.
- Adotevi, O., Pons, F. G., and Langlade-Demoyen, P. (2004). [Telomerase: a universal tumor antigen for anticancer immunotherapy]. *Med Sci (Paris)* 20, 19-21.
- Agarraberes, F. A., and Dice, J. F. (2001). A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* 114, 2491-2499.
- Aichinger, G., Karlsson, L., Jackson, M. R., Vestberg, M., Vaughan, J. H., Teyton, L., Lechler, R. I., and Peterson, P. A. (1997). Major histocompatibility complex class II-dependent unfolding, transport, and degradation of endogenous proteins. *J Biol Chem* 272, 29127-29136.
- Albert, M. L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89.
- Algarra, I., Collado, A., and Garrido, F. (1997). Altered MHC class I antigens in tumors. *Int J Clin Lab Res* 27, 95-102.
- Allan, C. P., Turtle, C. J., Mainwaring, P. N., Pyke, C., and Hart, D. N. (2004). The immune response to breast cancer, and the case for DC immunotherapy. *Cytotherapy* 6, 154-163.
- Almand, B., Resser, J. R., Lindman, B., Nadaf, S., Clark, J. I., Kwon, E. D., Carbone, D. P., and Gajewski, D. I. (2000). Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 6, 1755-1766.
- Altieri, D. C. (2001). The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7, 542-547.
- Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3, 917-921.
- Andersen, M. H., Pedersen, L. O., Capeller, B., Brocker, E. B., Becker, J. C., and Thor Straten, P. (2001). Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. *Cancer Res* 61, 5964-5968.

- Andersson, G., Andersson, L., Larhammar, D., Rask, L., and Sigurdardottir, S. (1994). Simplifying genetic locus assignment of HLA-DRB genes. *Immunol Today* *15*, 58-62.
- Arnold, P. Y., La Gruta, N. L., Miller, T., Vignali, K. M., Adams, P. S., Woodland, D. L., and Vignali, D. A. (2002). The majority of immunogenic epitopes generate CD4+ T cells that are dependent on MHC class II-bound peptide-flanking residues. *J Immunol* *169*, 739-749.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* *281*, 1305-1308.
- Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S. A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A., *et al.* (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* *104*, 155-162.
- Ashton-Rickardt, P. G., Bandeira, A., Delaney, J. R., Van Kaer, L., Pircher, H. P., Zinkernagel, R. M., and Tonegawa, S. (1994). Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* *76*, 651-663.
- Ayyoub, M., Mazarguil, H., Monsarrat, B., Van den Eynde, B., and Gairin, J. E. (1999). A structure-based approach to designing non-natural peptides that can activate anti-melanoma cytotoxic T cells. *J Biol Chem* *274*, 10227-10234.
- Ayyoub, M., Migliaccio, M., Guillaume, P., Lienard, D., Cerottini, J. C., Romero, P., Levy, F., Speiser, D. E., and Valmori, D. (2001). Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540-548-specific CD8(+) T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing. *Eur J Immunol* *31*, 2642-2651.
- Bakker, A. B., Schreurs, M. W., de Boer, A. J., Kawakami, Y., Rosenberg, S. A., Adema, G. J., and Figdor, C. G. (1994). Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* *179*, 1005-1009.
- Banchereau, J., and Palucka, A. K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* *5*, 296-306.
- Banchereau, J., Palucka, A. K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Taquet, N., Rolland, A., Taquet, S., Coquery, S., Wittkowski, K. M., Bhardwaj, N., *et al.* (2001). Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* *61*, 6451-6458.
- Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245-252.
- Barth, R. J., Jr., Mule, J. J., Spiess, P. J., and Rosenberg, S. A. (1991). Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* *173*, 647-658.
- Belldegrun, A., Muul, L. M., and Rosenberg, S. A. (1988). Interleukin 2 expanded tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell cancer: isolation, characterization, and antitumor activity. *Cancer Res* *48*, 206-214.
- BenMohamed, L., Bertrand, G., McNamara, C. D., Gras-Masse, H., Hammer, J., Wechsler, S. L., and Nesburn, A. B. (2003). Identification of novel immunodominant CD4+ Th1-type T-cell peptide epitopes from herpes simplex virus glycoprotein D that confer protective immunity. *J Virol* *77*, 9463-9473.

- Bennett, K., Levine, T., Ellis, J. S., Peanasky, R. J., Samloff, I. M., Kay, J., and Chain, B. M. (1992). Antigen processing for presentation by class II major histocompatibility complex requires cleavage by cathepsin E. *Eur J Immunol* 22, 1519-1524.
- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393, 478-480.
- Berd, D., Maguire, H. C., Jr., Schuchter, L. M., Hamilton, R., Hauck, W. W., Sato, T., and Mastrangelo, M. J. (1997). Autologous hapten-modified melanoma vaccine as postsurgical adjuvant treatment after resection of nodal metastases. *J Clin Oncol* 15, 2359-2370.
- Berzofsky, J. A., Terabe, M., Oh, S., Belyakov, I. M., Ahlers, J. D., Janik, J. E., and Morris, J. C. (2004). Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest* 113, 1515-1525.
- Besemer, J., Harant, H., Wang, S., Oberhauser, B., Marquardt, K., Foster, C. A., Schreiner, E. P., de Vries, J. E., Dascher-Nadel, C., and Lindley, I. J. (2005). Selective inhibition of cotranslational translocation of vascular cell adhesion molecule 1. *Nature* 436, 290-293.
- Bijker, M. S., van den Eeden, S. J., Franken, K. L., Melief, C. J., Offringa, R., and van der Burg, S. H. (2007). CD8+ CTL priming by exact peptide epitopes in incomplete Freund's adjuvant induces a vanishing CTL response, whereas long peptides induce sustained CTL reactivity. *J Immunol* 179, 5033-5040.
- Bijker, M. S., van den Eeden, S. J., Franken, K. L., Melief, C. J., van der Burg, S. H., and Offringa, R. (2008). Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation. *Eur J Immunol* 38, 1033-1042.
- Bishop, J. M. (1981). Enemies within: the genesis of retrovirus oncogenes. *Cell* 23, 5-6.
- Bishop, J. M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64, 235-248.
- Blattman, J. N., Grayson, J. M., Wherry, E. J., Kaech, S. M., Smith, K. A., and Ahmed, R. (2003). Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo. *Nat Med* 9, 540-547.
- Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* 67, 835-851.
- Boasso, A., Herbeuval, J. P., Hardy, A. W., Winkler, C., and Shearer, G. M. (2005). Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells. *Blood* 105, 1574-1581.
- Boczkowski, D., Nair, S. K., Snyder, D., and Gilboa, E. (1996). Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* 184, 465-472.
- Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T., and Thompson, C. B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3, 87-98.
- Bolonaki, I., Kotsakis, A., Papadimitraki, E., Aggouraki, D., Konsolakis, G., Vagia, A., Christophylakis, C., Nikoloudi, I., Magganas, E., Galanis, A., *et al.* (2007). Vaccination of patients with advanced non-small-cell lung cancer with an optimized cryptic human telomerase reverse transcriptase peptide. *J Clin Oncol* 25, 2727-2734.

- Bonnet, M. C., Tartaglia, J., Verdier, F., Kourilsky, P., Lindberg, A., Klein, M., and Moingeon, P. (2000). Recombinant viruses as a tool for therapeutic vaccination against human cancers. *Immunol Lett* 74, 11-25.
- Boon, T., Coulie, P., Marchand, M., Weynants, P., Wolfel, T., and Brichard, V. (1994). Genes coding for tumor rejection antigens: perspectives for specific immunotherapy. *Important Adv Oncol*, 53-69.
- Boon, T., Coulie, P. G., and Van den Eynde, B. (1997). Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* 18, 267-268.
- Bose, S., Stratford, F. L., Broadfoot, K. I., Mason, G. G., and Rivett, A. J. (2004). Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. *Biochem J* 378, 177-184.
- Bourgeois, C., Rocha, B., and Tanchot, C. (2002). A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* 297, 2060-2063.
- Bouvier, M., and Wiley, D. C. (1994). Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science* 265, 398-402.
- Bozzacco, L., Trumpfheller, C., Siegal, F. P., Mehandru, S., Markowitz, M., Carrington, M., Nussenzweig, M. C., Piperno, A. G., and Steinman, R. M. (2007). DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1289-1294.
- Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., *et al.* (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795-799.
- Brazil, M. I., Weiss, S., and Stockinger, B. (1997). Excessive degradation of intracellular protein in macrophages prevents presentation in the context of major histocompatibility complex class II molecules. *Eur J Immunol* 27, 1506-1514.
- Brett, S. J., Cease, K. B., and Berzofsky, J. A. (1988). Influences of antigen processing on the expression of the T cell repertoire. Evidence for MHC-specific hindering structures on the products of processing. *J Exp Med* 168, 357-373.
- Broccoli, D., Young, J. W., and de Lange, T. (1995). Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9082-9086.
- Burgdorf, S., Scholz, C., Kautz, A., Tampe, R., and Kurts, C. (2008). Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat Immunol* 9, 558-566.
- Busson, M., Castelli, F. A., Wang, X. F., Cohen, W. M., Charron, D., Menez, A., and Maillere, B. (2006). Prediction of CD4(+) T cell epitopes restricted to HLA-DP4 molecules. *J Immunol Methods* 317, 144-151.
- Buzyn, A., Petit, F., Ostankovitch, M., Figueiredo, S., Varet, B., Guillet, J. G., Ameisen, J. C., and Estaquier, J. (1999). Membrane-bound Fas (Apo-1/CD95) ligand on leukemic cells: A mechanism of tumor immune escape in leukemia patients. *Blood* 94, 3135-3140.
- Campi, G., Crosti, M., Consogno, G., Facchinetti, V., Conti-Fine, B. M., Longhi, R., Casorati, G., Dellabona, P., and Protti, M. P. (2003). CD4(+) T cells from healthy subjects and colon

cancer patients recognize a carcinoembryonic antigen-specific immunodominant epitope. *Cancer Res* 63, 8481-8486.

Carbone, E., Terrazzano, G., Ruggiero, G., Zanzi, D., Ottaiano, A., Manzo, C., Karre, K., and Zappacosta, S. (1999). Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells. *Eur J Immunol* 29, 4022-4029.

Casati, C., Dalerba, P., Rivoltini, L., Gallino, G., Deho, P., Rini, F., Belli, F., Mezzanzanica, D., Costa, A., Andreola, S., *et al.* (2003). The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 63, 4507-4515.

Castelli, F. A., Buhot, C., Sanson, A., Zarour, H., Pouvelle-Moratille, S., Nonn, C., Gahery-Segard, H., Guillet, J. G., Menez, A., Georges, B., and Maillere, B. (2002). HLA-DP4, the most frequent HLA II molecule, defines a new supertype of peptide-binding specificity. *J Immunol* 169, 6928-6934.

Castelli, F. A., Leleu, M., Pouvelle-Moratille, S., Farci, S., Zarour, H. M., Andrieu, M., Auriault, C., Menez, A., Georges, B., and Maillere, B. (2007). Differential capacity of T cell priming in naive donors of promiscuous CD4⁺ T cell epitopes of HCV NS3 and Core proteins. *Eur J Immunol* 37, 1513-1523.

Celli, S., Garcia, Z., Beuneu, H., Bousso, P. (2008). Decoding the dynamics of T cell-dendritic cell interactions in vivo. *Immunol Rev.* 221, 182-187.

Celis, E. (2007). Overlapping human leukocyte antigen class I/II binding peptide vaccine for the treatment of patients with stage IV melanoma: evidence of systemic immune dysfunction. *Cancer* 110, 203-214.

Chambers, C. A., Kuhns, M. S., Egen, J. G., and Allison, J. P. (2001). CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 19, 565-594.

Chaux, P., Luiten, R., Demotte, N., Vantomme, V., Stroobant, V., Traversari, C., Russo, V., Schultz, E., Cornelis, G. R., Boon, T., and 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. *J Immunol* 163, 2928-2936.

Chen, S., Bu, G., Takei, Y., Sakamoto, K., Ikematsu, S., Muramatsu, T., and Kadomatsu, K. (2007). Midkine and LDL-receptor-related protein 1 contribute to the anchorage-independent cell growth of cancer cells. *J Cell Sci* 120, 4009-4015.

Chen, W., Frank, M. E., Jin, W., and Wahl, S. M. (2001). TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 14, 715-725.

