

Université de Montréal

**Caractérisation de stratégies stimulant l'immunité cellulaire par  
l'étude de la présentation antigénique d'une nanoparticule vaccinale et  
du blocage d'un mécanisme d'immunosuppression**

par

Laïla-Aïcha Hanafi

Département Sciences Biomédicales  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
en sciences biomédicales  
option générale

octobre 2014

© Laïla-Aïcha Hanafi, MMXIV

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Caractérisation de stratégies stimulant l'immunité cellulaire par l'étude de la présentation antigénique d'une nanoparticule vaccinale et du blocage d'un mécanisme d'immunosuppression

Présentée par :  
Laïla-Aïcha Hanafi

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Sylvie Lesage, président-rapporteur  
Dr Réjean Lapointe, directeur de recherche  
Dr John Stagg, membre du jury  
Dr Caroline Gilbert, examinateur externe  
Dr Andrès Finzi, représentant de la doyenne

## Résumé

Il existe plusieurs défis au développement d'une thérapie visant à stimuler l'immunité cellulaire. Dans la prévention contre certains virus et en immunothérapie du cancer, l'induction de lymphocytes T spécifiques est cependant primordiale. Dans la première partie de l'étude, nous avons porté notre attention sur la compréhension de la présentation croisée par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) médiée par des particules pseudo-virales (VLP) composées de la protéine de surface de potexvirus à laquelle nous avons ajouté un épitope de la protéine M1 du virus de l'influenza ou un épitope de la protéine gp100 du mélanome. Cette VLP se caractérise par sa capacité à stimuler, sans l'aide d'adjuvant, le système immunitaire et de présenter de façon croisée l'épitope inséré dans sa protéine de surface et ce, indépendamment de l'activité du protéasome.

Nous avons, tout d'abord, comparé les propriétés de présentation antigénique croisée des VLP formées du virus de la mosaïque de la malva (MaMV) à celles des VLP du virus de la mosaïque de la papaye (PapMV). Les résultats confirment que ces propriétés sont partagées par plusieurs membres de la famille des potexvirus malgré des divergences de séquences (Hanafi *et al.* Vaccine 2010). De plus, nous avons procédé à des expériences pour préciser le mécanisme menant à la présentation de l'épitope inséré dans les VLP de PapMV. Les résultats nous confirment une voie vacuolaire dépendante de l'activité de la cathepsine S et de l'acidification des lysosomes pour l'apprêtement antigénique. L'induction de l'autophagie par les VLP semble également nécessaire à la présentation croisée par les VLP de PapMV. Nous avons donc établi un nouveau mécanisme de présentation croisée vacuolaire dépendant de l'autophagie (Hanafi *et al.* soumis *Autophagy*).

En second lieu, en immunothérapie du cancer, il est aussi important de contrôler les mécanismes d'évasion immunitaire mis en branle par la tumeur. Nous avons spécifiquement étudié l'enzyme immunosuppressive indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (revue de la littérature dans les tumeurs humaines; Hanafi *et al.* Clin. Can. Res 2011) et son inhibition dans les cellules tumorales. Pour ce faire, nous avons tenté d'inhiber son expression par la fludarabine, agent chimiothérapeutique précédemment étudié pour son activité inhibitrice de l'activation de STAT1 (*signal transducers and activators of transcription 1*). Étonnamment,

nos résultats ont montré l'inhibition d'IDO dans les cellules tumorales par la fludarabine, indépendamment de l'inhibition de la phosphorylation de STAT1. Nous avons démontré que le mécanisme d'action dépendait plutôt de l'induction de la dégradation d'IDO par le protéasome (Hanafi *et al.* PlosOne 2014).

Les travaux présentés dans cette thèse ont donc porté autant sur la compréhension d'une nouvelle plateforme de vaccination pouvant médier l'activation de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et sur le contrôle d'une immunosuppression établie par les cellules tumorales pour évader au système immunitaire. Ces deux grandes stratégies sont à considérer en immunothérapie du cancer et la combinaison avec d'autres thérapies déjà existantes pourra permettre une meilleure réponse clinique.

**Mots-clés** : Immunité cellulaire, présentation croisée par CMH I, nanoparticules vaccinales, indoleamine 2,3-dioxygénase, fludarabine

## Abstract

There are several challenges to the development of therapies aimed at stimulating cellular immunity. In viral infection prevention and in cancer immunotherapy, the induction of specific T lymphocytes is, however, of paramount importance. In the first part of this study, we focused our attention on understanding the major histocompatibility complex class I (MHC I) cross-presentation mediated by virus-like particles (VLP) composed of potexvirus coat protein, in which we had inserted an epitope from the M1 protein of the Influenza virus or an epitope from gp100, a tumour antigen of melanoma. This particular VLP is characterized by its ability to stimulate the immune system with no adjuvant and its cross-presentation of the inserted epitope independently of proteasome activity.

First, we compared the antigenic cross-presentation properties of Malva mosaic virus (MaMV) VLPs to that of Papaya mosaic virus (PapMV) VLPs. The results confirm that cross-presentation mechanisms are shared among different members of the potexvirus family despite marked differences in their sequences (Hanafi *et al.* Vaccine 2010). Furthermore, we have conducted experiments to clarify the mechanism leading to the cross-presentation of the inserted epitope in PapMV VLPs. The results confirm a vacuolar pathway dependent on cathepsin S activity and on lysosomal acidification for antigen presentation. Autophagy induction by VLPs is also important to PapMV VLP antigen cross-presentation. We have herein described a new vacuolar MHC I cross-presentation pathway dependent on autophagy (Hanafi *et al.* in preparation).

Secondly, in cancer immunotherapy, it is crucial to control immune evasion mechanisms that are initiated by the tumour. We have specifically studied the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) (human cancer literature review in Hanafi *et al.* Clin. Can. Res. 2011), and its inhibition in tumour cells. To this end, we inhibited its expression using fludarabine, a chemotherapeutic agent previously studied for its inhibitory effect on STAT1 (signal transducers and activators of transcription 1) phosphorylation. Surprisingly, our results demonstrate that IDO inhibition in cancer cells by fludarabine was independent of STAT1 phosphorylation. We showed that the mechanism of

action was rather dependent on the induction of IDO degradation by the proteasome (Hanafi *et al.* PlosOne 2014).

The work presented in this thesis provides a better understanding of how a new vaccine platform can mediate cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes activation and the control of the problem of immunosuppression by tumour cells for the evading of the immune system. These two main strategies are to key for the consideration of cancer immunotherapy in combination with other existing therapies, as these should allow a better clinical response to cancer treatment.

**Keywords** : Cellular immunity, MHC I cross-presentation, vaccine nanoparticles, indoleamine 2,3-dioxygenase, fludarabine

# Table des matières

|  |              |
|--|--------------|
| <b>RÉSUMÉ</b> .....  | <b>II</b>    |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>IV</b>    |
| <b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....                                  | <b>VI</b>    |
| <b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....                              | <b>X</b>     |
| <b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....                                  | <b>XIV</b>   |
| <b>LISTE DES FIGURES</b> .....                                   | <b>XV</b>    |
| <b>REMERCIEMENTS</b> .....                                       | <b>XVIII</b> |
| <b>INTRODUCTION</b> .....  | <b>1</b>     |
| <i>Objectif général et structure de la thèse</i> .....           | 1            |
| <b>IMMUNITÉ CELLULAIRE</b> .....                                 | 1            |
| <i>Induction de la réponse cellulaire</i> .....                  | 2            |
| Trois signaux d'activation.....                                  | 2            |
| Cellules présentatrices d'antigènes (APC) professionnelles ..... | 5            |
| <i>Autorégulation de l'immunité cellulaire</i> .....             | 6            |
| Cellules immunorégulatrices.....                                 | 7            |
| Molécules d'inhibition .....                                     | 8            |
| Enzymes immunosuppressives.....                                  | 10           |
| <i>Historique du contrôle de l'immunomodulation</i> .....        | 13           |
| <b>VACCINATION</b> .....   | 14           |
| <i>Stratégies de vaccination à médiation cellulaire</i> .....    | 15           |
| <i>Particules pseudo-virales (VLP)</i> .....                     | 16           |
| VLP et immunité cellulaire.....                                  | 17           |
| Modèle d'étude : <i>Papaya Mosaic Virus</i> (PapMV) .....        | 19           |
| <b>PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE CROISÉE PAR CMH I</b> .....          | 21           |
| <i>Description des voies de présentation</i> .....               | 21           |
| Voie cytosolique.....  | 21           |
| Voie vacuolaire .....  | 23           |
| <i>Implication de l'autophagie</i> .....                         | 24           |
| Présentation par le CMH II .....                                 | 27           |
| Présentation par le CMH I.....                                   | 27           |
| <b>INDOLEAMINE 2,3-DIOXYGÉNASE</b> .....                         | 28           |

|   |           |
|---|-----------|
| <i>Stratégies d'inhibition d'IDO</i> .....  | 28        |
| MISE EN SITUATION ET HYPOTHÈSES DE LA RECHERCHE .....                               | 31        |
| <i>Mise en contexte de la thèse</i> .....   | 31        |
| <i>Hypothèses de recherche</i> .....  | 33        |
| OBJECTIFS SPÉCIFIQUES DE LA RECHERCHE .....   | 33        |
| <b>CHAPITRE 1 : COMPARAISON DE DEUX POTEXVIRUS</b> .....                            | <b>35</b> |
| ABSTRACT .....  | 37        |
| INTRODUCTION .....  | 38        |
| MATERIALS AND METHODS .....   | 41        |
| RESULTS .....   | 47        |
| DISCUSSION .....  | 51        |
| TABLES AND FIGURES .....  | 54        |
| ACKNOWLEDGEMENTS .....  | 62        |
| REFERENCES .....  | 63        |
| <b>CHAPITRE 2 : PRÉSENTATION CROISÉE PAR CMH I DÉPENDANTE DE L'AUTOPHAGIE</b> ..... | <b>66</b> |
| ABSTRACT .....  | 69        |
| INTRODUCTION .....  | 70        |
| RESULTS .....   | 72        |
| DISCUSSION .....  | 76        |
| METHODS .....   | 78        |
| FIGURES .....   | 81        |
| SUPPLEMENTARY FIGURE .....  | 86        |
| ACKNOWLEDGEMENTS .....  | 87        |
| REFERENCES .....  | 88        |
| <b>CHAPITRE 3 : INHIBITION DE L'IDO PAR LA FLUDARABINE</b> .....                    | <b>91</b> |
| ABSTRACT .....  | 93        |
| INTRODUCTION .....  | 94        |
| MATERIAL AND METHODS .....  | 96        |
| RESULTS .....   | 100       |
| DISCUSSION .....  | 103       |
| FIGURES .....   | 106       |
| SUPPLEMENTARY FIGURES .....   | 112       |



|   |            |
|---|------------|
| ACKNOWLEDGMENTS.....  | 115        |
| REFERENCES.....   | 116        |
| <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>  | <b>120</b> |
| PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE PAR LES VLP DE POTEXVIRUS.....                           | 121        |
| <i>PapMV et MaMV, similarités et différences.....</i>                             | <i>121</i> |
| Retour sur les résultats.....   | 121        |
| Perspectives.....   | 122        |
| <i>Voies de présentation croisée vacuolaire.....</i>                              | <i>125</i> |
| Retour sur les résultats.....   | 125        |
| Perspectives.....   | 126        |
| <i>Autophagie et présentation croisée par CMH I.....</i>                          | <i>132</i> |
| Induction de l'autophagie.....  | 132        |
| Localisation de PapMV dans les autophagosomes.....                                | 133        |
| Rôle de l'autophagie.....   | 135        |
| Modèle proposé.....   | 136        |
| INHIBITION DE L'EXPRESSION DE L'IDO.....  | 139        |
| <i>Induction d'IDO par l'IFN-<math>\gamma</math>.....</i>                         | <i>139</i> |
| <i>Modes d'inhibition de l'IDO.....</i>   | <i>140</i> |
| Les inhibiteurs JAK-STAT.....   | 141        |
| Activation du protéasome.....   | 142        |
| Ubiquitination de l'IDO.....  | 142        |
| Implication de SOCS3.....   | 143        |
| <i>Modèles d'étude in vivo.....</i>   | <i>143</i> |
| COMBINAISONS DE THÉRAPIES : L'AVENIR.....   | 147        |
| <i>Combinaisons de chimiothérapies.....</i>                                       | <i>148</i> |
| <i>Combinaisons de chimiothérapies et d'immunothérapies.....</i>                  | <i>148</i> |
| <i>Combinaisons d'immunothérapies.....</i>  | <i>149</i> |
| <i>Vaccination et autre immunothérapies.....</i>                                  | <i>150</i> |
| <i>Contribution potentielle à l'avancement des connaissances.....</i>             | <i>150</i> |
| <b>CONCLUSION.....</b>  | <b>152</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>   | <b>154</b> |
| <b>ANNEXE I : MANUSCRIT DE REVUE DU RÔLE DE L'IDO DANS LES TUMEURS..... I</b>     |            |
| INDOLEAMINE 2,3-DIOXYGENASE EXPRESSION IN HUMAN CANCERS: CLINICAL AND IMMUNOLOGIC |            |
| PERSPECTIVES  |            |

*Clinical Cancer Research, 2011 Nov 15;17(22):6985-91*

**ANNEXE II : MANUSCRIT COMPLÉMENTAIRE ÉTUDIANT L'EXPRESSION D'IDO DANS LES  
LYMPHOCYTES B HUMAINS.....IX**

IDO EXPRESSION BY HUMAN B LYMPHOCYTES IN RESPONSE TO LYMPHOCYTE STIMULI AND TLR  
ENGAGEMENT IS BIOLOGICALLY INACTIVE

*Molecular Immunology, 2011 Oct;49(1-2):253-9*

**ANNEXE III : CURRICULUM VITAE SCIENTIFIQUE .....XVII**

## Liste des abréviations

**1-MT** : 1-methyltryptophane  
**1-MT-TZP** : 1-MT tirapazamines  
**3-MA** : 3-methyladénine  
**ADN** : acide désoxyribonucléique  
**ADP** : adénosine diphosphate  
**AMP** : adénosine monophosphate  
**AOM** : azoxyméthane  
**AP-1** : (*activator protein 1*)  
**APC** : cellules présentatrices d'antigènes (*antigen presenting cells*)  
**ARNi** : acide ribonucléique (ARN) interférant  
**ARNm** : ARN messenger  
**ARNt** : ARN transporteur  
**ARNsh** : ARN *short hairpin*  
**ATG5** : *autophagy gene 5*  
**ATCC** : *American type culture collection*  
**ATP** : adénosine triphosphate  
**B-CLL** : leucémie lymphoïde chronique à lymphocytes B  
**BCG** : Bacille Camille Guénette  
**BCR** : récepteur cellule B (*B cell receptor*)  
**CACre** : recombinaison Cre sous le contrôle de l'anhydrase carbonique 1  
**CatS** : cathepsine S  
**CD40B** : lymphocytes B activés au CD40L  
**CD40L** : CD40 ligand  
**CFSE** : *5-6-carboxyfluorescein diacetate*  
**CMH I** : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I  
**CMH II** : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II  
**CP** : protéine de surface (*coat protein*)  
**CTL** : lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques  
**CTLA-4** : antigène des lymphocytes T cytotoxiques-4 (*cytotoxic T lymphocytes antigen-4*)  
**CREB** : *cAMP response element-binding protein*  
**DAG** : diacylglycérol  
**DC** : cellules dendritiques  
**DC-SIGN** : *DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*  
**DMF** : diméthylformamide  
**DMSO** : diméthylsulfoxyde  
**DSS** : dextran sodium sulfate  
**DTP** : diphtérie-tétanos-poliomyélite  
**EBV-B** : lymphocytes B immortalisés au virus Epstein-Barr  
**ECL** : électrochimiluminescence  
**EDTA** : éthylène diamine tétra acétique  
**EGCG** : épigallocatechine-3-gallate  
**ELISA** : *enzyme-linked immunosorbent assay*  
**ER** : réticulum endoplasmique

**ERAD** : dégradation associée au ER (*ER associated degradation*)  
**ERAP** : aminopeptidase du ER  
**FACS** : fluorescence-activated cell sorting  
**FDA** : *food and drug administration*  
**FRQ-S** : Fonds de la recherche du Québec - santé  
**GAS** : séquence IFN- $\gamma$  activatrice (*gamma-interferon activated sequence*)  
**GCN2** : *general control nonderepressible 2*  
**GFP** : protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein*)  
**GILT** :  *$\gamma$ -interferon-inducible lysosomal thiol reductase*  
**GITR** : *glucocorticoid-induced TNFR family related gene*  
**GM-CSF** : *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*  
**HA** : hémagglutinine  
**HBsAg** : antigène recombinant de surface du virus de l'hépatite B  
**HBSS** : *Hank's balanced salt solution*  
**HBV** : virus de l'hépatite B  
**HCMV** : cytomégalovirus humain  
**HDAC** : histone désacétylase  
**HIF-1 $\alpha$**  : *hypoxia-inducible factor-1 alpha*  
**HLA** : antigène leucocytaire humain (*human leukocyte antigen*)  
**HPLC** : chromatographie liquide à haute performance (*high performance liquid chromatography*)  
**HPV** : virus du papillome humain  
**HRP** : peroxydase de raifort (horseradish peroxidase)  
**HSP90** : protéine de choc thermique (*heat-shock protein*) 90  
**HSV** : herpès simplex virus  
**ICOS** : *inducible T-cell costimulator*  
**ICS** : *intracellular cytokine staining*  
**IDO** : indoleamine 2,3-dioxygénase  
**IFN- $\gamma$  ou  $\alpha/\beta$**  : interféron-gamma ou alpha/beta  
**IHC** : immunohistochimie  
**IL** : interleukin  
**iNOS** : synthase de NO inductible  
**IP<sub>3</sub>** : inositol triphosphate  
**IRAP** : l'aminopeptidase régulée par l'insuline (*insulin-regulated aminopeptidase*)  
**ITAM** : motif activateur de tyrosine des immunorécepteurs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)  
**ITIM** : motif inhibiteur de tyrosine des immunorécepteurs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*)  
**JAK** : kinase Janus  
**LAG-3** : gène activateur des lymphocytes (*lymphocyte activation gene*)-3  
**LAT** : *linker of activated T cells*  
**LC3** : *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*  
**Lck** : *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*  
**LCMV** : virus de la chorioméningite lymphocytaire (*lymphocytic choriomeningitis virus*)  
**LMP1** : *latent membrane protein 1*

**MaMV** : virus de la mosaïque de la malva  
**MART-1** : *melanoma antigen recognized by T cells 1*  
**MDSC** : cellules myéloïdes suppressives (*myeloid-derived suppressor cells*)  
**MFI** : mean fluorescence intensity  
**MIP-1 $\beta$**  : *macrophage inflammatory protein-1 beta*  
**mTOR** : cible de la rapamycine des mammifères (*mammalian target of rapamycin*)  
**NA** : neuraminidase  
**NADPH** : nicotinamide adénine dinucleotide phosphate  
**NF- $\kappa$ B** : *nuclear factor  $\kappa$ B*  
**NKT** : *natural killer T*  
**NO** : oxyde nitrique  
**NOX2** : NAPDH oxydase 2  
**NS** : non-stimulés  
**NT** : non-traités  
**OVA** : ovalbumine  
**PAP** : phosphatase de l'acide prostatique  
**PapMV** : virus de la mosaïque de la papaye  
**PBMC** : cellules mononuclées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*)  
**PD-1** : récepteur de mort cellulaire programmée (*programmed cell death*)-1  
**PD-L1** : ligand de mort cellulaire programmée (*programmed cell death ligand*)-1  
**PE** : phosphatidyl-ethanolamine  
**PKC  $\theta$**  : phosphokinase C teta  
**PLC $\gamma$ 1** : phospholipase (PLC) gamma 1  
**PRR** : *pathogen recognition receptor*  
**PTEN** : *Phosphatase and TENsin homolog*  
**PVDF** : polyfluorure de vinylidène  
**RHDV** : virus de maladie hémorragique du lapin (*rabbit hemorrhagic disease virus*)  
**RRO** : rougeole-rubéole-oreillons  
**RSV** : virus respiratoire syncytial  
**RT-PCR** : *reverse transcriptase- polymerase chain reaction*  
**SAHA** : acide hydrozamique subéroylanilide (*suberoylanilide hydrozamic acid*)  
**SDS-PAGE** : *sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis*  
**SI** : système immunitaire  
**SOCS3** : (*suppressor of cytokine signaling 3*)  
**STAT1** : *signal transducers and activators of transcription 1*  
**SV40** : polyomavirus simien 40  
**TAM** : macrophages associés aux tumeurs (*tumor-associated macrophages*)  
**TAP** : transporteur associé à la présentation antigénique  
**TCR** : récepteur de lymphocyte T (*T cell receptor*)  
**TDLN** : ganglions lymphatiques drainants la tumeur (*tumor-draining lymph node*)  
**TfR** : récepteur à la transférine (TfR)  
**TGF- $\beta$**  : facteur de croissance tumoral (*tumor growth factor*)-beta  
**TIL** : lymphocytes infiltrant la tumeur (*tumor-infiltrating lymphocytes*)  
**TLR** : récepteur *toll-like*  
**TMV** : virus de la mosaïque de la tomate (*tomato mosaic virus*)

**TNF- $\alpha$**  : facteur de nécrose tumoral (*tumor necrosis factor*)-alpha

**TNFR** : *récepteur au TNF (TNF receptor)*

**TPPII** : tripeptidyl-peptidase II

**T<sub>reg</sub>** : lymphocytes T régulateurs

**ULK1** : *UNC-51-like kinase*

**VIH** : virus de l'immunodéficience humaine

**VLP** : particule pseudo-virale (virus-like particle)

**Zap70** : *Zeta-chain-associated protein kinase 70*

## Liste des tableaux

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tableau 1 (Hanafi et al. Vaccine Table 1).</b> Oligonucleotide sequences used for the introduction of the gp100 and the influenza M1 sequences at the C-terminus of MaMV CP..... | 54  |
| <b>Tableau 2 (Hanafi et al. Vaccine Table 2).</b> M1-specific T cell expansion results with eight normal donors stimulated with chimerical VLP or synthetic peptide.....            | 54  |
| <b>Tableau 3</b> Liste d'inhibiteurs pour l'étude de l'endocytose .....   | 127 |