Chicz, R. M., Urban, R. G., Gorga, J. C., Vignali, D. A., Lane, W. S., and Strominger, J. L. (1993). Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med* 178, 27-47.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Yu, G. L., Lyons, R. H., Garg, M., Duan, D. R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J., and Dixit, V. M. (1996). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274, 990-992.

Chouaib, S., Echchakir, H., Angevin, E., Guerra, N., Kosmatopoulos, K., Caignard, A., Lim, A., Baron, V., Ferradini, L., and Mami-Chouaib, F. (2001). [Technological advances in immuno-oncology: from fundamental concepts to patient immunological monitoring]. *Bull Cancer* 88, 733-740.

- Choudhuri, R., Zhang, H. T., Donnini, S., Ziche, M., and Bicknell, R. (1997). An angiogenic role for the neurokinins midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res* *57*, 1814-1819.
- Choudhury, A., and Kiessling, R. (2004). Her-2/neu as a paradigm of a tumor-specific target for therapy. *Breast Dis* *20*, 25-31.
- Cochlovius, B., Stassar, M., Christ, O., Radrizzani, L., Hammer, J., Mytilineos, I., and Zoller, M. (2000). In vitro and in vivo induction of a Th cell response toward peptides of the melanoma-associated glycoprotein 100 protein selected by the TEPITOPE program. *J Immunol* *165*, 4731-4741.
- Cohen, P. A., Fowler, D. H., Kim, H., White, R. L., Czerniecki, B. J., Carter, C., Gress, R. E., and Rosenberg, S. A. (1994). Propagation of mouse and human T cells with defined antigen specificity and function. *Ciba Found Symp* *187*, 179-193; discussion 194-177.
- Cohen, P. A., Peng, L., Kjaergaard, J., Plautz, G. E., Finke, J. H., Koski, G. K., Czerniecki, B. J., and Shu, S. (2001). T-cell adoptive therapy of tumors: mechanisms of improved therapeutic performance. *Crit Rev Immunol* *21*, 215-248.
- Coley, W. B. (1891). II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg* *14*, 199-220.
- Consogno, G., Manici, S., Facchinetti, V., Bachi, A., Hammer, J., Conti-Fine, B. M., Rugarli, C., Traversari, C., and Protti, M. P. (2003). Identification of immunodominant regions among promiscuous HLA-DR-restricted CD4+ T-cell epitopes on the tumor antigen MAGE-3. *Blood* *101*, 1038-1044.
- Corman, J. M., Sercarz, E. E., and Nanda, N. K. (1998). Recognition of prostate-specific antigenic peptide determinants by human CD4 and CD8 T cells. *Clin Exp Immunol* *114*, 166-172.
- Cormier, J. N., Salgaller, M. L., Prevette, T., Barracchini, K. C., Rivoltini, L., Restifo, N. P., Rosenberg, S. A., and Marincola, F. M. (1997). Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan A. *Cancer J Sci Am* *3*, 37-44.
- Correa, I., and Plunkett, T. (2001). Update on HER-2 as a target for cancer therapy: HER2/neu peptides as tumour vaccines for T cell recognition. *Breast Cancer Res* *3*, 399-403.
- Correale, P., Walmsley, K., Nieroda, C., Zaremba, S., Zhu, M., Schlom, J., and Tsang, K. Y. (1997). In vitro generation of human cytotoxic T lymphocytes specific for peptides derived from prostate-specific antigen. *J Natl Cancer Inst* *89*, 293-300.
- Cortez-Gonzalez, X., Sidney, J., Adotevi, O., Sette, A., Millard, F., Lemonnier, F., Langlade-Demoyen, P., and Zanetti, M. (2006). Immunogenic HLA-B7-restricted peptides of hTERT. *Int Immunol* *18*, 1707-1718.
- Costello, R. T., Gastaut, J. A., and Olive, D. (1999). [Mechanisms of tumor escape from immunologic response]. *Rev Med Interne* *20*, 579-588.
- Coulie, P. G., Weynants, P., Lehmann, F., Herman, J., Brichard, V., Wolfel, T., Van Pel, A., De Plaen, E., Brasseur, F., and Boon, T. (1993). Genes coding for tumor antigens recognized by human cytolytic T lymphocytes. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* *14*, 104-109.
- Covini, G., Chan, E. K., Nishioka, M., Morshed, S. A., Reed, S. I., and Tan, E. M. (1997). Immune response to cyclin B1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* *25*, 75-80.

- Cox, A. L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R. A., Darrow, T. L., Shabanowitz, J., Engelhard, V. H., Hunt, D. F., and Slingluff, C. L., Jr. (1994). Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264, 716-719.
- Crosti, M., Longhi, R., Consogno, G., Melloni, G., Zannini, P., and Protti, M. P. (2006). Identification of novel subdominant epitopes on the carcinoembryonic antigen recognized by CD4+ T cells of lung cancer patients. *J Immunol* 176, 5093-5099.
- Dahl, A. M., Beverley, P. C., and Stauss, H. J. (1996). A synthetic peptide derived from the tumor-associated protein mdm2 can stimulate autoreactive, high avidity cytotoxic T lymphocytes that recognize naturally processed protein. *J Immunol* 157, 239-246.
- Dai, L. C., Shao, J. Z., Min, L. S., Xiao, Y. T., Xiang, L. X., and Ma, Z. H. (2008). Midkine accumulated in nucleolus of HepG2 cells involved in rRNA transcription. *World J Gastroenterol* 14, 6249-6253.
- Dai, L. C., Wang, X., Yao, X., Lu, Y. L., Ping, J. L., and He, J. F. (2006). Antisense oligonucleotides targeting midkine induced apoptosis and increased chemosensitivity in hepatocellular carcinoma cells. *Acta Pharmacol Sin* 27, 1630-1636.
- Davenport, M. P., Quinn, C. L., Chicz, R. M., Green, B. N., Willis, A. C., Lane, W. S., Bell, J. I., and Hill, A. V. (1995). Naturally processed peptides from two disease-resistance-associated HLA-DR13 alleles show related sequence motifs and the effects of the dimorphism at position 86 of the HLA-DR beta chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6567-6571.
- Davis, I. D., Chen, W., Jackson, H., Parente, P., Shackleton, M., Hopkins, W., Chen, Q., Dimopoulos, N., Luke, T., Murphy, R., *et al.* (2004). Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10697-10702.
- Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Muller, M., Kreymborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., *et al.* (2005). Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7922-7927.
- Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C., and Bhardwaj, N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 193, 233-238.
- Diepolder, H. M., Gerlach, J. T., Zachoval, R., Hoffmann, R. M., Jung, M. C., Wierenga, E. A., Scholz, S., Santantonio, T., Houghton, M., Southwood, S., *et al.* (1997). Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J Virol* 71, 6011-6019.
- Disis, M. L., Grabstein, K. H., Sleath, P. R., and Cheever, M. A. (1999). Generation of immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine. *Clin Cancer Res* 5, 1289-1297.
- Disis, M. L., Gooley, T. A., Rinn, K., Davis, D., Piepkorn, M., Cheever, M. A., Knutson, K. L., Schiffman, K. (2002). Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines. *J Clin Oncol* 20, 2624-2632.
- Dobrzanski, M. J., Reome, J. B., Hollenbaugh, J. A., and Dutton, R. W. (2004). Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses. *J Immunol* 172, 1380-1390.

- Duffield, J. S. (2003). The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (Lond)* *104*, 27-38.
- Duhra, P., and Ilchyshyn, A. (1991). Prolonged survival in metastatic malignant melanoma associated with vitiligo. *Clin Exp Dermatol* *16*, 303-305.
- Dunbar, P. R., Smith, C. L., Chao, D., Salio, M., Shepherd, D., Mirza, F., Lipp, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., Evans, A., *et al.* (2000). A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response. *J Immunol* *165*, 6644-6652.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* *3*, 991-998.
- Echchakir, H., Bagot, M., Dorothee, G., Martinvalet, D., Le Gouvello, S., Bousmell, L., Chouaib, S., Bensussan, A., and Mami-Chouaib, F. (2000). Cutaneous T cell lymphoma reactive CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones display a Th1 cytokine profile and use a fas-independent pathway for specific tumor cell lysis. *J Invest Dermatol* *115*, 74-80.
- El Hage, F., Stroobant, V., Vergnon, I., Baurain, J. F., Echchakir, H., Lazar, V., Chouaib, S., Coulie, P. G., and Mami-Chouaib, F. (2008). Preprocalcitonin signal peptide generates a cytotoxic T lymphocyte-defined tumor epitope processed by a proteasome-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 10119-10124.
- Elliott, G. T., McLeod, R. A., Perez, J., and Von Eschen, K. B. (1993). Interim results of a phase II multicenter clinical trial evaluating the activity of a therapeutic allogeneic melanoma vaccine (theraccine) in the treatment of disseminated malignant melanoma. *Semin Surg Oncol* *9*, 264-272.
- Engelhard, V. H., Bullock, T. N., Colella, T. A., Sheasley, S. L., and Mullins, D. W. (2002). Antigen derived from melanocyte differentiation proteins: self-tolerance, autoimmunity, and use for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* *188*, 136-146.
- Feltkamp, M. C., Vreugdenhil, G. R., Vierboom, M. P., Ras, E., van der Burg, S. H., ter Schegget, J., Melief, C. J., and Kast, W. M. (1995). Cytotoxic T lymphocytes raised against a subdominant epitope offered as a synthetic peptide eradicate human papillomavirus type 16-induced tumors. *Eur J Immunol* *25*, 2638-2642.
- Ferrini, S., Biassoni, R., Moretta, A., Bruzzone, M., Nicolin, A., and Moretta, L. (1985). Clonal analysis of T lymphocytes isolated from ovarian carcinoma ascitic fluid. Phenotypic and functional characterization of T-cell clones capable of lysing autologous carcinoma cells. *Int J Cancer* *36*, 337-343.
- Ferrone, S., and Marincola, F. M. (1995). Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* *16*, 487-494.
- Fisher, W. G., Yang, P. C., Medikonduri, R. K., and Jafri, M. S. (2006). NFAT and NFkappaB activation in T lymphocytes: a model of differential activation of gene expression. *Ann Biomed Eng* *34*, 1712-1728.
- Fisk, B., Blevins, T. L., Wharton, J. T., and Ioannides, C. G. (1995). Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J Exp Med* *181*, 2109-2117.
- Flynn, S., and Stockinger, B. (2003). Tumor and CD4 T-cell interactions: tumor escape as result of reciprocal inactivation. *Blood* *101*, 4472-4478.

- Fong, L., Brockstedt, D., Benike, C., Wu, L., and Engleman, E. G. (2001a). Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J Immunol* *166*, 4254-4259.
- Fong, L., and Engleman, E. G. (2000). Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* *18*, 245-273.
- Fong, L., Hou, Y., Rivas, A., Benike, C., Yuen, A., Fisher, G. A., Davis, M. M., and Engleman, E. G. (2001b). Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 8809-8814.
- Fons, R. D., Bogert, B. A., and Hegde, R. S. (2003). Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane. *J Cell Biol* *160*, 529-539.
- Fontana, A., Frei, K., Bodmer, S., Hofer, E., Schreier, M. H., Palladino, M. A., Jr., and Zinkernagel, R. M. (1989). Transforming growth factor-beta inhibits the generation of cytotoxic T cells in virus-infected mice. *J Immunol* *143*, 3230-3234.
- Gallimore, A., Hombach, J., Dumrese, T., Rammensee, H. G., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1998). A protective cytotoxic T cell response to a subdominant epitope is influenced by the stability of the MHC class I/peptide complex and the overall spectrum of viral peptides generated within infected cells. *Eur J Immunol* *28*, 3301-3311.
- Gammon, G., Shastri, N., Cogswell, J., Wilbur, S., Sadegh-Nasseri, S., Krzych, U., Miller, A., and Sercarz, E. (1987). The choice of T-cell epitopes utilized on a protein antigen depends on multiple factors distant from, as well as at the determinant site. *Immunol Rev* *98*, 53-73.
- Gao, F. G., Khammanivong, V., Liu, W. J., Leggatt, G. R., Frazer, I. H., and Fernando, G. J. (2002). Antigen-specific CD4+ T-cell help is required to activate a memory CD8+ T cell to a fully functional tumor killer cell. *Cancer Res* *62*, 6438-6441.
- Gapin, L., Bravo de Alba, Y., Casrouge, A., Cabaniols, J. P., Kourilsky, P., and Kanellopoulos, J. (1998). Antigen presentation by dendritic cells focuses T cell responses against immunodominant peptides: studies in the hen egg-white lysozyme (HEL) model. *J Immunol* *160*, 1555-1564.
- Garcia, P. D., Ou, J. H., Rutter, W. J., and Walter, P. (1988). Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. *J Cell Biol* *106*, 1093-1104.
- Garrett, S. C., Varney, K. M., Weber, D. J., and Bresnick, A. R. (2006). S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem* *281*, 677-680.
- Garrison, J. L., Kunkel, E. J., Hegde, R. S., and Taunton, J. (2005). A substrate-specific inhibitor of protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Nature* *436*, 285-289.
- Garver, R. I., Jr., Chan, C. S., and Milner, P. G. (1993). Reciprocal expression of pleiotrophin and midkine in normal versus malignant lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* *9*, 463-466.
- Garver, R. I., Jr., Radford, D. M., Donis-Keller, H., Wick, M. R., and Milner, P. G. (1994). Midkine and pleiotrophin expression in normal and malignant breast tissue. *Cancer* *74*, 1584-1590.
- Gaston, J. S., Goodall, J. C., Young, J. L., Young, S. P. (1997). Effect of polymorphism of the HLA-DPA1 chain on presentation of antigenic peptides. *Hum Immunol* *54*, 40-47.