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1</b> Transduction du signal par le TCR et activation des lymphocytes T .....  | 4  |
| <b>Figure 2</b> Présentation antigénique croisée par les lymphocytes B activés.....  | 6  |
| <b>Figure 3</b> Autorégulation du système immunitaire.....   | 12 |
| <b>Figure 4</b> Différentes plateformes vaccinales : des acides nucléiques aux cellules .....  | 19 |
| <b>Figure 5</b> Présentation antigénique croisée par CMH I.....  | 24 |
| <b>Figure 6</b> Voie autophagique et ses inhibiteurs.....  | 26 |
| <b>Figure 7</b> Activation et mécanismes de suppression de l'IDO .....   | 31 |
| <b>Figure 8</b> Deux stratégies d'action pour stimuler la réponse cellulaire spécifique .....  | 32 |
| <b>Figure 9 (Hanafi et al. Vaccine Figure 1)</b> PapMV and MaMV coat proteins are distinct. ...  | 55 |
| <b>Figure 10 (Hanafi et al. Vaccine Figure 2)</b> Preparation of chimerical MaMV CP fused with<br>MHC class I epitopes from influenza M1 and gp100 proteins. ....  | 56 |
| <b>Figure 11 (Hanafi et al. Vaccine Figure 3)</b> Time course of VLPs entry in APCs.....   | 57 |
| <b>Figure 12 (Hanafi et al. Vaccine Figure 4)</b> PapMV and MaMV were internalized in<br>vesicular compartments in CD40B, KG-1 and moDC.....   | 58 |
| <b>Figure 13 (Hanafi et al. Vaccine Figure 5)</b> PapMV and MaMV were cross-presented by<br>CD40B and led to specific T cell proliferation. ....   | 59 |
| <b>Figure 14 (Hanafi et al. Vaccine Figure 6)</b> PapMV M1 and MaMV M1 lead to expansion of<br>specific T lymphocytes from PBMC. ....  | 60 |
| <b>Figure 15 (Hanafi et al. Vaccine Figure 7)</b> Caspase-8 cleavage is induced in CD40B pulsed<br>with high concentration of MaMV M1. ....  | 61 |
| <b>Figure 16 (Hanafi et al. unpublished Figure 1)</b> PapMV VLP MHC class I cross-presentation<br>requires active processing which is independent on TAP .....   | 81 |
| <b>Figure 17 (Hanafi et al. unpublished Figure 2)</b> Inhibition of cathepsin S and endocytic<br>acidification abrogated MHC class I cross-presentation mediated by PapMV VLP .....                        | 82 |
| <b>Figure 18 (Hanafi et al. unpublished Figure 3)</b> Autophagy is induced in APC following<br>PapMV VLP incubation.....   | 83 |
| <b>Figure 19 (Hanafi et al. unpublished Figure 4)</b> MHC class I cross-presentation mediated by<br>PapMV VLP is dependent on autophagy induction and is enhanced by starvation-induced<br>autophagy ..... | 84 |



|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 20 (Hanafi et al. unpublished Figure 5)</b> Inhibition of ATG5 reduced PapMV VLP mediated MHC class I antigen cross-presentation.....                       | 85  |
| <b>Figure 21 (Hanafi et al. unpublished Figure S1)</b> Rapamycin treatment reduced MHC class I surface expression and alter antigen presentation in EBV-B cells ..... | 86  |
| <b>Figure 22 (Hanafi et al. PlosOne Figure 1)</b> STAT1 is involved in IDO expression in response to T lymphocyte-derived factors.....                                | 106 |
| <b>Figure 23 (Hanafi et al. PlosOne Figure 2)</b> Fludarabine inhibits IDO protein independently of STAT1 phosphorylation on Y710 and S727. ....                      | 107 |
| <b>Figure 24 (Hanafi et al. PlosOne Figure 3)</b> Fludarabine inhibits IDO activity independently of the mRNA level. ....   | 108 |
| <b>Figure 25 (Hanafi et al. PlosOne Figure 4)</b> MHC I and PD-L1 expression levels remain unchanged following fludarabine treatment. ....                            | 109 |
| <b>Figure 26 (Hanafi et al. PlosOne Figure 5)</b> Downregulation of IDO by nucleoside analogs. ....   | 110 |
| <b>Figure 27 (Hanafi et al. PlosOne Figure 6)</b> Fludarabine inhibits IDO via a proteasome-mediated degradation pathway. ....  | 111 |
| <b>Figure 28 (Hanafi et al. PlosOne Figure S1)</b> IDO antibody specificity assessement. ....   | 112 |
| <b>Figure 29 (Hanafi et al. PlosOne Figure S2)</b> STAT1 phosphorylation induction by PBMC supernatants.....  | 113 |
| <b>Figure 30 (Hanafi et al. PlosOne Figure S3)</b> IDO inhibition by fludarabine is reproduced in kidney cancer cell line. ....                                       | 114 |
| <b>Figure 31</b> Présentation croisée par CMH I de l'épitope MART-1.....  | 123 |
| <b>Figure 32</b> Essai de reconnaissance en présence d'anti-PapMV.....  | 125 |
| <b>Figure 33</b> Essai de reconnaissance avec chargement de CD40B HLA-A2 <sup>-</sup> pour relâchement de l'épitope .....   | 131 |
| <b>Figure 34</b> Induction de l'autophagie par PapMV et MaMV M1 .....   | 133 |
| <b>Figure 35</b> Contact entre les vésicules PapMV <sup>+</sup> et les autophagosomes (LC3 <sup>+</sup> ) .....   | 134 |
| <b>Figure 36</b> Modèle proposé de présentation croisée par les VLP de PapMV .....  | 138 |
| <b>Figure 37</b> Induction de l'expression de l'IDO dans les PBMC B-CLL.....  | 145 |
| <b>Figure 38</b> Schéma expérimental pour l'étude <i>in vivo</i> de l'effet de la fludarabine sur l'IDO. ....   | 147 |
| <b>Figure 39</b> Schéma de mise en contexte de la conclusion globale de la thèse .....  | 153 |

*À tous ceux qui ont toujours cru en moi*

## Remerciements

Voilà le temps des remerciements. Cette section est plus qu'essentielle à la rédaction d'une thèse puisqu'il est évident que sans le support et l'aide de l'entourage, les études doctorales sont tout simplement impossibles. Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, **Réjean Lapointe**. Réjean m'a accepté dans son laboratoire à l'été 2007 pour un stage lors de mon baccalauréat en sciences biomédicales. Je désirais déjà aller en recherche, mais Réjean, grâce à son enthousiasme pour l'immuno-oncologie et la science en général, m'a vraiment donné la piqure. J'ai donc décidé de poursuivre ma maîtrise dans le même laboratoire, puis mon doctorat pour un passage direct. Tout au long de ces sept années, Réjean a su m'encourager et m'a donné toutes les libertés et responsabilités nécessaires pour me permettre aujourd'hui d'avoir tous les acquis importants pour une étudiante au doctorat. Je te remercie donc, Réjean, de m'avoir poussée à travailler sur plusieurs projets et encouragée à développer toutes mes capacités.

Lorsque je suis arrivée au tout début de mon stage dans le laboratoire Lapointe, j'étais sous la supervision de **Jessica Godin-Ethier**. J'ai adoré travailler avec Jessica, nos façons de travailler étaient compatibles et j'ai beaucoup appris l'organisation du temps de laboratoire avec elle. Grâce à son expertise scientifique, j'ai pu travailler sur la protéine IDO avec beaucoup de plaisir et plusieurs des projets sur lesquels j'ai travaillé pendant mes études doctorales sont la suite de ses travaux de doctorat. Jessica était également une amie, j'ai adoré travailler avec elle et aussi potiner lors de nos « matins-potins » ou encore pendant la petite pause collation en après-midi. Merci, Jessica, pour ta présence dans le laboratoire et de m'avoir inculqué le sens du systématisme et de l'organisation me permettant maintenant de travailler plus efficacement.

Lors de mon arrivée au doctorat, la deuxième doctorante sénior du laboratoire était **Marie-Andrée Forget**. Réjean aimait les appeler, elle et Jessica, les « piliers du laboratoire », car il est certain que sans elles, la vie au laboratoire aurait été beaucoup moins agréable. En plus d'être présente pour bien faire rouler les activités du laboratoire, Marie était l'entremetteuse qui nous a tous permis de développer une amitié solide. Au début de ma maîtrise, j'ai déménagé à Montréal et Marie m'a initiée aux activités de la grande ville, soit les

festivals, les spectacles, le magasinage de même que les soirées cinéma du mardi soir. De plus, Marie nous a fait découvrir son petit coin de pays, Joliette, où nous avons été très bien accueillis par sa famille tout aussi chaleureuse qu'elle. Merci, Marie, pour ton soutien moral dans toutes les situations et pour avoir partagé avec moi de si beaux moments.

En plus des deux étudiantes seniors, au cours de mon doctorat, j'ai pu partager la vie de laboratoire avec plusieurs autres étudiants et étudiantes. Tout d'abord, il y a eu **Jean-Daniel Doucet** qui a commencé sa maîtrise presque en même temps que moi. Que dire de JD; il m'a montré que tout était possible, on se comprenait, c'était la personne avec qui je pouvais avoir des discussions entre *nerds*. Merci, JD, d'avoir été là, ton intelligence m'épatera toujours et je suis heureuse d'avoir fait un bout de mes études avec toi. Même aujourd'hui, discuter avec toi est toujours agréable. Tu as gardé ton cœur d'enfant qui aime découvrir et transmettre le plaisir de la science aux jeunes. Tu me rappelles pourquoi j'ai choisi cette voie; pour l'amour de la science.

Il y avait aussi un deuxième étudiant à la maîtrise, **Alexandre Reuben**. Nous avons continué au doctorat ensemble dans le laboratoire Lapointe. Alexandre, en travaillant chez Manuela Santos au départ, était plus loin de nos activités, mais bien vite, il a déménagé son *bench* à côté du mien et notre relation s'est transformée en celle d'un grand frère et de sa petite sœur. Alexandre est un grand protecteur, toujours là pour donner tout son amour et son soutien aux personnes qui l'entourent. Plus d'une fois, il a été présent pour nous reconforter et nous remonter le moral dans les moments difficiles. Je te dis donc merci, Alex, pour être qui tu es; je suis heureuse d'avoir partagé avec toi mes études doctorales. Merci aussi pour ton œil de lynx qui détecte toutes les erreurs dans les textes et les présentations. Je penserai toujours à toi pendant les futures sorties de produits Apple, même si nos projets de post-doc nous sépareront dans des villes lointaines.

La dernière doctorante, mais non la moindre, avec qui j'ai partagé mon doctorat est **Cécile Grange**. Cette Française, remplie d'énergie et de bonne humeur, a été parmi nous tout au long de mes études dans le laboratoire Lapointe. Cécile est toujours disponible à proposer son aide dans n'importe quelles circonstances. Sur le plan personnel, Cécile m'a permis de rencontrer plein de gens intéressants en m'invitant dans ses *partys* de Français. De plus, je dois remercier Cécile, car, grâce à son grand cœur, elle m'a aidée à devenir une meilleure

personne sur le plan social et interpersonnel, même si j'ai encore du travail à faire. Merci pour tout, Cécilou, je penserai toujours à toi. Tu auras toujours une place dans mon cœur et j'espère que nous pourrons partager beaucoup d'autres bons moments ensemble.

Dans le laboratoire, nous avons également eu l'occasion de travailler avec deux associées de recherche, **Dominique Gauchat** et Paméla Thébault. Tout d'abord, Dominique est arrivée dans le laboratoire avec sa grande expérience et toutes ses connaissances qui nous ont été plusieurs fois utiles. J'ai beaucoup appris d'elle. Dominique est vite devenue la « maman » du laboratoire avec ses petites attentions et sa gestion des activités du laboratoire et des « CHUMeries », comme elle les appelait. Merci, Dominique, pour tes conseils qui m'ont aidée à mieux comprendre beaucoup de techniques de base en biologie moléculaire. Merci aussi, Dom, pour tes chocolats et toutes les autres attentions qui ont rendu certains jours gris plus heureux.