- Geddert, H., Heep, H. J., Gabbert, H. E., and Sarbia, M. (2002). Expression of cyclin B1 in the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of Barrett esophagus. *Cancer* 94, 212-218.
- Gelder, C. M., Lamb, J. R., and Askonas, B. A. (1996). Human CD4+ T-cell recognition of influenza A virus hemagglutinin after subunit vaccination. *J Virol* 70, 4787-4790.
- Gett, A. V., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Geginat, J. (2003). T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol* 4, 355-360.
- Ghosh, P., Amaya, M., Mellins, E., and Wiley, D. C. (1995). The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378, 457-462.
- Girolomoni, G., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunol Today* 18, 102-104.
- Giuntoli, R. L., 2nd, Lu, J., Kobayashi, H., Kennedy, R., and Celis, E. (2002). Direct costimulation of tumor-reactive CTL by helper T cells potentiate their proliferation, survival, and effector function. *Clin Cancer Res* 8, 922-931.
- Gjertsen, M. K., Buanes, T., Rosseland, A. R., Bakka, A., Gladhaug, I., Soreide, O., Eriksen, J. A., Moller, M., Baksaas, I., Lothe, R. A., *et al.* (2001). Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 92, 441-450.
- Gnjatic, S., Atanackovic, D., Jager, E., Matsuo, M., Selvakumar, A., Altorki, N. K., Maki, R. G., Dupont, B., Ritter, G., Chen, Y. T., *et al.* (2003). Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8862-8867.
- Godefroy, E., Moreau-Aubry, A., Diez, E., Dreno, B., Jotereau, F., and Guilloux, Y. (2005). alpha v beta3-dependent cross-presentation of matrix metalloproteinase-2 by melanoma cells gives rise to a new tumor antigen. *J Exp Med* 202, 61-72.
- Godet, Y., Moreau-Aubry, A., Guilloux, Y., Vignard, V., Khammari, A., Dreno, B., Jotereau, F., and Labarriere, N. (2008). MELOE-1 is a new antigen overexpressed in melanomas and involved in adoptive T cell transfer efficiency. *J Exp Med* 205, 2673-2682.
- Gold, P., and Freedman, S. O. (1965). Demonstration of Tumor-Specific Antigens in Human Colonic Carcinomata by Immunological Tolerance and Absorption Techniques. *J Exp Med* 121, 439-462.
- Gorelik, L., and Flavell, R. A. (2001). Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* 7, 1118-1122.
- Gorsch, S. M., Memoli, V. A., Stukel, T. A., Gold, L. I., and Arrick, B. A. (1992). Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* 52, 6949-6952.
- Green, J. M., Noel, P. J., Sperling, A. I., Walunas, T. L., Gray, G. S., Bluestone, J. A., and Thompson, C. B. (1994). Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity* 1, 501-508.
- Grohmann, U., Fallarino, F., and Puccetti, P. (2003). Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* 24, 242-248.
- Gross, E. T. (1943). Ludwig Kallir. *Science* 97, 502.

- Guermonez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397-402.
- Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I., and Deretic, V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 119, 753-766.
- Hammer, J., Sturniolo, T., and Sinigaglia, F. (1997). HLA class II peptide binding specificity and autoimmunity. *Adv Immunol* 66, 67-100.
- Hammer, J., Valsasnini, P., Tolba, K., Bolin, D., Higelin, J., Takacs, B., and Sinigaglia, F. (1993). Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell* 74, 197-203.
- Hanson, H. L., Kang, S. S., Norian, L. A., Matsui, K., O'Mara, L. A., and Allen, P. M. (2004). CD4-directed peptide vaccination augments an antitumor response, but efficacy is limited by the number of CD8+ T cell precursors. *J Immunol* 172, 4215-4224.
- Harrington, L. E., Mangan, P. R., and Weaver, C. T. (2006). Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* 18, 349-356.
- Hartwell, L. H., and Kastan, M. B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science* 266, 1821-1828.
- Hassainya, Y., Garcia-Pons, F., Kratzer, R., Lindo, V., Greer, F., Lemonnier, F. A., Niedermann, G., and van Endert, P. M. (2005). Identification of naturally processed HLA-A2-restricted proinsulin epitopes by reverse immunology. *Diabetes* 54, 2053-2059.
- Hassan, K. A., El-Naggar, A. K., Soria, J. C., Liu, D., Hong, W. K., and Mao, L. (2001). Clinical significance of cyclin B1 protein expression in squamous cell carcinoma of the tongue. *Clin Cancer Res* 7, 2458-2462.
- Hegde, R. S., and Lingappa, V. R. (1997). Membrane protein biogenesis: regulated complexity at the endoplasmic reticulum. *Cell* 91, 575-582.
- Hegde, R. S., Mastrianni, J. A., Scott, M. R., DeFea, K. A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Lingappa, V. R. (1998). A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* 279, 827-834.
- Heiser, A., Coleman, D., Dannull, J., Yancey, D., Maurice, M. A., Lallas, C. D., Dahm, P., Niedzwiecki, D., Gilboa, E., and Vieweg, J. (2002). Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest* 109, 409-417.
- Helgason, C. D., Prendergast, J. A., Berke, G., and Bleackley, R. C. (1992). Peritoneal exudate lymphocyte and mixed lymphocyte culture hybridomas are cytolytic in the absence of cytotoxic cell proteinases and perforin. *Eur J Immunol* 22, 3187-3190.
- Henderson, R. A., Michel, H., Sakaguchi, K., Shabanowitz, J., Appella, E., Hunt, D. F., and Engelhard, V. H. (1992). HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. *Science* 255, 1264-1266.
- Henell, F., Berkenstam, A., Ahlberg, J., and Glaumann, H. (1987). Degradation of short- and long-lived proteins in perfused liver and in isolated autophagic vacuoles--lysosomes. *Exp Mol Pathol* 46, 1-14.

- Hicklin, D. J., Wang, Z., Arienti, F., Rivoltini, L., Parmiani, G., and Ferrone, S. (1998). beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J Clin Invest* 101, 2720-2729.
- Hidaka, H., Yagasaki, H., Takahashi, Y., Hama, A., Nishio, N., Tanaka, M., Yoshida, N., Villalobos, I. B., Wang, Y., Xu, Y., *et al.* (2007). Increased midkine gene expression in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 31, 1045-1051.
- Hirano, N., Butler, M. O., Xia, Z., Berezovskaya, A., Murray, A. P., Ansen, S., Kojima, S., and Nadler, L. M. (2006). Identification of an immunogenic CD8+ T-cell epitope derived from gamma-globin, a putative tumor-associated antigen for juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 108, 2662-2668.
- Hoffman, D. M., Gitlitz, B. J., Belldegrun, A., and Figlin, R. A. (2000). Adoptive cellular therapy. *Semin Oncol* 27, 221-233.
- Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., and Carbone, F. R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27.
- Hohn, H., Pilch, H., Gunzel, S., Neukirch, C., Hilmes, C., Kaufmann, A., Seliger, B., and Maeurer, M. J. (1999). CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes in cervical cancer recognize HLA-DR-restricted peptides provided by human papillomavirus-E7. *J Immunol* 163, 5715-5722.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J. L., Schneider, P., Seed, B., and Tschoop, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1, 489-495.
- Holti, L., Zelle-Rieser, C., Gander, H., Papesh, C., Ramoner, R., Bartsch, G., Rogatsch, H., Barsoum, A. L., Coggin, J. H., Jr., and Thurnher, M. (2002). Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 8, 3369-3376.
- Horiba, M., Kadomatsu, K., Nakamura, E., Muramatsu, H., Ikematsu, S., Sakuma, S., Hayashi, K., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Kuzuya, M., *et al.* (2000). Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice. *J Clin Invest* 105, 489-495.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D., and Desjardins, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-406.
- Houston, A., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F., and O'Connell, J. (2003). Fas ligand mediates immune privilege and not inflammation in human colon cancer, irrespective of TGF-beta expression. *Br J Cancer* 89, 1345-1351.
- Hsieh, J. K., Yap, D., O'Connor, D. J., Fogal, V., Fallis, L., Chan, F., Zhong, S., and Lu, X. (2002). Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 22, 78-93.
- Hudrisier, D., Mazarguil, H., Laval, F., Oldstone, M. B., and Gairin, J. E. (1996). Binding of viral antigens to major histocompatibility complex class I H-2Db molecules is controlled by dominant negative elements at peptide non-anchor residues. Implications for peptide selection and presentation. *J Biol Chem* 271, 17829-17836.

- Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., and Levitsky, H. (1998). The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 188, 2357-2368.
- Huppa, J. B., and Davis, M. M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 3, 973-983.
- Ichiki, Y., Hanagiri, T., Takenoyama, M., Baba, T., Fukuyama, T., Nagata, Y., Mizukami, M., So, T., Sugaya, M., Yasuda, M., *et al.* (2005). Tumor specific expression of survivin-2B in lung cancer as a novel target of immunotherapy. *Lung Cancer* 48, 281-289.
- Iezzi, G., Karjalainen, K., and Lanzavecchia, A. (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8, 89-95.
- Igney, F. H., Behrens, C. K., and Krammer, P. H. (2003). The influence of CD95L expression on tumor rejection in mice. *Eur J Immunol* 33, 2811-2821.
- Igney, F. H., and Krammer, P. H. (2002). Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* 71, 907-920.
- Ikematsu, S., Nakagawara, A., Nakamura, Y., Sakuma, S., Wakai, K., Muramatsu, T., and Kadomatsu, K. (2003a). Correlation of elevated level of blood midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas. *Br J Cancer* 88, 1522-1526.
- Ikematsu, S., Okamoto, K., Yoshida, Y., Oda, M., Sugano-Nagano, H., Ashida, K., Kumai, H., Kadomatsu, K., Muramatsu, H., Takashi, M., and Sakuma, S. (2003b). High levels of urinary midkine in various cancer patients. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 329-332.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.
- Itoh, K., Platsoucas, C. D., and Balch, C. M. (1988). Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas. Activation by interleukin 2 and autologous tumor cells, and involvement of the T cell receptor. *J Exp Med* 168, 1419-1441.
- Itoh, N., and Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 268, 10932-10937.
- Iwata, A., Riley, B. E., Johnston, J. A., and Kopito, R. R. (2005). HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem* 280, 40282-40292.
- Jaeger, E., Bernhard, H., Romero, P., Ringhoffer, M., Arand, M., Karbach, J., Ilsemann, C., Hagedorn, M., and Knuth, A. (1996). Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. *Int J Cancer* 66, 162-169.
- Jager, E., Gnjjatic, S., Nagata, Y., Stockert, E., Jager, D., Karbach, J., Neumann, A., Rieckenberg, J., Chen, Y. T., Ritter, G., *et al.* (2000). Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12198-12203.
- Jager, E., Ringhoffer, M., Dienes, H. P., Arand, M., Karbach, J., Jager, D., Ilsemann, C., Hagedorn, M., Oesch, F., and Knuth, A. (1996). Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. *Int J Cancer* 67, 54-62.