Même si **Paméla Thébault** est arrivée dans le laboratoire vers la fin de mon doctorat, nous nous sommes vite liées d'amitié. Dès le départ, elle a pris le contrôle de la gestion du laboratoire et nous a permis, en tant qu'étudiants, de nous concentrer sur nos expériences au lieu de gérer les commandes et autres tâches connexes. Le franc-parler et l'assurance de Paméla m'ont tout de suite amenée à avoir confiance en elle et respecter son autorité. Sur le plan personnel, grâce à nos points communs, nous nous sommes tout de suite bien entendues. Merci, Pam, pour toutes les discussions autour du repas du midi et pour ton soutien dans le laboratoire. J'ai adoré te rencontrer, toi et ta fille qui m'a même fait aimer les enfants.

Le laboratoire Lapointe gère également une banque de tissus du cancer du sein grâce au soutien technique d'**Urszula Krzemien** et, maintenant, de **Stéphanie Lepage**. Ces deux personnes font donc partie intégrante du laboratoire et leur apport a été plus qu'essentiel. Merci, Urszula, pour ta personnalité colorée et les découvertes culinaires polonaises. Merci, Stéphanie, pour ton aide dans le laboratoire avec mes REP et ta bonne humeur.

Plus récemment dans le laboratoire, nous avons accueilli un nouvel étudiant au doctorat, **David Possamaï**. Directement arrivé de France, ce petit génie s'est bien intégré et nous a fait voir l'avenir d'un bon œil. Merci, David, de partager ton savoir et ta curiosité scientifique. Tu iras loin et je suis très heureuse de t'avoir connu. De plus, deux stagiaires

postdoctorales ont rejoint les rangs du laboratoire Lapointe à la fin de mon doctorat, **Anne Monette** et **Nadia Al-Banna**. Merci, Anne, pour ta personnalité remplie de gaieté et pour ta maîtrise de la langue anglaise que tu aimes tant partager. Merci, Nadia, pour ton sens de l'analyse et ta grande connaissance de la littérature actuelle. Vous serez les nouveaux « piliers scientifiques » du laboratoire.

Tout au long de mon doctorat, j'ai également côtoyé différents stagiaires d'été qui, chacun à leur manière, m'ont appris différentes choses. Plus précisément, deux personnes avec qui j'ai eu la chance de partager ma connaissance de la culture des lymphocytes B, **Audrée Lachance** et **François Panet**. Merci de m'avoir permis de développer mes capacités de professeure et bonne chance à vous deux dans vos futures carrières de médecins.

De plus, le laboratoire Lapointe a la chance de faire partie d'un merveilleux institut, l'ICM. Cet univers est un endroit exceptionnel pour faire ses études graduées. Le côté collaboratif et amical de l'interaction entre les laboratoires est un atout majeur pour un endroit où faire de la science. J'y ai développé d'intéressantes collaborations avec le laboratoire d'**Yves Langelier** et l'expertise de **Florent Dufour**, et j'ai aussi soudé de belles amitiés avec Sandy, Yannick, Gany et Julie. Merci particulièrement à **Sandy Pelletier**, que j'ai connu par l'entremise de Marie et qui maintenant travaille dans le laboratoire voisin. Merci, Mommy, tu es une bonne oreille et c'est toujours agréable de passer du temps avec toi. De plus, il est important de souligner le travail acharné de l'équipe de l'ICM qui, chaque année, amasse de l'argent pour permettre aux chercheurs et aux étudiants de faire de la recherche. Merci **Julie Desgagnés**, **Nathalie Tapp** et **Maral Tersakian**.

En déménageant dans le nouveau CRCHUM, nous avons commencé la cohabitation avec le laboratoire de **John Stagg**. Merci à Martin, Bertrand, David, Pavel, Bruno, Marjorie, Roxanne, Loïse, Sandra et John de partager notre passion pour l'immunothérapie du cancer.

Je dois également remercier les autres collègues du CRCHUM et de l'Université de Montréal qui, tout au long de mon doctorat, m'ont donné de bons conseils et de l'aide technique pour avancer. Merci donc à **Marie-Josée Hébert**, **Nathalie Labrecque** et **Michel Desjardins** d'avoir participé à mes comités de suivi et de m'avoir si bien conseillée. Merci aussi à **Jean-François Cailhier**, **Nathalie Grandvaux**, **Katia Hamelin** et **Guillaume**

**Chouinard** au CRCHUM de même qu'à **Angélique Bellemare-Pelletier** et **Étienne Gagnon** à l'IRIC.

En plus de côtoyer différents chercheurs au niveau local, ma participation au groupe travaillant sur PapMV m'a également permis de travailler avec des personnes de talent. Tout d'abord, **Denis Leclerc**, le grand manitou de la nanoparticule de PapMV, merci de m'avoir fait confiance pour travailler sur la présentation antigénique de PapMV et je souhaite de tout cœur que PapMV puisse un jour faire partie des outils disponibles pour traiter les patients. Il y a aussi **Alain Lamarre** et **Marie-Ève Lebel** qui travaillent sur l'aspect « souris » de PapMV. Merci à vous deux de m'avoir aidée lors de mes tentatives de travailler dans un modèle murin et pour votre apport à l'enrichissement de la connaissance sur cette plateforme vaccinale.

Sur le plan plus personnel, les amitiés sont également importantes pour réussir le doctorat. Je tiens donc à remercier **Natacha** et **Dominique**, mes complices du bacc en Biomed. Même si vous avez suivi des chemins différents, vous êtes toujours là pour me soutenir et passer du bon temps. Merci aussi à mes amies du bateau dragon, particulièrement **Audrey** et **Laurie-Anne**, mes partenaires préférées d'entraînement. Ce sport m'a donné la chance de me développer énormément sur le plan personnel et de me rappeler qu'en travaillant fort, nous pouvons atteindre tous nos objectifs. Le dépassement physique m'a permis de croire en mes possibilités.

La famille est également une part importante derrière chaque personne. Cela nous permet d'être qui nous sommes. Merci donc à mes parents, **Louise** et **Lahcen**, de toujours avoir été là et de m'avoir tout appris pour faire de moi qui je suis maintenant. Merci, Maman, pour ton amour inconditionnel et ton soutien dans tous les moments plus difficiles. Merci, Papa, de toujours croire en moi et de m'admirer, même si je ne mérite pas toujours toute cette admiration. C'est pour vous rendre fiers que je fais ce que je fais et vous m'avez certainement permis d'aller plus loin. Merci à mon frère, **Karim**, pour ton amour et ton admiration. Je pense toujours à toi et je t'encourage à aller où tu le désires. Merci aussi à ma tante **Hélène** qui partage mon amour pour le domaine de la santé. Merci à **Grand-Maman** pour tes prières, je suis certaine que, grâce à toi, j'ai eu beaucoup de chance dans la vie. Merci, **Grand-Papa**, pour ta confiance et ton soutien tout au long de mes études.

Finally, during my doctorate, I met a man, **Raphaël Paquette**, thanks to the introducer Alexandre. This man shares my life; he has been there for me in difficult moments, but also to share the good moments and the travels. In his way, he encourages and helps me to become a better person every day. His personality traits so different from mine balance me in several aspects of my life. Raphaël, my dear, I must tell you thank you for always being present for me, despite my character not being easy to manage and my great lack of tact. Your support for my future post-doc abroad allows me to envisage the future with less apprehension and more confidence. I do not know what I would do without you and I do not want to know.

MERCI À TOUS !



# Introduction

## *Objectif général et structure de la thèse*

L'objectif principal des travaux de cette thèse consiste à étudier différentes stratégies pour stimuler la réponse immunitaire de type cellulaire dans un contexte d'immunothérapies du cancer ou en prévention d'infections virales. La section **Introduction** permettra de mettre en contexte mon projet de doctorat en faisant une revue des différents aspects de l'immunité cellulaire, de la vaccination, de la présentation antigénique croisée et de l'immunorégulation par l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO). Le **Chapitre 1** présentera, sous forme de manuscrit publié, les résultats de la comparaison de deux potexvirus en tant que plateforme de vaccination fait de particules pseudo-virales (VLP). Le **Chapitre 2** étudiera plus en profondeur la présentation antigénique croisée médiée par les VLP du virus de la mosaïque de la papaye (PapMV) et l'implication de l'autophagie. Ce chapitre est également présenté sous forme de manuscrit, mais n'est pas encore publié. Le **Chapitre 3** présentera une stratégie d'inhibition de l'expression d'IDO par un agent chimiothérapeutique qui stimule la dégradation de cette enzyme par le protéasome. Ce chapitre est également sous forme de manuscrit publié. Finalement, la section **Discussion et Perspectives** reviendra sur les résultats présentés dans les trois chapitres afin de les mettre en contexte avec ce qui a déjà été publié et proposer de futures expériences.

## **Immunité cellulaire**

Le système immunitaire (SI) est organisé de façon à pouvoir défendre le corps de différentes attaques. Ce système complexe peut être divisé en deux types de réponse immunitaire : innée et adaptative. L'immunité innée répond au premier signe d'intrusion de façon rapide. Par opposition, le SI adaptatif répond en deuxième ligne et ce, plus lentement. L'immunité adaptative possède également la caractéristique de conserver une mémoire immunologique afin de répondre plus efficacement aux attaques subséquentes par un même pathogène. Les réponses du système adaptatif peuvent être divisées en deux grandes

catégories, la réponse humorale (sécrétion d'anticorps spécifiques) et la réponse cellulaire (lyse par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (CTL)). Dans cette thèse, je me concentrerai sur l'immunité à médiation cellulaire.

### *Induction de la réponse cellulaire*

L'immunité cellulaire se définit par l'activation des CTL qui lysent spécifiquement les cellules exprimant à leur surface le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) contenant un peptide spécifique. Tout d'abord, les CTL à leur sortie du thymus sont naïfs et en attente de rencontrer l'antigène pour lequel leur TCR (*T cell receptor*) recombiné est spécifique. Un CTL naïf doit être activé par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) professionnelles (appelé le *priming* ou l'initiation). Cette activation spécifique permet d'empêcher la suractivation des CTL et est nécessaire pour permettre aux CTL d'acquiescer pleinement toutes leurs fonctions effectrices. L'initiation doit se faire par une APC ayant maturée dans des conditions optimales et présentant un antigène spécifique.