- Janeway, C. A., Jr. (2001). How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 3, 1167-1171.
- Jaramillo, A., Majumder, K., Manna, P. P., Fleming, T. P., Doherty, G., Dipersio, J. F., and Mohanakumar, T. (2002). Identification of HLA-A3-restricted CD8+ T cell epitopes derived from mammaglobin-A, a tumor-associated antigen of human breast cancer. *Int J Cancer* 102, 499-506.
- Jardetzky, T. S., Brown, J. H., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Chi, Y. I., Stauffacher, C., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. (1994). Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature* 368, 711-718.
- Jardetzky, T. S., Brown, J. H., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. (1996). Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 734-738.
- Johnsen, A. K., France, J., Nagy, N., Askew, D., Abdul-Karim, F. W., Gerson, S. L., Sy, M. S., and Harding, C. V. (2001). Systemic deficits in transporter for antigen presentation (TAP)-1 or proteasome subunit LMP2 have little or no effect on tumor incidence. *Int J Cancer* 91, 366-372.
- Johnsen, A. K., Templeton, D. J., Sy, M., and Harding, C. V. (1999). Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis. *J Immunol* 163, 4224-4231.
- Johnson, M. E., and Howerth, E. W. (2004). Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Vet Pathol* 41, 599-607.
- Jonuleit, H., Adema, G., and Schmitt, E. (2003). Immune regulation by regulatory T cells: implications for transplantation. *Transpl Immunol* 11, 267-276.
- Jonuleit, H., Giesecke-Tuettenberg, A., Tuting, T., Thurner-Schuler, B., Stuge, T. B., Paragnik, L., Kandemir, A., Lee, P. P., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A. H. (2001). A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 93, 243-251.
- Kadomatsu, K., Hagihara, M., Akhter, S., Fan, Q. W., Muramatsu, H., and Muramatsu, T. (1997). Midkine induces the transformation of NIH3T3 cells. *Br J Cancer* 75, 354-359.
- Kadomatsu, K., Tomomura, M., and Muramatsu, T. (1988). cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 151, 1312-1318.
- Kaneda, N., Talukder, A. H., Ishihara, M., Hara, S., Yoshida, K., and Muramatsu, T. (1996). Structural characteristics of heparin-line domain required for interaction of midkine with embryonic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 220, 108-112.
- Kao, H., Marto, J. A., Hoffmann, T. K., Shabanowitz, J., Finkelstein, S. D., Whiteside, T. L., Hunt, D. F., and Finn, O. J. (2001). Identification of cyclin B1 as a shared human epithelial tumor-associated antigen recognized by T cells. *J Exp Med* 194, 1313-1323.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C. H., Robbins, P. F., Rivoltini, L., Topalian, S. L., Miki, T., and Rosenberg, S. A. (1994). Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3515-3519.

Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K., Kang, X., Southwood, S., Robbins, P. F., Sette, A., Appella, E., and Rosenberg, S. A. (1995). Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J Immunol* 154, 3961-3968.

Kawamoto, H., Koizumi, H., and Uchikoshi, T. (1997). Expression of the G2-M checkpoint regulators cyclin B1 and cdc2 in nonmalignant and malignant human breast lesions: immunocytochemical and quantitative image analyses. *Am J Pathol* 150, 15-23.

Kawashima, I., Tsai, V., Southwood, S., Takesako, K., Sette, A., and Celis, E. (1999). Identification of HLA-A3-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes from carcinoembryonic antigen and HER-2/neu by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Res* 59, 431-435.

Kessler, J. H., Beekman, N. J., Bres-Vloemans, S. A., Verdijk, P., van Veelen, P. A., Kloosterman-Joosten, A. M., Vissers, D. C., ten Bosch, G. J., Kester, M. G., Sijts, A., *et al.* (2001). Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J Exp Med* 193, 73-88.

Keyomarsi, K., and Pardee, A. B. (1993). Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1112-1116.

Khanna, R., Burrows, S. R., Nicholls, J., and Poulsen, L. M. (1998). Identification of cytotoxic T cell epitopes within Epstein-Barr virus (EBV) oncogene latent membrane protein 1 (LMP1): evidence for HLA A2 supertype-restricted immune recognition of EBV-infected cells by LMP1-specific cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 28, 451-458.

Khong, H. T., and Restifo, N. P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3, 999-1005.

Khoury, S. J., Hancock, W. W., and Weiner, H. L. (1992). Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med* 176, 1355-1364.

Kim, C. J., Dessureault, S., Gabrilovich, D., Reintgen, D. S., and Slingluff, C. L., Jr. (2002). Immunotherapy for melanoma. *Cancer Control* 9, 22-30.

Kim, E. K., Cho, H. I., Yoon, S. H., Park, M. J., Sohn, H. J., Kim, H. J., Oh, S. T., and Kim, T. G. (2008). Efficient generation of survivin-specific cytotoxic T lymphocytes from healthy persons in vitro: quantitative and qualitative effects of CD4+ T cells. *Vaccine* 26, 3987-3997.

Kim, N. W. (1997). Clinical implications of telomerase in cancer. *Eur J Cancer* 33, 781-786.

Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., and Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015.

Kim, S. J., and Hegde, R. S. (2002). Cotranslational partitioning of nascent prion protein into multiple populations at the translocation channel. *Mol Biol Cell* 13, 3775-3786.

King, R. W., Jackson, P. K., and Kirschner, M. W. (1994). Mitosis in transition. *Cell* 79, 563-571.

- Knutson, K. L., Schiffman, K., and Disis, M. L. (2001). Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates HER-2/neu CD8 T-cell immunity in cancer patients. *J Clin Invest* 107, 477-484.
- Koide, N., Hada, H., Shinji, T., Ujike, K., Hirasaki, S., Yumoto, Y., Hanafusa, T., Kadomatsu, K., Muramatsu, H., Muramatsu, T., and Tsuji, T. (1999). Expression of the midkine gene in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 46, 3189-3196.
- Konishi, N., Nakamura, M., Nakaoka, S., Hiasa, Y., Cho, M., Uemura, H., Hirao, Y., Muramatsu, T., and Kadomatsu, K. (1999). Immunohistochemical analysis of midkine expression in human prostate carcinoma. *Oncology* 57, 253-257.
- Korkolopoulou, P., Kaklamanis, L., Pezzella, F., Harris, A. L., and Gatter, K. C. (1996). Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer* 73, 148-153.
- Kovacsovics-Bankowski, M., and Rock, K. L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267, 243-246.
- Koziol, J. A., Zhang, J. Y., Casiano, C. A., Peng, X. X., Shi, F. D., Feng, A. C., Chan, E. K., and Tan, E. M. (2003). Recursive partitioning as an approach to selection of immune markers for tumor diagnosis. *Clin Cancer Res* 9, 5120-5126.
- Krieg, A. M. (2000). Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. *Vaccine* 19, 618-622.
- Kuhn, J. R., and Poenie, M. (2002). Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity* 16, 111-121.
- Kushner, J., Bradley, G., Young, B., and Jordan, R. C. (1999). Aberrant expression of cyclin A and cyclin B1 proteins in oral carcinoma. *J Oral Pathol Med* 28, 77-81.
- Kutay, U., Ahnert-Hilger, G., Hartmann, E., Wiedenmann, B., and Rapoport, T. A. (1995). Transport route for synaptobrevin via a novel pathway of insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *Embo J* 14, 217-223.
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 1, 311-316.
- Lanier, L. L. (1998). Follow the leader: NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I. *Cell* 92, 705-707.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290, 92-97.
- Lechler, R., Aichinger, G., and Lightstone, L. (1996). The endogenous pathway of MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* 151, 51-79.
- Lee, G. R., Fields, P. E., and Flavell, R. A. (2001). Regulation of IL-4 gene expression by distal regulatory elements and GATA-3 at the chromatin level. *Immunity* 14, 447-459.
- Lehner, P. J., and Cresswell, P. (1996). Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 8, 59-67.
- Lemberg, M. K., and Martoglio, B. (2002). Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis. *Mol Cell* 10, 735-744.

- Lenschow, D. J., Walunas, T. L., and Bluestone, J. A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14, 233-258.
- Lethe, B., Lucas, S., Michaux, L., De Smet, C., Godelaine, D., Serrano, A., De Plaen, E., and Boon, T. (1998). LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *Int J Cancer* 76, 903-908.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3, 361-370.
- Lilley, B. N., Ploegh, H. L. (2004). A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429, 834-840.
- Liotta, L. A., and Kohn, E. C. (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411, 375-379.
- Liyanage, U. K., Moore, T. T., Joo, H. G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J. A., Strasberg, S. M., Eberlein, T. J., Goedegebuure, P. S., and Linehan, D. C. (2002). Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169, 2756-2761.
- Long, E. O. (1998). Signal sequences stop killer cells. *Nature* 391, 740-741, 743.
- Lovitch, S. B., Petzold, S. J., and Unanue, E. R. (2003). Cutting edge: H-2DM is responsible for the large differences in presentation among peptides selected by I-Ak during antigen processing. *J Immunol* 171, 2183-2186.
- Ludewig, B., Graf, D., Gelderblom, H. R., Becker, Y., Kroczeck, R. A., and Pauli, G. (1995). Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol* 25, 1943-1950.
- Lundin, K. U., Hofgaard, P. O., Omholt, H., Munthe, L. A., Corthay, A., and Bogen, B. (2003). Therapeutic effect of idiotype-specific CD4+ T cells against B-cell lymphoma in the absence of anti-idiotypic antibodies. *Blood* 102, 605-612.
- Ma, J., Wollmann, R., and Lindquist, S. (2002). Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* 298, 1781-1785.
- Mackensen, A., Carcelain, G., Viel, S., Raynal, M. C., Michalaki, H., Triebel, F., Bosq, J., and Hercend, T. (1994). Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma. *J Clin Invest* 93, 1397-1402.
- Mackey, M. F., Gunn, J. R., Maliszewsky, C., Kikutani, H., Noelle, R. J., and Barth, R. J., Jr. (1998). Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J Immunol* 161, 2094-2098.
- Madden, D. R. (1995). The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 13, 587-622.
- Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Kimura, T., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., and Noda, M. (1999). A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta. *J Biol Chem* 274, 12474-12479.
- Maeurer, M. J., Gollin, S. M., Martin, D., Swaney, W., Bryant, J., Castelli, C., Robbins, P., Parmiani, G., Storkus, W. J., and Lotze, M. T. (1996). Tumor escape from immune

recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J Clin Invest* 98, 1633-1641.

Malnati, M. S., Marti, M., LaVaute, T., Jaraquemada, D., Biddison, W., DeMars, R., and Long, E. O. (1992). Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. *Nature* 357, 702-704.

Mandelboim, O., Berke, G., Fridkin, M., Feldman, M., Eisenstein, M., and Eisenbach, L. (1994). CTL induction by a tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma. *Nature* 369, 67-71.

Mandic, M., Castelli, F., Janjic, B., Almunia, C., Andrade, P., Gillet, D., Brusic, V., Kirkwood, J. M., Maillere, B., and Zarour, H. M. (2005). One NY-ESO-1-derived epitope that promiscuously binds to multiple HLA-DR and HLA-DP4 molecules and stimulates autologous CD4+ T cells from patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J Immunol* 174, 1751-1759.

Manel, N., Unutmaz, D., and Littman, D. R. (2008). The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat Immunol* 9, 641-649.

Marchand, M., Punt, C. J., Aamdal, S., Escudier, B., Kruit, W. H., Keilholz, U., Hakansson, L., van Baren, N., Humblet, Y., Mulders, P., *et al.* (2003). Immunisation of metastatic cancer patients with MAGE-3 protein combined with adjuvant SBAS-2: a clinical report. *Eur J Cancer* 39, 70-77.

Marincola, F. M., Shamamian, P., Simonis, T. B., Abati, A., Hackett, J., O'Dea, T., Fetsch, P., Yannelli, J., Restifo, N. P., Mule, J. J., and *et al.* (1994). Locus-specific analysis of human leukocyte antigen class I expression in melanoma cell lines. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 16, 13-23.

Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Brush, J., Goddard, A., and Ashkenazi, A. (1998). Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Curr Biol* 8, 525-528.

Martoglio, B., and Dobberstein, B. (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* 8, 410-415.

Maruyama, K., Muramatsu, H., Ishiguro, N., and Muramatsu, T. (2004). Midkine, a heparin-binding growth factor, is fundamentally involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50, 1420-1429.

Marzo, A. L., Kinnear, B. F., Lake, R. A., Frelinger, J. J., Collins, E. J., Robinson, B. W., and Scott, B. (2000). Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol* 165, 6047-6055.

Mashal, R. D., Lester, S., Corless, C., Richie, J. P., Chandra, R., Propert, K. J., and Dutta, A. (1996). Expression of cell cycle-regulated proteins in prostate cancer. *Cancer Res* 56, 4159-4163.