#### TROIS SIGNAUX D'ACTIVATION

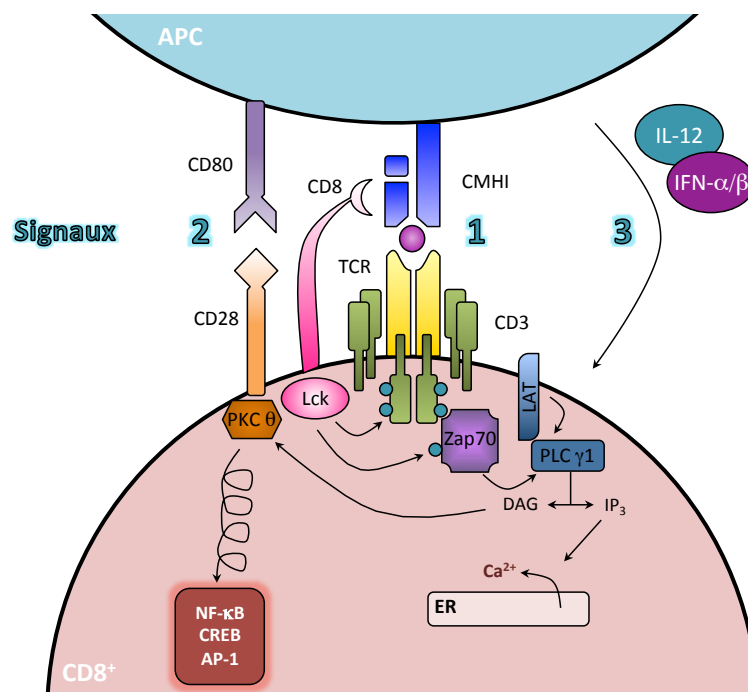
L'initiation de la réponse à médiation cellulaire nécessite trois signaux spécifiques (Figure 1). Le premier signal est la présentation d'un peptide spécifique par le CMH I de l'APC. Il est donc nécessaire que la protéine du non-soi ou du soi altéré pour laquelle le CTL est spécifique soit présentée par une APC. Pour ce faire, les APC parcourent le corps à la recherche d'antigènes du non-soi, c'est-à-dire des protéines qui ne sont généralement pas exprimées par le corps humain. Elles détectent aussi des signaux associés au danger ou au non-soi par de multiples récepteurs de la famille des PRR (*pathogen recognition receptor*) [1]. L'engagement de ces récepteurs donnera un signal de maturation à l'APC qui pourra ainsi initier la réponse immunitaire. Les APC matures présenteront donc des fragments de protéines (peptides ou épitopes) logés dans la poche peptidique de leur CMH I et CMH II. Le mécanisme de chargement sur le CMH I sera discuté plus en détails dans la section **Présentation antigénique croisée par CMH I.**

Lorsque le TCR du CTL reconnaîtra le bon peptide chargé sur le CMH I approprié, il y aura activation du signallement cellulaire associé au TCR (Figure 1). Une cascade d'évènements signalétiques, incluant le relâchement de calcium, mènera à l'activation du lymphocyte T. Rapidement après l'engagement du TCR, la protéine kinase Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) phosphorylera les motifs activateurs de tyrosine des immunorécepteurs (ITAM) présents sur les chaînes CD3 [2]. La protéine Zap70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*) reconnaîtra cette phosphorylation et pourra elle-même être phosphorylé par Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) [3]. L'activité kinase de Zap70 engendrera l'activation du signalosome échafaudé autour de la protéine LAT (*linker of activated T cells*) [4]. Le signalosome régulera positivement l'activité de la phospholipase C (PLC)  $\gamma$ 1. Finalement, le relâchement d'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) par la PLC $\gamma$ 1 induira la libération de calcium stocké dans le réticulum endoplasmique (ER) et le relâchement de diacylglycérol (DAG) qui activera la voie phosphokinase C (PKC)  $\theta$  menant ultimement à l'activation des voies NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*), CREB (*cAMP response element-binding protein*) et AP-1 (*activator protein 1*) [5] (Figure 1).

Pour mener à bien l'initiation de la réponse immunitaire, il est nécessaire que l'APC fournisse également le signal 2 (Figure 1). Ce signal consiste en la stimulation du récepteur CD28 sur les lymphocytes T [6]. Les APC matures expriment, à leur surface, des ligands initiant des signaux de costimulation (CD80 et CD86) par leur liaison au CD28. L'absence de cette costimulation lors de la stimulation du TCR mènera à l'anergie du lymphocyte T naïf [7]. Le CD28 favorise la stimulation par le TCR grâce à un recrutement localisé de la PKC  $\theta$  au niveau de la synapse immunologique [8]. De plus, l'engagement du CD28 est nécessaire pour une activation optimale de la signalisation du TCR [9]. De nos jours, nous savons aussi qu'il existe d'autres signaux de costimulation pour le lymphocyte T, comme OX40, ICOS (*inducible T-cell costimulator*), 4-1BB ou CD40L (revue dans [10]).

Finalement, le troisième signal nécessaire à la complète activation du CTL est la sécrétion de cytokines (Figure 1). Des essais *in vitro* ont montré que la présence de CMH I et de CD80/86 n'était pas suffisante pour activer pleinement les lymphocytes T. L'ajout

d'interleukine (IL)-12 ou d'interféron (IFN)- $\alpha/\beta$  remédiait à cette situation [11]. Tout d'abord, l'IL-12 est sécrété par les APC après engagement de leur récepteur CD40 par son ligand, le CD40L (CD154), exprimé à la surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> [12]. De plus, l'engagement des PRR stimule dans les APC, surtout les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), la production d'IFN- $\alpha/\beta$  [13]. La présence de cytokines pro-inflammatoires vient donc compléter la trilogie d'activation et permet de générer des CTL effecteurs qui pourront tuer les cellules cibles.



**Figure 1** Transduction du signal par le TCR et activation des lymphocytes T

L'induction de la réponse lymphocytaire T CD8<sup>+</sup> cytotoxique nécessite l'activation par une APC mature qui fournira les signaux via le CMHI I (1), la costimulation (2) et la sécrétion de cytokines (3). Brièvement, la transduction du TCR est médiée par la phosphorylation initiale du CD3 et de Zap70 par Lck. Zap70 activera ensuite le signalosome représenté ici par LAT. La PLCγ1 est ensuite activée et, par la production d'IP<sub>3</sub>, induira le relâchement de calcium (Ca<sup>2+</sup>) dans le cytoplasme. De plus, la production de DAG activera la PKCθ étant recrutée par le CD28 à la synapse immunologique activant ainsi une panoplie de cascades de signalisation permettant les fonctions effectrices et la prolifération des lymphocytes T. CMHI : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, TCR : récepteur cellule T, IL-12 : interleukine-12, IFN- $\alpha/\beta$  : interféron-alpha/beta, Zap70 : Zeta-chain-associated protein kinase 70, Lck : lymphocyte-specific protein tyrosine kinase, LAT : linker of activated T cells, PLCγ1 : phospholipase gamma1, IP<sub>3</sub> : inositol triphosphate, DAG : diacylglycérol, PKCθ : phosphokinase teta, ER : réticulum endoplasmique.

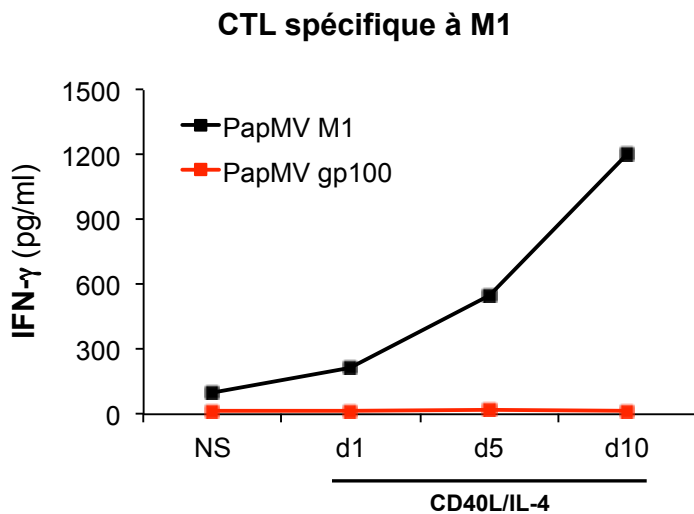
## CELLULES PRÉSENTATRICES D'ANTIGÈNES (APC) PROFESSIONNELLES

Il est impossible de parler d'induction de l'immunité cellulaire sans discuter des différents types d'APC qui ont un rôle crucial dans l'activation des lymphocytes T. Les APC professionnelles peuvent se définir comme des cellules ayant la capacité de présenter des peptides autant par CMH I que par CMH II et pouvant ainsi activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>. Les recherches du Dr Steinman menant à la découverte de la cellule dendritique (DC) dans les années 1970 lui ont valu le prix Nobel de médecine en 2011 [14]. Depuis cette découverte, une panoplie d'études a permis de mieux comprendre la variété des fonctions et la diversité des sous-types de DC. Nous savons maintenant que les DC sont une population de cellules immunitaires importante dans l'induction, la polarisation et le contrôle de la réponse immunitaire. Il existe plusieurs sous-populations de DC chez l'humain autant circulantes que résidentes qui ont chacune leurs fonctions spécifiques (revue dans [15]).

Les monocytes-macrophages sont également des APC professionnelles. Les monocytes sont des phagocytes mononucléés circulant dans le sang, tandis que l'appellation « macrophages » désigne ces mêmes cellules circulant dans les tissus. Ce type cellulaire, grâce à leur grande capacité de phagocytose, a la possibilité de faire un échantillonnage exhaustif des antigènes présents dans le microenvironnement en homéostasie et lors d'inflammation. Tout comme les DC, il existe plusieurs types de macrophages résidents, comme les cellules Kupffer dans le foie [16] et les macrophages alvéolaires dans les poumons [17].

Finalement, les lymphocytes B activés sont également des APC professionnelles. À la suite de l'engagement de leur récepteur de cellule B (BCR), ces cellules ont la capacité d'endocyter spécifiquement l'antigène lié aux anticorps membranaires. L'endocytose dépendante du BCR permet la concentration d'antigènes spécifiques grâce à la reconnaissance protéique médié par l'anticorps de surface. La présentation de ces antigènes est proportionnelle à l'affinité entre l'antigène et l'anticorps de surface [18]. De plus, les lymphocytes B activés par le CD40L (CD40B) ont également la capacité de capturer et de présenter des antigènes de façon indépendante de leur BCR [19]. La Figure 2 permet de constater que plus longtemps les lymphocytes B sont stimulés avec du CD40L et de l'IL-4,

plus ils acquièrent de grandes capacités de présentation antigénique. Puisque les lymphocytes B représentent une plus grande population des cellules immunitaires circulantes que les cellules dendritiques, il est plus facile d'en obtenir à partir du sang périphérique [20]. Cette propriété peut être utilisée pour générer une grande quantité d'APC efficaces en vaccination cellulaire (revue dans [21]). Dans les deux premiers chapitres de cette thèse, nous avons utilisé les CD40B comme APC. De plus, pour certains essais, l'immortalisation par le virus Epstein-Barr (EBV) a permis d'obtenir une lignée cellulaire pouvant présenter des antigènes par CMH I et CMH II de façon constitutive. La protéine LMP1 (*latent membrane protein 1*) de l'EBV mime la signalisation moléculaire par le CD40 dans les lymphocytes B infectés et permet ainsi l'activation constitutive des lymphocytes B immortalisés [22].



**Figure 2** Présentation antigénique croisée par les lymphocytes B activés

Les lymphocytes B ont été purifiés par sélection magnétique négative et ont été utilisés pour présenter de façon croisée PapMV M1 à des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques. NS : non-stimulés, d1, 5, 10 : nombre de jours de stimulation

### *Autorégulation de l'immunité cellulaire*

Après l'induction de la réponse immunitaire, il est important de contrôler son activation et de l'arrêter afin d'éviter les dommages engendrés par une réponse immunitaire excessive. Plusieurs mécanismes sont mis en place par le SI pour contrôler la suractivation des CTL et promouvoir la phase de contraction après l'insulte. Ce contrôle peut être fait à plusieurs niveaux (Figure 3).

## CELLULES IMMUNORÉGULATRICES

Le SI possède la capacité de déployer au site d'inflammation des cellules immunitaires spécialisées en immunorégulation. Les lymphocytes T régulateurs ( $T_{reg}$ ) sont une sous-population de lymphocytes T  $CD4^+$  possédant une activité inhibitrice sur les fonctions des lymphocytes T et les autres cellules immunitaires. Il existe deux sous-types de  $T_{reg}$ , les naturels et les inductibles. Les  $T_{reg}$  naturels ( $nT_{reg}$ ) sont formés directement dans le thymus lors de la sélection négative des lymphocytes T  $CD4^+$ . Les  $nT_{reg}$  expriment le facteur de transcription FoxP3 et une déficience en FoxP3 induit un syndrome d'hyperactivité immunitaire létal [23]. Ce facteur de transcription permet la différenciation en  $T_{reg}$  par l'induction de marqueur comme CTLA (antigène des lymphocytes T cytotoxiques)-4 et GITR (*glucocorticoid-induced TNFR family related gene*) de même que l'inhibition de cytokines pro-inflammatoires, IL-2, IFN- $\gamma$  et IL-4 (revue dans [24,25]). Pour leur part, les  $T_{reg}$  inductibles ( $iT_{reg}$ ) sont générés en périphérie à même la population de lymphocytes T  $CD4^+$  dans un environnement immunosuppresseur. Les signaux qui peuvent induire les  $iT_{reg}$  sont multiples et inclus le TGF- $\beta$  et l'acide rétinoïque [26-29]. L'IL-2 est également une cytokine importante dans le maintien des  $T_{reg}$ . Ces dernières, exprimant à leur surface une grande quantité de CD25 (chaîne alpha de l'IL-2R), sont sensibles à la présence de cette cytokine et en ont besoin pour leur fonction régulatrice [30-32].

Les  $T_{reg}$  ont la capacité de réguler la réponse immunitaire en réduisant l'apparition de maladie auto-immune ou en contrôlant la réponse contre les antigènes du non-soi, comme la flore intestinale commensale [33]. Les  $T_{reg}$  peuvent supprimer la réponse immunitaire par plusieurs mécanismes (revue dans [34]). Tout d'abord, ces cellules suppriment la prolifération et la différenciation des lymphocytes T naïfs en cellules effectrices [35]. De plus, la sécrétion de TGF- $\beta$  et d'IL-10 ou même d'IL-35 par les  $T_{reg}$  contribue à maintenir un environnement immunosuppresseur [36]. Finalement, les  $T_{reg}$  peuvent empêcher la maturation des APC par de multiples mécanismes (LAG-3, CTLA-4, l'hydrolyse d'ATP) qui seront discutés plus en profondeur dans les sections suivantes.

Un deuxième type cellulaire qui peut être associé à l'immunosuppression est le macrophage de phénotype M2. En règle générale, lors de la réparation d'une plaie ou lors de la

résolution d'une infection, des signaux de fin de réponse immunitaire sont enclenchés. La polarisation du macrophage en type M2 permet d'envoyer des signaux anti-inflammatoires et promouvant la réparation [37]. Par contre, dans plusieurs contextes chroniques, comme c'est le cas pour le cancer, les macrophages M2 peuvent avoir un effet délétère relié à leur phénotype stimulant la prolifération et la réparation [38,39] et favorisant même la formation de métastase [40]. Plusieurs stratégies en immunothérapie du cancer pourraient aider à contrôler ces macrophages associés aux tumeurs (TAM) (revue dans [41]). De plus, certaines maladies infectieuses ont évolué afin de favoriser la polarisation des macrophages en phénotype M2 tôt dans l'infection dans le but de s'évader à la réponse immunitaire [42-45].

Finalement, un autre type cellulaire caractéristiquement associé à l'immunosuppression est les cellules myéloïdes suppressives ou MDSC (*myeloid-derived suppressor cells*). Cette sous-population de cellules myéloïdes plutôt hétérogène est caractérisé par un phénotype immature (CD34<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> et HLA-DR<sup>-</sup>) et l'absence de marqueurs membranaires associés aux autres cellules immunitaires (précédemment appelées cellule *null*) [46,47]. L'identification de ce type cellulaire est assez récente et les informations sont surtout reliées à leur présence dans les cancers (revue dans [48]). Chez la souris, les MDSC expriment, dans un l'environnement hypoxique de la tumeur, des enzymes immunosuppressives comme l'arginase [49]. Pour la croissance tumorale, les MDSC favorisent la vascularisation du tissu néoplasique et la formation de métastases [50-54]. Ces cellules ont également un rôle dans le contrôle de la réponse immunitaire face aux maladies infectieuses, elles semblent favoriser la croissance des pathogènes, mais en contre partie, elles favorisent également la résolution de l'infection [55-57].

#### MOLÉCULES D'INHIBITION

Les lymphocytes T ont la capacité de s'autoréguler en exprimant des molécules de surface qui réduiront la réponse immunitaire (Figure 3). Plusieurs de ces récepteurs ont la caractéristique d'être exprimés de façon constitutive par les T<sub>reg</sub>. Tout d'abord, le gène activateur des lymphocytes (LAG-3), membre de la superfamille des immunoglobulines, est exprimé sur les T<sub>reg</sub> et les lymphocytes T anergique [58]. Cette molécule se lie au CMH II de



la même façon que la molécule CD4, mais avec une plus forte affinité [59]. Cette interaction a pour conséquence d'inhiber l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> [60]. De plus, la liaison de LAG-3 au CMH II inhibe la maturation des DC [61]. L'expression de LAG-3 sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et son engagement avec le CMH II favorisent également la différenciation en T<sub>reg</sub> [62]. Il est possible d'inhiber cette voie de suppression en utilisant une forme soluble recombinante de LAG-3 dans une thérapie contre le cancer [63,64] ou pour favoriser la vaccination [65,66].

La deuxième interaction de molécules immunosuppressives bien connue est le récepteur de mort cellulaire programmée (PD-1) avec ses ligands de mort cellulaire programmée (PD-L1/2). Cette interaction envoie des signaux inhibiteurs autant dans l'APC que dans le lymphocyte T. PD-1 est exprimé principalement à la surface des lymphocytes T à la suite de leur activation. La persistance de l'antigène induit une forte expression de PD-1 [67]. La queue cytoplasmique de PD-1 contient deux motifs inhibiteur de tyrosine des immunorécepteurs (ITIM) [68]. Ces domaines inhiberont, lors de la liaison de PD-1 à ses ligands PD-L1 et PD-L2, la voie Akt via l'inhibition de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et l'activation de PTEN (*phosphatase and TENsin homolog*). Ceci résultera en une diminution de la production de cytokines, de la prolifération et de la survie du lymphocyte T [69]. L'inhibition de l'axe PD-1/PD-L1 est une voie très prometteuse dans l'amélioration de l'immunothérapie du cancer [70-72]. De plus, sa stimulation a démontré un rôle positif en transplantation pour maintenir une tolérance envers le greffon [73,74].

Finalement, le CTLA-4, molécule homologue au CD28, est capable d'inhiber l'interaction entre le CD28 et les récepteurs CD80 et CD86 grâce à sa très grande affinité pour le CD80/86 [75]. Le CTLA-4 est exprimé à la surface du lymphocyte T et se localise au niveau de la synapse immunologique pour inhiber la réponse [76,77]. En plus d'inhiber les lymphocytes T par compétition pour CD80/CD86, le CTLA-4 possède la capacité d'envoyer un signal négatif afin d'inhiber les phosphorylations associées à la stimulation du TCR [78]. Ceci inhibera plusieurs fonctions comme la production d'IL-2 et la progression du cycle cellulaire [79,80]. Finalement, le CTLA-4 est une molécule importante dans la fonction régulatrice des T<sub>reg</sub>, elle permet d'agir de multiples façons sur les DC pour diminuer leur immunogénicité [79,81]. L'utilisation d'anticorps anti-CTLA-4 est l'une des immunothérapies

importantes dans le traitement du cancer. Plusieurs essais cliniques ont donné des résultats encourageants quant à l'utilisation de l'ipilimumab (anti-CTLA-4) dans différents types de cancers [82-88]. Des essais cliniques de phase 3 montrent une augmentation de la survie lors du traitement du mélanome métastatique et ont permis, en mars 2011, son approbation par la FDA (*food and drug administration*) et un an plus tard par Santé Canada [89].

#### ENZYMES IMMUNOSUPPRESSIVES

La dernière classe de molécules qui contrôlent la suractivation du SI dont je parlerai dans cette introduction est celle des enzymes immunosuppressives. Ces enzymes utilisent des substrats communs dans le microenvironnement pour produire des molécules immunomodulatrices ou pour réduire la disponibilité de facteurs essentiels à la survie et la fonction des lymphocytes T (Figure 3).

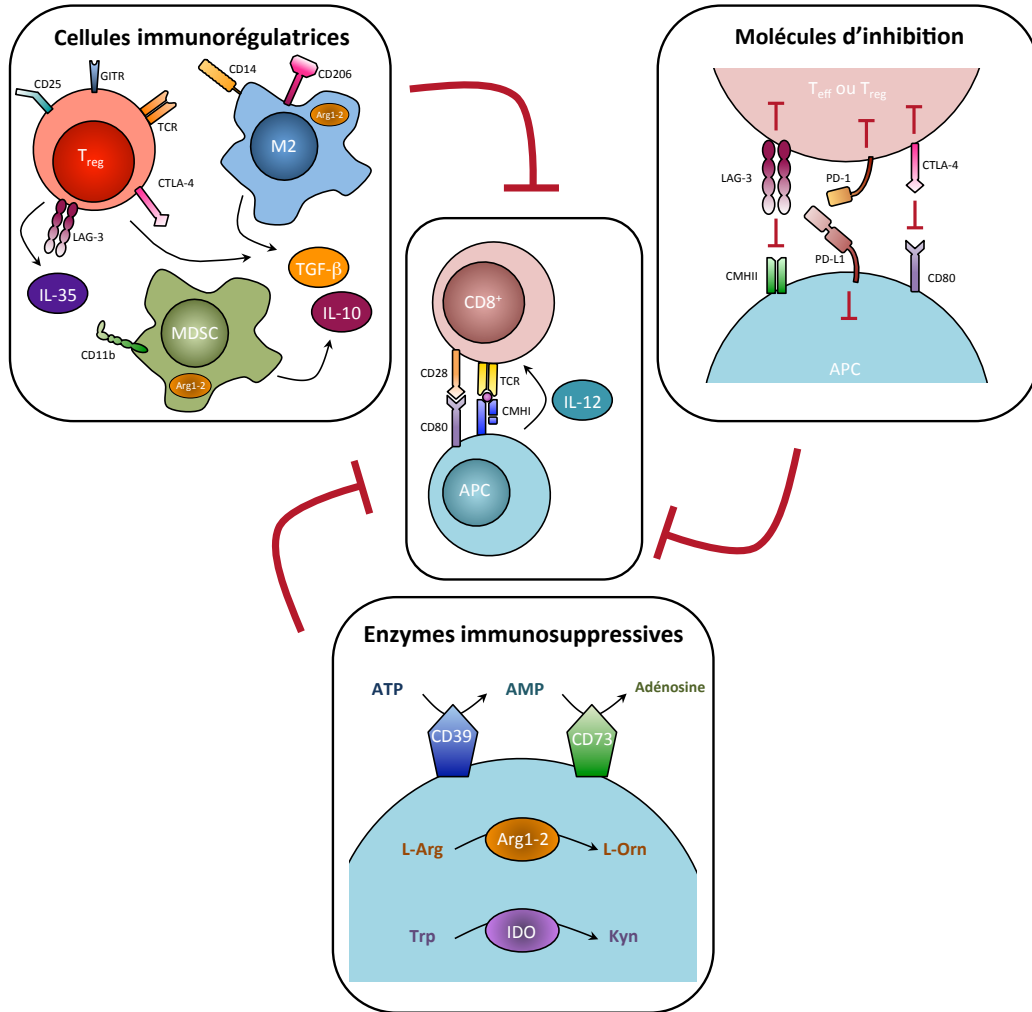
On trouve parmi ces enzymes, les ecto-nucléotidases extracellulaires CD39 et CD73 qui dégradent l'ATP extracellulaire en adénosine. Le relargage d'ATP dans le milieu extracellulaire active l'immunité innée en recrutant des phagocytes [90], activant la voie de l'inflammasome [91] et en stimulant la réparation des tissus [92,93]. CD39 hydrolyse l'ATP extracellulaire en ADP et en AMP, tandis que CD73 transforme l'AMP en adénosine. En plus de réduire la présence d'ATP (molécule pro-inflammatoire), la production d'adénosine agit également directement en tant qu'immunosuppresseur. Ces fonctions médiées par les récepteurs A1, A2A, A2B et A3 sont diverses et agissent autant sur le SI inné qu'adaptatif (revue dans [94]). L'étude de CD73, étant l'enzyme effectuant l'étape limitante de la dégradation de l'ATP en adénosine, est de grand intérêt. Cette enzyme est principalement exprimée sur les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et les leucocytes [95]. De plus, les  $T_{reg}$  semblent spécifiquement utiliser l'hydrolyse de l'ATP comme mécanisme d'immunosuppression [96,97]. Plusieurs types de cancers surexpriment CD73 pouvant ainsi promouvoir un environnement immunosuppresseur qui pourrait être bloqué par des antagonistes des récepteurs ou des anticorps anti-CD73 (revue dans [98,99]). En transplantation, des agonistes des récepteurs d'adénosine pourraient faciliter l'implantation du greffon [100].