Mashour, G. A., Ratner, N., Khan, G. A., Wang, H. L., Martuza, R. L., and Kurtz, A. (2001). The angiogenic factor midkine is aberrantly expressed in NF1-deficient Schwann cells and is a mitogen for neurofibroma-derived cells. *Oncogene* 20, 97-105.

- Matsumura, M., Fremont, D. H., Peterson, P. A., and Wilson, I. A. (1992). Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 257, 927-934.
- Mattes, J., Hulett, M., Xie, W., Hogan, S., Rothenberg, M. E., Foster, P., and Parish, C. (2003). Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process. *J Exp Med* 197, 387-393.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045.
- Mavroudis, D., Bolonakis, I., Cornet, S., Myllaki, G., Kanellou, P., Kotsakis, A., Galanis, A., Nikoloudi, I., Spyropoulou, M., Menez, J., *et al.* (2006). A phase I study of the optimized cryptic peptide TERT(572y) in patients with advanced malignancies. *Oncology* 70, 306-314.
- McCune, C. S., O'Donnell, R. W., Marquis, D. M., and Sahasrabudhe, D. M. (1990). Renal cell carcinoma treated by vaccines for active specific immunotherapy: correlation of survival with skin testing by autologous tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 32, 62-66.
- Melief, C. J., van der Burg, S. H. (2008). Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat Rev Cancer*. 8, 351-360
- Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R. L., Davidoff, M. J., Liu, Q., *et al.* (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90, 785-795.
- Michaelson, J. S., Bader, D., Kuo, F., Kozak, C., and Leder, P. (1999). Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes Dev* 13, 1918-1923.
- Milde-Langosch, K., Bamberger, A. M., Goemann, C., Rossing, E., Rieck, G., Kelp, B., and Loning, T. (2001). Expression of cell-cycle regulatory proteins in endometrial carcinomas: correlations with hormone receptor status and clinicopathologic parameters. *J Cancer Res Clin Oncol* 127, 537-544.
- Mincheff, M., Tchakarov, S., Zoubak, S., Loukinov, D., Botev, C., Altankova, I., Georgiev, G., Petrov, S., and Meryman, H. T. (2000). Naked DNA and adenoviral immunizations for immunotherapy of prostate cancer: a phase I/II clinical trial. *Eur Urol* 38, 208-217.
- Mishima, K., Asai, A., Kadomatsu, K., Ino, Y., Nomura, K., Narita, Y., Muramatsu, T., and Kirino, T. (1997). Increased expression of midkine during the progression of human astrocytomas. *Neurosci Lett* 233, 29-32.
- Mitchell, M. S., Lund, T. A., Sewell, A. K., Marincola, F. M., Paul, E., Schroder, K., Wilson, D. B., and Kan-Mitchell, J. (2007). The cytotoxic T cell response to peptide analogs of the HLA-A*0201-restricted MUC1 signal sequence epitope, M1.2. *Cancer Immunol Immunother* 56, 287-301.
- Mitsiadis, T. A., Muramatsu, T., Muramatsu, H., and Thesleff, I. (1995). Midkine (MK), a heparin-binding growth/differentiation factor, is regulated by retinoic acid and epithelial-mesenchymal interactions in the developing mouse tooth, and affects cell proliferation and morphogenesis. *J Cell Biol* 129, 267-281.
- Miyauchi, M., Yoshida, Y., Tada, Y., Narita, M., Maeda, T., Bahar, R., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Matsubara, S., Nakagawara, A., *et al.* (2001). Expression of herpes simplex

virus-thymidine kinase gene controlled by a promoter region of the midkine gene confers selective cytotoxicity to ganciclovir in human carcinoma cells. *Int J Cancer* 91, 723-727.

Mocellin, S., Mandruzzato, S., Bronte, V., Lise, M., and Nitti, D. (2004). Part I: Vaccines for solid tumours. *Lancet Oncol* 5, 681-689.

Moon, C., Oh, Y., and Roth, J. A. (2003). Current status of gene therapy for lung cancer and head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 9, 5055-5067.

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

Morgan, R. A., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Hughes, M. S., Yang, J. C., Sherry, R. M., Royal, R. E., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Restifo, N. P., *et al.* (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314, 126-129.

Morton, C. C., Kirsch, I. R., Nance, W. E., Evans, G. A., Korman, A. J., and Strominger, J. L. (1984). Orientation of loci within the human major histocompatibility complex by chromosomal in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2816-2820.

Morton, D. L., and Barth, A. (1996). Vaccine therapy for malignant melanoma. *CA Cancer J Clin* 46, 225-244.

Morton, D. L., Hoon, D. S., Nizze, J. A., Foshag, L. J., Famatiga, E., Wanek, L. A., Chang, C., Irie, R. F., Gupta, R. K., and Elashoff, R. (1993). Polyvalent melanoma vaccine improves survival of patients with metastatic melanoma. *Ann N Y Acad Sci* 690, 120-134.

Moudgil, K. D., and Sercarz, E. E. (1993). Dominant determinants in hen eggwhite lysozyme correspond to the cryptic determinants within its self-homologue, mouse lysozyme: implications in shaping of the T cell repertoire and autoimmunity. *J Exp Med* 178, 2131-2138.

Mullen, A. C., High, F. A., Hutchins, A. S., Lee, H. W., Villarino, A. V., Livingston, D. M., Kung, A. L., Cereb, N., Yao, T. P., Yang, S. Y., and Reiner, S. L. (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292, 1907-1910.

Mullins, D. W., Sheasley, S. L., Ream, R. M., Bullock, T. N., Fu, Y. X., and Engelhard, V. H. (2003). Route of immunization with peptide-pulsed dendritic cells controls the distribution of memory and effector T cells in lymphoid tissues and determines the pattern of regional tumor control. *J Exp Med* 198, 1023-1034.

Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A., and Mellor, A. L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 189, 1363-1372.

Munz, C. (2006). Autophagy and antigen presentation. *Cell Microbiol* 8, 891-898.

Murakami, H., Furihata, M., Ohtsuki, Y., and Ogoshi, S. (1999). Determination of the prognostic significance of cyclin B1 overexpression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 434, 153-158.

Muramaki, M., Miyake, H., Hara, I., and Kamidono, S. (2003). Introduction of midkine gene into human bladder cancer cells enhances their malignant phenotype but increases their sensitivity to antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res* 9, 5152-5160.

- Muramatsu, H., Song, X. J., Koide, N., Hada, H., Tsuji, T., Kadomatsu, K., Inui, T., Kimura, T., Sakakibara, S., and Muramatsu, T. (1996). Enzyme-linked immunoassay for midkine, and its application to evaluation of midkine levels in developing mouse brain and sera from patients with hepatocellular carcinomas. *J Biochem* 119, 1171-1175.
- Murphy, G. P., Tjoa, B. A., Simmons, S. J., Jarisch, J., Bowes, V. A., Ragde, H., Rogers, M., Elgamal, A., Kenny, G. M., Cobb, O. E., *et al.* (1999). Infusion of dendritic cells pulsed with HLA-A2-specific prostate-specific membrane antigen peptides: a phase II prostate cancer vaccine trial involving patients with hormone-refractory metastatic disease. *Prostate* 38, 73-78.
- Murray, A. (1995). Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell* 81, 149-152.
- Nagata, S., and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1456.
- Nagorsen, D., Keilholz, U., Rivoltini, L., Schmittel, A., Letsch, A., Asemissen, A. M., Berger, G., Buhr, H. J., Thiel, E., and Scheibenbogen, C. (2000). Natural T-cell response against MHC class I epitopes of epithelial cell adhesion molecule, her-2/neu, and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 60, 4850-4854.
- Nair, S. K., Boczkowski, D., Morse, M., Cumming, R. I., Lyerly, H. K., and Gilboa, E. (1998). Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat Biotechnol* 16, 364-369.
- Nair, S. K., Heiser, A., Boczkowski, D., Majumdar, A., Naoe, M., Lebkowski, J. S., Vieweg, J., and Gilboa, E. (2000). Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat Med* 6, 1011-1017.
- Nakagawara, A., Milbrandt, J., Muramatsu, T., Deuel, T. F., Zhao, H., Cnaan, A., and Brodeur, G. M. (1995). Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. *Cancer Res* 55, 1792-1797.
- Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B., and Cech, T. R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277, 955-959.
- Nedjic, J., Aichinger, M., and Klein, L. (2008). Autophagy and T cell education in the thymus: eat yourself to know yourself. *Cell Cycle* 7, 3625-3628.
- Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., and Schadendorf, D. (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4, 328-332.
- Nilsson, I., Whitley, P., and von Heijne, G. (1994). The COOH-terminal ends of internal signal and signal-anchor sequences are positioned differently in the ER translocase. *J Cell Biol* 126, 1127-1132.
- Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E. M., Pardoll, D. M., Bornkamm, G. W., and Mautner, J. (2003). Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol* 33, 1250-1259.
- Noguchi, M., Itoh, K., Suekane, S., Yao, A., Suetsugu, N., Katagiri, K., Yamada, A., Yamana, H., and Noda, S. (2004). Phase I trial of patient-oriented vaccination in HLA-A2-positive patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Sci* 95, 77-84.

- Noguchi, Y., Chen, Y. T., and Old, L. J. (1994). A mouse mutant p53 product recognized by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 3171-3175.
- Nozoe, T., Korenaga, D., Kabashima, A., Ohga, T., Saeki, H., and Sugimachi, K. (2002). Significance of cyclin B1 expression as an independent prognostic indicator of patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res* *8*, 817-822.
- Nurse, P. (1994). Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* *79*, 547-550.
- O'Brien, T., Cranston, D., Fuggle, S., Bicknell, R., and Harris, A. L. (1996). The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res* *56*, 2515-2518.
- Ochsenbein, A. F., Sierro, S., Odermatt, B., Pericin, M., Karrer, U., Hermans, J., Hemmi, S., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (2001). Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* *411*, 1058-1064.
- O'Connell, J., Houston, A., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., and Shanahan, F. (2001). Immune privilege or inflammation? Insights into the Fas ligand enigma. *Nat Med* *7*, 271-274.
- Odunsi, K., Qian, F., Matsuzaki, J., Mhawech-Fauceglia, P., Andrews, C., Hoffman, E. W., Pan, L., Ritter, G., VILLELLA, J., Thomas, B., *et al.* (2007). Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 12837-12842.
- Ohuchida, T., Okamoto, K., Akahane, K., Higure, A., Todoroki, H., Abe, Y., Kikuchi, M., Ikematsu, S., Muramatsu, T., and Itoh, H. (2004). Midkine protects hepatocellular carcinoma cells against TRAIL-mediated apoptosis through down-regulation of caspase-3 activity. *Cancer* *100*, 2430-2436.
- Oka, Y., Tsuboi, A., Taguchi, T., Osaki, T., Kyo, T., Nakajima, H., Elisseeva, O. A., Oji, Y., Kawakami, M., Ikegame, K., *et al.* (2004). Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 13885-13890.
- O'Rourke, M. G., Johnson, M., Lanagan, C., See, J., Yang, J., Bell, J. R., Slater, G. J., Kerr, B. M., Crowe, B., Purdie, D. M., *et al.* (2003). Durable complete clinical responses in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother* *52*, 387-395.
- Otto, K., Andersen, M. H., Eggert, A., Keikavoussi, P., Pedersen, L. O., Rath, J. C., Bock, M., Brocker, E. B., Straten, P. T., Kampgen, E., and Becker, J. C. (2005). Lack of toxicity of therapy-induced T cell responses against the universal tumour antigen survivin. *Vaccine* *23*, 884-889.
- Ouyang, W., Kolls, J. K., and Zheng, Y. (2008). The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* *28*, 454-467.
- Oyama, T., Ran, S., Ishida, T., Nadaf, S., Kerr, L., Carbone, D. P., and GABRILOVICH, D. I. (1998). Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* *160*, 1224-1232.
- Palmowski, M. J., Choi, E. M., Hermans, I. F., Gilbert, S. C., Chen, J. L., Gileadi, U., Salio, M., Van Pel, A., Man, S., Bonin, E., *et al.* (2002). Competition between CTL narrows the immune response induced by prime-boost vaccination protocols. *J Immunol* *168*, 4391-4398.

- Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T., and Munz, C. (2005). Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* *307*, 593-596.
- Pardoll, D. (2003). Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* *21*, 807-839.
- Parker, K. C., Bednarek, M. A., and Coligan, J. E. (1994). Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol* *152*, 163-175.
- Parmiani, G., Castelli, C., Dalerba, P., Mortarini, R., Rivoltini, L., Marincola, F. M., and Anichini, A. (2002). Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *J Natl Cancer Inst* *94*, 805-818.
- Parmiani, G., Pilla, L., Castelli, C., and Rivoltini, L. (2003). Vaccination of patients with solid tumours. *Ann Oncol* *14*, 817-824.
- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2004). Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity* *21*, 733-741.
- Pena, S. V., and Krensky, A. M. (1997). Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Semin Immunol* *9*, 117-125.
- Pfreundschuh, M. (2000). Exploitation of the B cell repertoire for the identification of human tumor antigens. *Cancer Chemother Pharmacol* *46 Suppl*, S3-7.
- Pfreundschuh, M., Shiku, H., Takahashi, T., Ueda, R., Ransohoff, J., Oettgen, H. F., and Old, L. J. (1978). Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *75*, 5122-5126.
- Ponder, B. A. (2001). Cancer genetics. *Nature* *411*, 336-341.
- Powrie, F., Correa-Oliveira, R., Mauze, S., and Coffman, R. L. (1994). Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J Exp Med* *179*, 589-600.
- Preuss, K. D., Zwick, C., Bormann, C., Neumann, F., and Pfreundschuh, M. (2002). Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms. *Immunol Rev* *188*, 43-50.
- Qi, L., Rojas, J. M., and Ostrand-Rosenberg, S. (2000). Tumor cells present MHC class II-restricted nuclear and mitochondrial antigens and are the predominant antigen presenting cells in vivo. *J Immunol* *165*, 5451-5461.
- Qi, M., Ikematsu, S., Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Sakuma, S., Noda, M., Muramatsu, T., and Kadomatsu, K. (2001). Haptotactic migration induced by midkine. Involvement of protein-tyrosine phosphatase zeta. Mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* *276*, 15868-15875.
- Qin, Z., and Blankenstein, T. (2000). CD4⁺ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* *12*, 677-686.

- Raddrizzani, L., Sturniolo, T., Guenot, J., Bono, E., Gallazzi, F., Nagy, Z. A., Sinigaglia, F., and Hammer, J. (1997). Different modes of peptide interaction enable HLA-DQ and HLA-DR molecules to bind diverse peptide repertoires. *J Immunol* *159*, 703-711.
- Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A., and Stevanovic, S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* *50*, 213-219.
- Rammensee, H. G., Friede, T., and Stevanovic, S. (1995). MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* *41*, 178-228.
- Rayet, B., and Gelinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* *18*, 6938-6947.
- Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Thery, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* *189*, 371-380.
- Reker, S., Meier, A., Holten-Andersen, L., Svane, I. M., Becker, J. C., Thor Straten, P., and Andersen, M. H. (2004). Identification of novel survivin-derived CTL epitopes. *Cancer Biol Ther* *3*, 173-179.
- Ressing, M. E., Sette, A., Brandt, R. M., Ruppert, J., Wentworth, P. A., Hartman, M., Oseroff, C., Grey, H. M., Melief, C. J., and Kast, W. M. (1995). Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J Immunol* *154*, 5934-5943.
- Restifo, N. P. (2001). Countering the 'counterattack' hypothesis. *Nat Med* *7*, 259.
- Ribas, A., Butterfield, L. H., Glaspy, J. A., and Economou, J. S. (2002). Cancer immunotherapy using gene-modified dendritic cells. *Curr Gene Ther* *2*, 57-78.
- Ribas, A., Butterfield, L. H., Glaspy, J. A., and Economou, J. S. (2003). Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *J Clin Oncol* *21*, 2415-2432.
- Robbins, P. F., and Kawakami, Y. (1996). Human tumor antigens recognized by T cells. *Curr Opin Immunol* *8*, 628-636.
- Roberts, J. D., Niedzwiecki, D., Carson, W. E., Chapman, P. B., Gajewski, T. F., Ernstoff, M. S., Hodi, F. S., Shea, C., Leong, S. P., Johnson, J., *et al.* (2006). Phase 2 study of the g209-2M melanoma peptide vaccine and low-dose interleukin-2 in advanced melanoma: Cancer and Leukemia Group B 509901. *J Immunother* *29*, 95-101.
- Rock, K. L. (2003). The ins and outs of cross-presentation. *Nat Immunol* *4*, 941-943.
- Rohayem, J., Diestelkoetter, P., Weigle, B., Oehmichen, A., Schmitz, M., Mehlhorn, J., Conrad, K., and Rieber, E. P. (2000). Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients. *Cancer Res* *60*, 1815-1817.
- Roncarolo, M. G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S., and Levings, M. K. (2001). Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* *182*, 68-79.
- Rosenberg, S. A., Spiess, P., and Lafreniere, R. (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* *233*, 1318-1321.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Dudley, M. E., Schwarz, S. L., Spiess, P. J., *et al.* (1998a). Immunologic

and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4, 321-327.

Rosenberg, S. A., Zhai, Y., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., *et al.* (1998b). Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. *J Natl Cancer Inst* 90, 1894-1900.

Roskrow, M. A., Suzuki, N., Gan, Y., Sixbey, J. W., Ng, C. Y., Kimbrough, S., Hudson, M., Brenner, M. K., Heslop, H. E., and Rooney, C. M. (1998). Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with EBV-positive relapsed Hodgkin's disease. *Blood* 91, 2925-2934.

Rouas, N., Christophe, S., Housseau, F., Bellet, D., Guillet, J. G., and Bidart, J. M. (1993). Influence of protein-quaternary structure on antigen processing. *J Immunol* 150, 782-792.

Roy, C. R. (2003). Immunology: professional secrets. *Nature* 425, 351-352.

Ruan, M., Ji, T., Wu, Z., Zhou, J., and Zhang, C. (2007). Evaluation of expression of midkine in oral squamous cell carcinoma and its correlation with tumour angiogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 36, 159-164.

Rudensky, A., Preston-Hurlburt, P., Hong, S. C., Barlow, A., and Janeway, C. A., Jr. (1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353, 622-627.

Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R. T., Grey, H. M., and Sette, A. (1993). Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell* 74, 929-937.

Saito, H., Dubsky, P., Dantin, C., Finn, O. J., Banchereau, J., and Palucka, A. K. (2006). Cross-priming of cyclin B1, MUC-1 and survivin-specific CD8+ T cells by dendritic cells loaded with killed allogeneic breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 8, R65.

Salama, R. H., Muramatsu, H., Zou, K., Inui, T., Kimura, T., and Muramatsu, T. (2001). Midkine binds to 37-kDa laminin binding protein precursor, leading to nuclear transport of the complex. *Exp Cell Res* 270, 13-20.

Salazar, L. G., Fikes, J., Southwood, S., Ishioka, G., Knutson, K. L., Gooley, T. A., Schiffman, K., and Disis, M. L. (2003). Immunization of cancer patients with HER-2/neu-derived peptides demonstrating high-affinity binding to multiple class II alleles. *Clin Cancer Res* 9, 5559-5565.

Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22, 745-763.

Sancho, D., Mourao-Sa, D., Joffre, O. P., Schulz, O., Rogers, N. C., Pennington, D. J., Carlyle, J. R., and Reis e Sousa, C. (2008). Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest* 118, 2098-2110.

Sanda, M. G., Restifo, N. P., Walsh, J. C., Kawakami, Y., Nelson, W. G., Pardoll, D. M., and Simons, J. W. (1995). Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 87, 280-285.

Sato, W., Kadomatsu, K., Yuzawa, Y., Muramatsu, H., Hotta, N., Matsuo, S., and Muramatsu, T. (2001). Midkine is involved in neutrophil infiltration into the tubulointerstitium in ischemic renal injury. *J Immunol* 167, 3463-3469.

Schaed, S. G., Klimek, V. M., Panageas, K. S., Musselli, C. M., Butterworth, L., Hwu, W. J., Livingston, P. O., Williams, L., Lewis, J. J., Houghton, A. N., and Chapman, P. B. (2002). T-cell responses against tyrosinase 368-376(370D) peptide in HLA*A0201+ melanoma patients: randomized trial comparing incomplete Freund's adjuvant, granulocyte macrophage colony-stimulating factor, and QS-21 as immunological adjuvants. *Clin Cancer Res* 8, 967-972.

Schaeffer, E. B., Sette, A., Johnson, D. L., Bekoff, M. C., Smith, J. A., Grey, H. M., and Buus, S. (1989). Relative contribution of "determinant selection" and "holes in the T-cell repertoire" to T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4649-4653.

Scheibenbogen, C., Schadendorf, D., Bechrakis, N. E., Nagorsen, D., Hofmann, U., Servetopoulou, F., Letsch, A., Philipp, A., Foerster, M. H., Schmittel, A., *et al.* (2003). Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and foreign helper protein as immunologic adjuvants on the T-cell response to vaccination with tyrosinase peptides. *Int J Cancer* 104, 188-194.

Scheibenbogen, C., Schmittel, A., Keilholz, U., Allgauer, T., Hofmann, U., Max, R., Thiel, E., and Schadendorf, D. (2000). Phase 2 trial of vaccination with tyrosinase peptides and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 23, 275-281.

Schirle, M., Weinschenk, T., and Stevanovic, S. (2001). Combining computer algorithms with experimental approaches permits the rapid and accurate identification of T cell epitopes from defined antigens. *J Immunol Methods* 257, 1-16.

Schmitz, M., Diestelkoetter, P., Weigle, B., Schmachtenberg, F., Stevanovic, S., Ockert, D., Rammensee, H. G., and Rieber, E. P. (2000). Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res* 60, 4845-4849.

Schneider, S. C., Ohmen, J., Fosdick, L., Gladstone, B., Guo, J., Ametani, A., Sercarz, E. E., and Deng, H. (2000). Cutting edge: introduction of an endopeptidase cleavage motif into a determinant flanking region of hen egg lysozyme results in enhanced T cell determinant display. *J Immunol* 165, 20-23.

Schnorrer, P., Behrens, G. M., Wilson, N. S., Pooley, J. L., Smith, C. M., El-Sukkari, D., Davey, G., Kupresanin, F., Li, M., Maraskovsky, E., *et al.* (2006). The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10729-10734.

Schroers, R., Shen, L., Rollins, L., Rooney, C. M., Slawin, K., Sonderstrup, G., Huang, X. F., and Chen, S. Y. (2003a). Human telomerase reverse transcriptase-specific T-helper responses induced by promiscuous major histocompatibility complex class II-restricted epitopes. *Clin Cancer Res* 9, 4743-4755.

Schroers, R., Shen, L., Rollins, L., Xiao, Z., Sonderstrup, G., Slawin, K., Huang, X. F., and Chen, S. Y. (2003b). Identification of MHC class II-restricted T-cell epitopes in prostate-specific membrane antigen. *Clin Cancer Res* 9, 3260-3271.

Schwartz, R. H. (1992). Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71, 1065-1068.

Schwartzentruber, D. J., Hom, S. S., Dadmarz, R., White, D. E., Yannelli, J. R., Steinberg, S. M., Rosenberg, S. A., and Topalian, S. L. (1994). In vitro predictors of therapeutic response in melanoma patients receiving tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2. *J Clin Oncol* 12, 1475-1483.