Le deuxième type d'enzymes immunosuppressives dégrade les acides aminés pour réduire leur disponibilité pour la fonction des leucocytes. Tout d'abord, l'arginase est donc l'enzyme intracellulaire catabolisant l'arginase en ornithine et en urée. Les fonctions immunosuppressives de l'arginase ont été découvertes dès les années 1970 en utilisant des macrophages péritonéaux [101]. La diminution de l'arginine dans le microenvironnement affecte la formation de l'oxyde nitrique (NO) par la synthase de NO inductible (iNOS) exprimé par les macrophages inflammatoires. Il y a donc une balance entre la production de NO et la présence d'arginase comme mécanisme de régulation [102]. L'arginase est principalement exprimée par les macrophages à la suite d'une stimulation de type Th2 [103]. De plus, la production d'ornithine, métabolite de l'arginase, permet la réparation tissulaire dépendante des polyamines et de la proline menant respectivement à la prolifération et la formation de collagène [104]. Finalement, la présence d'arginase dans les TAM et les MDSC est associée à un mauvais pronostic dans plusieurs cancers [105,106].

L'indoleamine 2-3-dioxygénase (IDO) est également une enzyme immunosuppressive dégradant un acide aminé essentiel, le tryptophane. IDO a été tout d'abord identifiée dans l'environnement placentaire. À ce niveau, cette enzyme permet de protéger le fœtus contre le rejet par le SI de la mère [107]. Cette enzyme en dégradant le tryptophane environnant produit des métabolites dont la kynurénine ce qui inhibe les lymphocytes T [108]. Cette enzyme semble aussi faire partie du SI innée en affectant la croissance de microorganismes intra- et extracellulaires [109]. Par contre, les lymphocytes T sont particulièrement sensibles à cette baisse de tryptophane. La kinase de stress GCN2 (*general control nondepressible 2*) détecte l'augmentation d'ARN transporteur (ANRt) non-chargé par le tryptophane. Lorsque ce senseur moléculaire est activé dans les lymphocytes T, il y a arrêt du cycle cellulaire et anergie, limitant ainsi la réponse immunitaire [110] (Figure 7).

L'implication de l'IDO a été associée à la transplantation d'organes solides et de moelle osseuse [111-113] où elle permet l'induction de tolérance envers l'organe ou les cellules transplantés. Plusieurs tumeurs utilisent l'expression d'IDO comme mécanisme d'évasion à la réponse immunitaire anti-tumorale (Annexe I). De plus, même si le catabolisme du tryptophane semble limiter la croissance de certains microorganismes, des virus comme le

VIH exploitent ce mécanisme pour limiter la réponse antivirale [114,115]. Il est donc essentiel de bloquer cette voie pour favoriser une réponse immunitaire plus efficace.



**Figure 3** Autorégulation du système immunitaire

L'activation de l'immunité cellulaire peut être contrôlée et réduite par (1) les cellules immunorégulatrices, (2) la présence de récepteurs membranaires immunorégulateurs et (3) l'activité d'enzymes immunosuppressives. **GITR** : glucocorticoid-induced TNFR family related gene, **TGF-β** : transforming growth factor-beta, **IL-10/12/35** : interleukine-10/12, **T<sub>eff</sub>** : lymphocytes T effecteurs, **T<sub>reg</sub>** : lymphocytes T régulateurs, **MDSC** : myeloid-derived suppressor cells, **LAG-3** : lymphocyte activator gene-3, **PD-1** : programmed cell death receptor-1, **PD-L1/2** : programmed cell death ligand-1/2, **CTLA-4** : cytotoxic T lymphocyte antigen-4, **TCR** : T cell receptor, **CMH I** : complexe majeur d'histocompatibilité I, **ATP** : adénosine triphosphate, **ADP** : adénosine diphosphate, **AMP** : adénosine monophosphate, **L-Arg** : L-arginine, **L-Orn** : L-ornithine, **Arg1-2** : arginase 1-2, **Trp** : tryptophane, **Kyn** : kynurénine, **IDO** : indoleamine 2-3 dioxygénase.

### *Historique du contrôle de l'immunomodulation*

Ce qui a été présenté précédemment nous permet d'apprécier la complexité du SI. Depuis plusieurs décennies, nous tentons de mieux comprendre ce système pour utiliser différentes thérapies favorisant la protection contre des maladies infectieuses, mais aussi nous protéger ou guérir du cancer. Dans la section suivante « **Vaccination** », je parlerai plus en profondeur des différents types de vaccins qui ont été développés à travers le temps.

En 2013, l'immunothérapie du cancer a été choisie comme avancée scientifique de l'année par la prestigieuse revue *Science* [116]. Ceci nous rappelle que nous sommes à un tournant de l'histoire pour le développement de cette thérapie. La théorie émise par Burnet et Thomas dans les années 1950 sur l'immunosurveillance des cellules transformées par le système immunitaire a ouvert la porte à cette nouvelle forme de thérapie [117]. Plus tard, le groupe du Dr Schreiber a mis en évidence que malgré l'immunosurveillance perpétuelle, les cellules néoplasiques finissaient par être capable d'échapper à ce contrôle (la théorie de l'*immunoediting*) [118]. Au cours des années, il y a eu tout d'abord le développement de thérapie non-spécifique et systémique pour activer le système immunitaire afin de tenter de surpasser l'immunosuppression de la tumeur. Par exemple, l'utilisation de cytokine comme l'IFN- $\alpha$  dans le traitement du mélanome augmente la réponse anti-tumorale [119].

De plus, le développement des anticorps synthétiques permettra de cibler directement des antigènes tumoraux. La première grande réussite de ce côté fut donc avec l'Herceptin (anti-Her2) qui a démontré de bons résultats pour le traitement du cancer du sein (revue dans [120]). Des études tentent maintenant d'étendre son utilisation au cancer de l'ovaire et de l'utérus [121]. Aujourd'hui, l'utilisation d'anticorps en immunothérapie du cancer est omniprésente. La grande réussite de l'ipilimumab (anti-CTLA-4) imaginé et prouvé dans un modèle murin par Dr. James Allison en 1996 [122] a ouvert la porte aux autres protéines importantes dans le contrôle de la réponse immunitaire (PD-1/PD-L1, LAG-3, etc.) [123].

Finalement, en médecine personnalisée, nous utilisons maintenant la thérapie cellulaire pour traiter le cancer. Des essais cliniques de transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques ou de cellules présentatrices d'antigènes modifiées nous démontrent qu'il est bel et bien

possible de contrôler le développement tumoral à l'aide du système immunitaire (revue dans [124]).

Dans les prochaines sections, je parlerai plus précisément des différentes formes de vaccination pouvant activer l'immunité cellulaire et j'aborderai ensuite un mécanisme précis de régulation, l'IDO, qui est une importante cible en immunothérapie du cancer afin d'induire une réponse anti-tumorale efficace.

## **Vaccination**

La vaccination a été développée au 19<sup>e</sup> siècle grâce aux travaux d'Edward Jenner et de Louis Pasteur [125]. L'utilisation de virus atténués ou inactivés a permis d'enrayer ou de diminuer grandement la mortalité associée aux maladies infectieuses comme la variole, la rougeole et la poliomyélite [126]. La découverte du SI adaptatif a permis de comprendre comment l'utilisation de virus atténués permet d'induire une première réponse immunitaire qui engendre une mémoire immunologique protectrice lors de la rencontre ultérieure avec le virus infectieux [127].

Malgré l'apport significatif des vaccins à la santé des populations, le développement de vaccins est ardu pour certains types d'infection. Par exemple, le virus d'influenza avec ses mutations fréquentes, nous oblige à vacciner annuellement la population pour contrer les changements dans les épitopes des protéines de surface. De plus, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est un autre grand fléau, autant dans les pays industrialisés que dans les pays en développement. Nous n'avons toujours pas mis au point une stratégie de vaccination suffisamment protectrice ou curative pour protéger les populations à risque contre cette infection qui attaque directement notre SI [128]. Il existe plusieurs types de vaccination qui sont présentement utilisés en clinique, au stade de développement pharmaceutique ou tout simplement en test pré-clinique dans des modèles animaux. La Figure 5 fait un survol non-exhaustif des formes de vaccination, avec un ou plusieurs exemples dans chaque catégorie.

### *Stratégies de vaccination à médiation cellulaire*

Une approche qui semble avoir un bon potentiel est l'induction d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Contrairement à l'immunité humorale qui protège uniquement lorsque le virus est libre en circulation, l'immunité cellulaire permet de contrôler le bassin de l'infection en reconnaissant et en tuant les cellules infectées. De plus, en immunothérapie du cancer, le déclenchement de la réponse cellulaire implique une réponse cytotoxique contre les cellules tumorales qui expriment des antigènes tumoraux, qui sont spécifiques au cancer [129].

Il existe plusieurs types de vaccination qui peuvent induire une réponse adaptative cellulaire. La première forme décrite est tout simplement l'injection de virus atténués qui, par leur faible capacité d'infection et de réplication, pourront générer une réponse des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> lorsque présentés par les quelques cellules infectées [130]. Il n'est pourtant pas possible d'utiliser une version atténuée de tous les virus, certains sont tout simplement trop virulents.