- Seliger, B., Hohne, A., Jung, D., Kallfelz, M., Knuth, A., Jaeger, E., Bernhard, H., Momburg, F., Tampe, R., and Huber, C. (1997). Expression and function of the peptide transporters in escape variants of human renal cell carcinomas. *Exp Hematol* 25, 608-614.
- Sercarz, E. E., Lehmann, P. V., Ametani, A., Benichou, G., Miller, A., and Moudgil, K. (1993). Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu Rev Immunol* 11, 729-766.
- Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., and Shastri, N. (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419, 480-483.
- Shaffer, K. L., Sharma, A., Snapp, E. L., and Hegde, R. S. (2005). Regulation of protein compartmentalization expands the diversity of protein function. *Dev Cell* 9, 545-554.
- Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K. P., Kundig, T. M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P. S., Thompson, C. B., and Mak, T. W. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261, 609-612.
- Sharma, S., Stolina, M., Lin, Y., Gardner, B., Miller, P. W., Kronenberg, M., and Dubinett, S. M. (1999). T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J Immunol* 163, 5020-5028.
- Shay, J. W., and Wright, W. E. (2002). Telomerase: a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2, 257-265.
- Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W. L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G. B., and Gray, J. W. (1999). PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* 21, 99-102.
- Shebzukhov, Y. V., Lavrik, I. N., Karbach, J., Khlgatian, S. V., Koroleva, E. P., Belousov, P. V., Kashkin, K. N., Knuth, A., Jager, E., Chi, N. W., *et al.* (2008). Human tankyrases are aberrantly expressed in colon tumors and contain multiple epitopes that induce humoral and cellular immune responses in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 57, 871-881.
- Shevach, E. M. (2002). CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2, 389-400.
- Shibata, Y., Muramatsu, T., Hirai, M., Inui, T., Kimura, T., Saito, H., McCormick, L. M., Bu, G., and Kadomatsu, K. (2002). Nuclear targeting by the growth factor midkine. *Mol Cell Biol* 22, 6788-6796.
- Shirai, M., Pendleton, C. D., Ahlers, J., Takeshita, T., Newman, M., and Berzofsky, J. A. (1994). Helper-cytotoxic T lymphocyte (CTL) determinant linkage required for priming of anti-HIV CD8⁺ CTL in vivo with peptide vaccine constructs. *J Immunol* 152, 549-556.
- Siegel, S., Steinmann, J., Schmitz, N., Stuhlmann, R., Dreger, P., and Zeis, M. (2004). Identification of a survivin-derived peptide that induces HLA-A*0201-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes. *Leukemia* 18, 2046-2047.
- Sidney, J., Oseroff, C., del Guercio, M. F., Southwood, S., Krieger, J. I., Ishioka, G. Y., Sakaguchi, K., Appella, E., Sette, A. (1994). Definition of a DQ3.1-specific binding motif. *J Immunol* 152, 4516-25
- Sijts, A. J., Ruppert, T., Rehermann, B., Schmidt, M., Koszinowski, U., and Kloetzel, P. M. (2000). Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J Exp Med* 191, 503-514.

Skipper, J. C., Hendrickson, R. C., Gulden, P. H., Brichard, V., Van Pel, A., Chen, Y., Shabanowitz, J., Wolfel, T., Slingluff, C. L., Jr., Boon, T., *et al.* (1996). An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med* 183, 527-534.

Sliz, P., Michielin, O., Cerottini, J. C., Luescher, I., Romero, P., Karplus, M., and Wiley, D. C. (2001). Crystal structures of two closely related but antigenically distinct HLA-A2/melanocyte-melanoma tumor-antigen peptide complexes. *J Immunol* 167, 3276-3284.

Song, Z., Yao, X., and Wu, M. (2003). Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem* 278, 23130-23140.

Soong, T. W., and Hui, K. M. (1992). Locus-specific transcriptional control of HLA genes. *J Immunol* 149, 2008-2020.

Soria, J. C., Jang, S. J., Khuri, F. R., Hassan, K., Liu, D., Hong, W. K., and Mao, L. (2000). Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Cancer Res* 60, 4000-4004.

Spiess, P. J., Yang, J. C., and Rosenberg, S. A. (1987). In vivo antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes expanded in recombinant interleukin-2. *J Natl Cancer Inst* 79, 1067-1075.

Srivastava, P. K., Udono, H., Blachere, N. E., and Li, Z. (1994). Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics* 39, 93-98.

Stassar, M. J., Radrizzani, L., Hammer, J., and Zoller, M. (2001). T-helper cell-response to MHC class II-binding peptides of the renal cell carcinoma-associated antigen RAGE-1. *Immunobiology* 203, 743-755.

Steinbrink, K., Jonuleit, H., Muller, G., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A. H. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 93, 1634-1642.

Steinman, R. M., and Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-1162.

Stern, L. J., Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Urban, R. G., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. (1994). Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368, 215-221.

Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2007). Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 19, 281-286.

Storkus, W. J., Zeh, H. J., 3rd, Salter, R. D., and Lotze, M. T. (1993). Identification of T-cell epitopes: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 14, 94-103.

Sturniolo, T., Bono, E., Ding, J., Radrizzani, L., Tuereci, O., Sahin, U., Braxenthaler, M., Gallazzi, F., Protti, M. P., Sinigaglia, F., and Hammer, J. (1999). Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol* 17, 555-561.

Su, Z., Dannull, J., Yang, B. K., Dahm, P., Coleman, D., Yancey, D., Sichi, S., Niedzwiecki, D., Boczkowski, D., Gilboa, E., and Vieweg, J. (2005). Telomerase mRNA-transfected

- dendritic cells stimulate antigen-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J Immunol* *174*, 3798-3807.
- Suekane, S., Nishitani, M., Noguchi, M., Komohara, Y., Kokubu, T., Naitoh, M., Honma, S., Yamada, A., Itoh, K., Matsuoka, K., and Kanayama, H. (2007). Phase I trial of personalized peptide vaccination for cytokine-refractory metastatic renal cell carcinoma patients. *Cancer Sci* *98*, 1965-1968.
- Sun, Y., Sijts, A. J., Song, M., Janek, K., Nussbaum, A. K., Kral, S., Schirle, M., Stevanovic, S., Paschen, A., Schild, H., *et al.* (2002). Expression of the proteasome activator PA28 rescues the presentation of a cytotoxic T lymphocyte epitope on melanoma cells. *Cancer Res* *62*, 2875-2882.
- Suri, A., Lovitch, S. B., and Unanue, E. R. (2006). The wide diversity and complexity of peptides bound to class II MHC molecules. *Curr Opin Immunol* *18*, 70-77.
- Suzuki, H., Graziano, D. F., McKolanis, J., and Finn, O. J. (2005). T cell-dependent antibody responses against aberrantly expressed cyclin B1 protein in patients with cancer and premalignant disease. *Clin Cancer Res* *11*, 1521-1526.
- Suzuki, N., Shibata, Y., Urano, T., Murohara, T., Muramatsu, T., and Kadomatsu, K. (2004). Proteasomal degradation of the nuclear targeting growth factor midkine. *J Biol Chem* *279*, 17785-17791.
- Tacken, P. J., de Vries, I. J., Gijzen, K., Joosten, B., Wu, D., Rother, R. P., Faas, S. J., Punt, C. J., Torensma, R., Adema, G. J., and Figdor, C. G. (2005). Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood* *106*, 1278-1285.
- Takada, T., Toriyama, K., Muramatsu, H., Song, X. J., Torii, S., and Muramatsu, T. (1997). Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neutrophils and association with inflammatory synovitis. *J Biochem* *122*, 453-458.
- Takei, Y., Kadomatsu, K., Goto, T., and Muramatsu, T. (2006). Combinational antitumor effect of siRNA against midkine and paclitaxel on growth of human prostate cancer xenografts. *Cancer* *107*, 864-873.
- Takei, Y., Kadomatsu, K., Yuasa, K., Sato, W., and Muramatsu, T. (2005). Morpholino antisense oligomer targeting human midkine: its application for cancer therapy. *Int J Cancer* *114*, 490-497.
- Tao, P., Xu, D., Lin, S., Ouyang, G. L., Chang, Y., Chen, Q., Yuan, Y., Zhuo, X., Luo, Q., Li, J., *et al.* (2007). Abnormal expression, highly efficient detection and novel truncations of midkine in human tumors, cancers and cell lines. *Cancer Lett* *253*, 60-67.
- Tartaglia, L. A., and Goeddel, D. V. (1992). Two TNF receptors. *Immunol Today* *13*, 151-153.
- Theobald, M., Biggs, J., Dittmer, D., Levine, A. J., and Sherman, L. A. (1995). Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 11993-11997.
- Thomas, W. D., and Hersey, P. (1998). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *J Immunol* *161*, 2195-2200.

- Tindle, R. W. (1996). Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Curr Opin Immunol* 8, 643-650.
- Toes, R. E., Ossendorp, F., Offringa, R., and Melief, C. J. (1999). CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J Exp Med* 189, 753-756.
- Tomkinson, B., Wernstedt, C., Hellman, U., and Zetterqvist, O. (1987). Active site of tripeptidyl peptidase II from human erythrocytes is of the subtilisin type. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7508-7512.
- Topalian, S. L., Solomon, D., and Rosenberg, S. A. (1989). Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J Immunol* 142, 3714-3725.
- Tourneur, L., Mistou, S., Michiels, F. M., Devauchelle, V., Renia, L., Feunteun, J., and Chiocchia, G. (2003). Loss of FADD protein expression results in a biased Fas-signaling pathway and correlates with the development of tumoral status in thyroid follicular cells. *Oncogene* 22, 2795-2804.
- Trapani, J. A., Jans, D. A., Jans, P. J., Smyth, M. J., Browne, K. A., and Sutton, V. R. (1998). Efficient nuclear targeting of granzyme B and the nuclear consequences of apoptosis induced by granzyme B and perforin are caspase-dependent, but cell death is caspase-independent. *J Biol Chem* 273, 27934-27938.
- Trojan, L., Schaaf, A., Steidler, A., Haak, M., Thalmann, G., Knoll, T., Gretz, N., Alken, P., and Michel, M. S. (2005). Identification of metastasis-associated genes in prostate cancer by genetic profiling of human prostate cancer cell lines. *Anticancer Res* 25, 183-191.
- Trowsdale, J., Ragoussis, J., and Campbell, R. D. (1991). Map of the human MHC. *Immunol Today* 12, 443-446.
- Tsang, K. Y., Zaremba, S., Nieroda, C. A., Zhu, M. Z., Hamilton, J. M., and Schlom, J. (1995). Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J Natl Cancer Inst* 87, 982-990.
- Tschopp, J., Irmeler, M., and Thome, M. (1998). Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 10, 552-558.
- Tsuruma, T., Hata, F., Torigoe, T., Furuhashi, T., Idenoue, S., Kurotaki, T., Yamamoto, M., Yagihashi, A., Ohmura, T., Yamaguchi, K., *et al.* (2004). Phase I clinical study of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent colorectal cancer. *J Transl Med* 2, 19.
- Tsutsui, J., Kadomatsu, K., Matsubara, S., Nakagawara, A., Hamanoue, M., Takao, S., Shimazu, H., Ohi, Y., and Muramatsu, T. (1993). A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilms' tumor and other human carcinomas. *Cancer Res* 53, 1281-1285.
- Uebel, S., and Tampe, R. (1999). Specificity of the proteasome and the TAP transporter. *Curr Opin Immunol* 11, 203-208.
- Uger, R. A., and Barber, B. H. (1997). Presentation of an influenza nucleoprotein epitope incorporated into the H-2Db signal sequence requires the transporter-associated with antigen presentation. *J Immunol* 158, 685-692.

- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B. J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9, 1269-1274.
- Valmori, D., Fonteneau, J. F., Lizana, C. M., Gervois, N., Lienard, D., Rimoldi, D., Jongeneel, V., Jotereau, F., Cerottini, J. C., and Romero, P. (1998). Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol* 160, 1750-1758.
- Valmori, D., Gileadi, U., Servis, C., Dunbar, P. R., Cerottini, J. C., Romero, P., Cerundolo, V., and Levy, F. (1999). Modulation of proteasomal activity required for the generation of a cytotoxic T lymphocyte-defined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3. *J Exp Med* 189, 895-906.
- Valmori, D., Levy, F., Miconnet, I., Zajac, P., Spagnoli, G. C., Rimoldi, D., Lienard, D., Cerundolo, V., Cerottini, J. C., and Romero, P. (2000). Induction of potent antitumor CTL responses by recombinant vaccinia encoding a melan-A peptide analogue. *J Immunol* 164, 1125-1131.
- Van den Eynde, B. J., and Morel, S. (2001). Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr Opin Immunol* 13, 147-153.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.
- van Elsas, A., van der Burg, S. H., van der Minne, C. E., Borghi, M., Mourer, J. S., Melief, C. J., and Schrier, P. I. (1996). Peptide-pulsed dendritic cells induce tumoricidal cytotoxic T lymphocytes from healthy donors against stably HLA-A*0201-binding peptides from the Melan-A/MART-1 self antigen. *Eur J Immunol* 26, 1683-1689.
- van Endert, P. M., Riganelli, D., Greco, G., Fleischhauer, K., Sidney, J., Sette, A., and Bach, J. F. (1995). The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J Exp Med* 182, 1883-1895.
- van Hall, T., Sijts, A., Camps, M., Offringa, R., Melief, C., Kloetzel, P. M., and Ossendorp, F. (2000). Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J Exp Med* 192, 483-494.
- Van Noort, J. M., Boon, J., Van der Drift, A. C., Wagenaar, J. P., Boots, A. M., and Boog, C. J. (1991). Antigen processing by endosomal proteases determines which sites of sperm-whale myoglobin are eventually recognized by T cells. *Eur J Immunol* 21, 1989-1996.
- Velculescu, V. E., Madden, S. L., Zhang, L., Lash, A. E., Yu, J., Rago, C., Lal, A., Wang, C. J., Beaudry, G. A., Ciriello, K. M., *et al.* (1999). Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* 23, 387-388.
- Versteeg, R., Kruse-Wolters, K. M., Plomp, A. C., van Leeuwen, A., Stam, N. J., Ploegh, H. L., Ruiter, D. J., and Schrier, P. I. (1989). Suppression of class I human histocompatibility leukocyte antigen by c-myc is locus specific. *J Exp Med* 170, 621-635.
- Vidard, L., Rock, K. L., and Benacerraf, B. (1992). Heterogeneity in antigen processing by different types of antigen-presenting cells. Effect of cell culture on antigen processing ability. *J Immunol* 149, 1905-1911.

- Vilar, J., Lalou, C., Duong, V. H., Charrin, S., Hardouin, S., Raulais, D., Merlet-Benichou, C., and Lelievre-Pegorier, M. (2002). Midkine is involved in kidney development and in its regulation by retinoids. *J Am Soc Nephrol* *13*, 668-676.
- Viner, N. J., Nelson, C. A., Deck, B., and Unanue, E. R. (1996). Complexes generated by the binding of free peptides to class II MHC molecules are antigenically diverse compared with those generated by intracellular processing. *J Immunol* *156*, 2365-2368.
- Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y., and Lanzavecchia, A. (1999). T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* *283*, 680-682.
- Visus, C., Ito, D., Amoscato, A., Maciejewska-Franczak, M., Abdelsalem, A., Dhir, R., Shin, D. M., Donnenberg, V. S., Whiteside, T. L., and DeLeo, A. B. (2007). Identification of human aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 as a novel CD8+ T-cell-defined tumor antigen in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* *67*, 10538-10545.
- von Boehmer, H., and Kisielow, P. (1993). Lymphocyte lineage commitment: instruction versus selection. *Cell* *73*, 207-208.
- von Heijne, G. (1984). How signal sequences maintain cleavage specificity. *J Mol Biol* *173*, 243-251.
- von Heijne, G. (1986). Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. *J Mol Biol* *189*, 239-242.
- Vonderheide, R. H. (2008). Prospects and challenges of building a cancer vaccine targeting telomerase. *Biochimie* *90*, 173-180.
- Vonderheide, R. H., Hahn, W. C., Schultze, J. L., and Nadler, L. M. (1999). The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* *10*, 673-679.
- Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., *et al.* (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* *5*, 157-163.
- Wang, F., Bade, E., Kuniyoshi, C., Spears, L., Jeffery, G., Marty, V., Groshen, S., and Weber, J. (1999a). Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin Cancer Res* *5*, 2756-2765.
- Wang, J., Takeuchi, H., Sonobe, Y., Jin, S., Mizuno, T., Miyakawa, S., Fujiwara, M., Nakamura, Y., Kato, T., Muramatsu, H., *et al.* (2008). Inhibition of midkine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through the expansion of regulatory T cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 3915-3920.
- Wang, Q., Huang, Y., Ni, Y., Wang, H., and Hou, Y. (2007a). siRNA targeting midkine inhibits gastric cancer cells growth and induces apoptosis involved caspase-3,8,9 activation and mitochondrial depolarization. *J Biomed Sci* *14*, 783-795.
- Wang, R. F., Peng, G., and Wang, H. Y. (2006). Regulatory T cells and Toll-like receptors in tumor immunity. *Semin Immunol* *18*, 136-142.
- Wang, R. F., Wang, X., and Rosenberg, S. A. (1999b). Identification of a novel major histocompatibility complex class II-restricted tumor antigen resulting from a chromosomal rearrangement recognized by CD4(+) T cells. *J Exp Med* *189*, 1659-1668.

- Wang, S., Boonman, Z. F., Li, H. C., He, Y., Jager, M. J., Toes, R. E., and Niederkorn, J. Y. (2003). Role of TRAIL and IFN-gamma in CD4+ T cell-dependent tumor rejection in the anterior chamber of the eye. *J Immunol* *171*, 2789-2796.
- Wang, X. F., Cohen, W. M., Castelli, F. A., Almunia, C., Lethe, B., Pouvelle-Moratille, S., Munier, G., Charron, D., Menez, A., Zarour, H. M., *et al.* (2007b). Selective identification of HLA-DP4 binding T cell epitopes encoded by the MAGE-A gene family. *Cancer Immunol Immunother* *56*, 807-818.
- Wang, Z., Choice, E., Kaspar, A., Hanson, D., Okada, S., Lyu, S. C., Krensky, A. M., and Clayberger, C. (2000). Bactericidal and tumoricidal activities of synthetic peptides derived from granulysin. *J Immunol* *165*, 1486-1490.
- Wang, Z., Farris, G. M., Newman, L. S., Shou, Y., Maier, L. A., Smith, H. N., and Marrone, B. L. (2001). Beryllium sensitivity is linked to HLA-DP genotype. *Toxicology* *165*, 27-38.
- Waterhouse, P., Marengere, L. E., Mittrucker, H. W., and Mak, T. W. (1996). CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation. *Immunol Rev* *153*, 183-207.
- Weihofen, A., and Martoglio, B. (2003). Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends Cell Biol* *13*, 71-78.
- Wells, A. D., Gudmundsdottir, H., and Turka, L. A. (1997). Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J Clin Invest* *100*, 3173-3183.
- Wenandy, L., Sorensen, R. B., Svane, I. M., Thor Straten, P., and Andersen, M. H. (2008). RhoC a new target for therapeutic vaccination against metastatic cancer. *Cancer Immunol Immunother* *57*, 1871-1878.
- Whitmire, J. K., and Ahmed, R. (2000). Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. *Curr Opin Immunol* *12*, 448-455.
- Wolfel, C., Drexler, I., Van Pel, A., Thres, T., Leister, N., Herr, W., Sutter, G., Huber, C., and Wolfel, T. (2000). Transporter (TAP)- and proteasome-independent presentation of a melanoma-associated tyrosinase epitope. *Int J Cancer* *88*, 432-438.
- Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* *269*, 1281-1284.
- Yan, M., Himoudi, N., Pule, M., Sebire, N., Poon, E., Blair, A., Williams, O., and Anderson, J. (2008). Development of cellular immune responses against PAX5, a novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Res* *68*, 8058-8065.
- Yang, J. C., Haworth, L., Sherry, R. M., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Steinberg, S. M., Chen, H. X., and Rosenberg, S. A. (2003). A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* *349*, 427-434.
- Ye, C., Qi, M., Fan, Q. W., Ito, K., Akiyama, S., Kasai, Y., Matsuyama, M., Muramatsu, T., and Kadomatsu, K. (1999). Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer. *Br J Cancer* *79*, 179-184.

- Yokoyama, Y., Grunebach, F., Schmidt, S. M., Heine, A., Hantschel, M., Stevanovic, S., Rammensee, H. G., and Brossart, P. (2008). Matrilysin (MMP-7) is a novel broadly expressed tumor antigen recognized by antigen-specific T cells. *Clin Cancer Res* 14, 5503-5511.
- York, I. A., Mo, A. X., Lemerise, K., Zeng, W., Shen, Y., Abraham, C. R., Saric, T., Goldberg, A. L., and Rock, K. L. (2003). The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity* 18, 429-440.
- York, I. A., and Rock, K. L. (1996). Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 14, 369-396.
- You, Z., Dong, Y., Kong, X., Beckett, L. A., Gandour-Edwards, R., and Melamed, J. (2008). Midkine is a NF-kappaB-inducible gene that supports prostate cancer cell survival. *BMC Med Genomics* 1, 6.
- Yu, G. S., Hu, J., and Nakagawa, H. (1998). Inhibition of beta-amyloid cytotoxicity by midkine. *Neurosci Lett* 254, 125-128.
- Yu, M., Zhan, Q., and Finn, O. J. (2002). Immune recognition of cyclin B1 as a tumor antigen is a result of its overexpression in human tumors that is caused by non-functional p53. *Mol Immunol* 38, 981-987.
- Yu, P., and Fu, Y. X. (2006). Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest* 86, 231-245.
- Yue, F. Y., Dummer, R., Geertsens, R., Hofbauer, G., Laine, E., Manolio, S., and Burg, G. (1997). Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer* 71, 630-637.
- Zaks, T. Z., Chappell, D. B., Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P. (1999). Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *J Immunol* 162, 3273-3279.
- Zaks, T. Z., and Rosenberg, S. A. (1998). Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu+ tumors. *Cancer Res* 58, 4902-4908.
- Zarour, H. M., Maillere, B., Brusica, V., Coval, K., Williams, E., Pouvelle-Moratille, S., Castelli, F., Land, S., Bennouna, J., Logan, T., and Kirkwood, J. M. (2002). NY-ESO-1 119-143 is a promiscuous major histocompatibility complex class II T-helper epitope recognized by Th1- and Th2-type tumor-reactive CD4+ T cells. *Cancer Res* 62, 213-218.
- Zeng, G., Li, Y., El-Gamil, M., Sidney, J., Sette, A., Wang, R. F., Rosenberg, S. A., and Robbins, P. F. (2002). Generation of NY-ESO-1-specific CD4+ and CD8+ T cells by a single peptide with dual MHC class I and class II specificities: a new strategy for vaccine design. *Cancer Res* 62, 3630-3635.
- Zhai, Y., Yang, J. C., Kawakami, Y., Spiess, P., Wadsworth, S. C., Cardoza, L. M., Couture, L. A., Smith, A. E., and Rosenberg, S. A. (1996). Antigen-specific tumor vaccines. Development and characterization of recombinant adenoviruses encoding MART1 or gp100 for cancer therapy. *J Immunol* 156, 700-710.
- Zhang, W. G., Liu, S. H., Cao, X. M., Cheng, Y. X., Ma, X. R., Yang, Y., and Wang, Y. L. (2005). A phase-I clinical trial of active immunotherapy for acute leukemia using inactivated autologous leukemia cells mixed with IL-2, GM-CSF, and IL-6. *Leuk Res* 29, 3-9.

Zheng, N., and Gierasch, L. M. (1996). Signal sequences: the same yet different. *Cell* 86, 849-852.

Zhou, D., Li, P., Lin, Y., Lott, J. M., Hislop, A. D., Canaday, D. H., Brutkiewicz, R. R., and Blum, J. S. (2005). Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* 22, 571-581.

Zhou, H., Muramatsu, T., Halfter, W., Tsim, K. W., and Peng, H. B. (1997). A role of midkine in the development of the neuromuscular junction. *Mol Cell Neurosci* 10, 56-70.

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 4, 594-600.

Résumé

Peu d'antigènes tumoraux présentent à la fois une expression dans un grand nombre de cellules tumorales et exercent un rôle vital pour leur développement. Mon travail de thèse a consisté à étudier les réponses en lymphocytes T dirigées contre deux de ces protéines : la Survivine et la Midkine. Nous avons démontré que ces deux protéines induisent spécifiquement des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ capables de reconnaître des cellules tumorales. Nous avons également identifié les séquences immunogéniques (épitopes T) dans ces antigènes. Deux épitopes CD4 et CD8 de la Midkine sont localisés dans le peptide signal. Notre étude montre que la Midkine constitue une nouvelle cible pour la vaccination contre de nombreux cancers et propose des séquences peptidiques originales comme candidats vaccins.

Mots clés : Epitopes T CD4⁺ et CD8⁺, Midkine, Survivine, vaccination anti-tumorale, peptide signal, HLA

Summary

Title : Study of the overexpressed proteins Midkine and Survivin as target of the anti-tumoral cellular immunity

Few tumour antigens are both expressed in various human cancers and are indispensable for their development. My PhD work was to investigate the T cell responses against two of these proteins: Survivin and Midkine. We have demonstrated that both proteins elicit specifically CD8 and CD4 T lymphocytes, which are able to recognize tumour cells. We also identified the immunogenic sequences (T cell epitopes) in these antigens. Two CD4 and CD8 T cell epitopes of Midkine are localized in the signal peptides. Altogether, our study demonstrate that Midkine constitutes a new target for vaccination against multiple cancers and propose original peptide sequences as vaccine candidates.

Keywords : CD8 and CD4 T epitopes, Midkine, Survivin, anti-tumoral vaccine, signal peptide, HLA