L'identification de séquences peptidiques spécifiques reconnues par le TCR a également permis leur utilisation pour activer les CTL. Étant donné que les courts peptides n'ont pas une longue demi-vie *in vivo*, il est nécessaire de jumeler plusieurs épitopes (polypeptides) ou de modifier les acides aminés afin de leur conférer une meilleure stabilité et augmenter leur caractère immunogénique [131-133] (Figure 4; Peptides). Le choix de l'adjuvant approprié reste crucial, car les peptides en soi ne possèdent pas toujours une immunogénicité satisfaisante [133,134].

Une autre façon d'activer des CTL consiste en l'utilisation des vecteurs adénoviraux ou autres modes de transport pour insérer de l'ADN viral dans les APC et ainsi leur permettre de présenter des antigènes ciblés par CMH I [135-137] (Figure 4; ADN). L'insertion de gènes peut également permettre d'injecter de l'ARN interférant (ARNi) dans le but de stimuler l'activation des DC [138], de contrôler l'infection par le VIH en diminuant DC-SIGN (*DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*), récepteur important dans son internalisation [139], ou de réduire la gravité de certaines hépatites [140] (Figure 4; ARNi). L'utilisation d'acides nucléiques pouvant s'insérer dans le génome peut par contre avoir des effets secondaires non-prévisibles et difficiles à renverser. Des chercheurs ont

également proposé d'utiliser directement de l'ARN messager (ARNm) codant pour un antigène d'intérêt. L'injection directe d'ARNm nu dans les ganglions lymphatiques a permis d'induire une immunité cellulaire dans un modèle pré-clinique d'infection virale et de développement tumoral [141]. La stabilité de ces ARNm nu peut être accrue en ajoutant des protéines chaperonnes artificielles [142]. Des essais cliniques utilisant des ARNm nus ou protégés par la protamine pour le traitement de mélanomes métastatiques donnent des résultats encourageants [143,144] (Figure 4; ARN).

La stratégie la plus directe pour stimuler la réponse cellulaire est probablement la vaccination cellulaire. Il est donc possible d'utiliser directement des APC autologues chargés de façon exogène et de les réinjecter aux patients [145,146]. Provenge<sup>®</sup> ou sipuleucel-T est un vaccin formé d'APC autologues du patient chargées avec une protéine de fusion contenant la phosphatase de l'acide prostatique (PAP) et le GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) [147]. Cette thérapie est maintenant approuvée par la FDA (Figure 4; APC). Le GVAX<sup>®</sup> est présentement en essai clinique pour le traitement du cancer de la prostate et consiste en une combinaison de deux lignées de cancer allogéniques de la prostate modifiées génétiquement pour exprimer le GM-CSF et pouvant ainsi stimuler les CTL à reconnaître les antigènes caractéristiques du cancer de la prostate [148,149] (Figure 4; tumeur). Finalement, le transfert adoptif de CTL excisés de la tumeur et multipliés *in vitro* permet le traitement du mélanome métastatique avec une bonne efficacité [150] (Figure 4; transfert adoptif). Des recherches tentent maintenant d'étendre cette stratégie à d'autres types de cancers [151]. Dans la prochaine section, je décrirai un autre genre de vaccination pouvant induire une réponse cellulaire, mais de façon plus sécuritaire, plus immunogénique, sans présence d'ADN imprévisible, économique et facile à produire à grande échelle.

### *Particules pseudo-virales (VLP)*

Les VLP font partie de la grande famille des nanoparticules vaccinales. Cette famille inclut aussi les liposomes, les dendrimères et les micelles. Toutes ces structures particulières ont été décrites pour leur capacité à stimuler le SI ou induire une tolérance (revue dans [152]). Des VLP sont donc des particules similaires aux virus, mais sans leur bagage génétique et ne



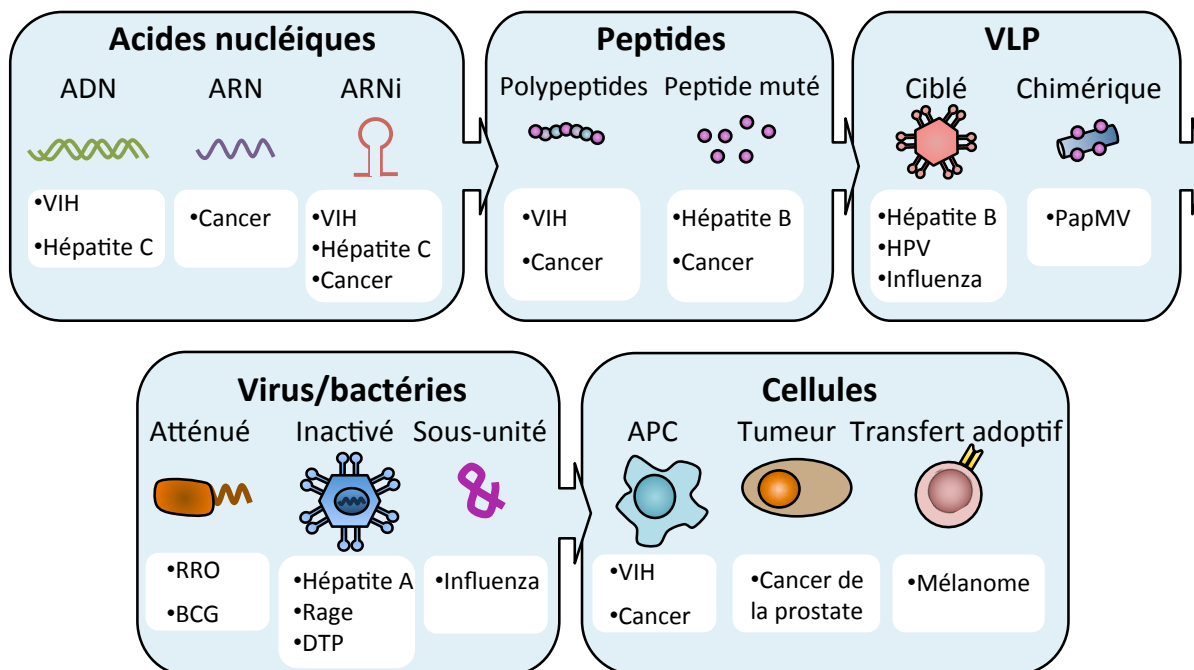
possédant donc pas la capacité d'infection active. Les VLP peuvent être composées d'une seule protéine s'auto-assemblant en particule ou d'un assemblage plus complexe composé de plusieurs protéines du virus pouvant même posséder des phospholipides pour les virus enveloppés. Il est également possible de modifier une ou plusieurs protéines de surface pour intégrer un épitope d'un virus hétérologue ou d'un antigène tumoral (revue dans [153]). Les meilleurs exemples de réussite pour l'utilisation de VLP en vaccination sont les vaccins contre le virus de l'hépatite B (HBV) distribué depuis la fin des années 1980 et contre le virus du papillome humain (HPV) qui prévient le cancer du col de l'utérus et l'apparition de verrue génitale. Les VLP de HBV sont formés de l'antigène recombinant de surface du virus (HBsAg) exprimé dans des levures et assemblé en VLP. Pour leur part, les VLP de HPV sont formés de la protéine L1 de deux ou quatre souches du virus HPV qui ont été impliquées dans la cancérogénèse du cancer du col de l'utérus et l'apparition de verrue [154] (Figure 4; VLP ciblé). Il existe plusieurs autres VLP en évaluation clinique et pré-clinique qui pourront aider la prévention de maladies comme la grippe, l'hépatite C, la malaria ou même le SIDA (revue dans [155]). Dans la prochaine section, je parlerai de VLP stimulant l'activation des CTL et induisant une réponse immunitaire de type cellulaire dans le contexte du virus d'influenza et en immunothérapie du cancer.

#### VLP ET IMMUNITÉ CELLULAIRE

Le virus d'influenza est un bon candidat pour le développement d'un vaccin induisant une immunité cellulaire. Plusieurs VLP ont été conçues pour cibler une réponse humorale contre certaines régions de protéines qui semblent moins variables dont la tige de l'hémagglutinine (HA), la portion extracellulaire de la protéine M2 ou la neuraminidase (NA) (revue dans [156]). Par contre, d'autres stratégies tentent plutôt d'induire une réponse à médiation cellulaire en ciblant par exemple la protéine M1 qui est très conservée entre les différentes souches de virus [157]. L'exemple le plus commun est l'utilisation de l'épitope immunodominant présenté par HLA-A2 (séquence : GILGFVFTL). L'insertion de cet épitope dans une VLP formée du polyomavirus simien 40 (SV40) permet d'induire une réponse protectrice contre l'influenza dans des souris humanisées [158]. De plus, le même épitope

inséré dans une VLP formée de HBsAg induit une réponse cellulaire dans un modèle de souris exprimant HLA-A2 [159]. Les VLP formées de HBsAg ont la capacité d'être présentées par les DC *in vivo*, ce qui explique leur capacité d'induire une réponse cellulaire [160].

L'induction d'immunité cellulaire en immunothérapie du cancer est d'autant plus importante car les vaccins doivent être utilisés non pas en prophylaxie, mais doivent être curatifs. Il est donc important d'induire des CTL efficaces pour reconnaître et tuer la tumeur. Les VLP peuvent être utilisées pour induire cette réponse. Par exemple, l'insertion du peptide SIINFEKL de l'ovalbumine (OVA) dans des VLP du virus de la maladie hémorragique du lapin (RHDV) induit une réponse immunitaire contre une tumeur exprimant OVA [161]. Chez l'humain, un essai clinique de phase IIa a montré l'induction de lymphocytes T spécifiques à MART-1 (*melanoma antigen recognized by T cells 1*), antigène du mélanome, à la suite de l'injection chez des patients atteints du mélanome de nanoparticules pseudo-virales contenant cet antigène [162].



**Figure 4** Différentes plateformes vaccinales : des acides nucléiques aux cellules

Schématisation des différentes stratégies de vaccination pouvant aller de l'élément le plus simple, acides nucléiques, peptides ou protéines au agencement complexe comme des pathogènes ou même des vaccinations à base de cellules. Les maladies présentés dans les carrés blancs représentent des exemples pour chacune des plateformes vaccinales **ADN** : acide désoxyribonucléique; **APC** : cellules présentatrices d'antigène. **ARN** : acide ribonucléique; **ARNi** : ARN interférant; **BCG** : Bacille Camille Guénette; **DTP** : diphtérie-tétanos-poliomyélite; **HPV** : virus du papillome humain; **RRO** : rougeole-rubéole-oreillons; **VIH** : virus d'immunodéficience humaine. **Référence** Acides nucléiques [135,137-142,163,164]; Peptides [132,133,165-167]; VLP [154,156,168-172]; Virus/bactéries [173-177]; Cellules [145,146,148-150].

#### MODÈLE D'ÉTUDE : *PAPAYA MOSAIC VIRUS* (PAPMV)

L'utilisation de protéines de virus de plante pour formés des VLP est très répandue dans la littérature [178-180]. Les virus de plante permettent d'éviter toutes formes de risques d'infection chez l'humain et rend la production plus facile. Dans notre laboratoire, nous nous sommes concentrés sur un virus de la famille des potexvirus infectant la plante produisant la papaye (PapMV). Les VLP de PapMV ont été identifiées comme étant de bons adjuvants à la vaccination. Tout d'abord, sa forme multimérique permet l'induction d'une bonne réponse immunitaire tel qu'observé contre le virus de l'hépatite C lorsque la VLP est fusionné à un

épitope de ce virus [170]. L'ajout de VLP de PapMV améliore la réponse contre le virus trivalent de la grippe [181]. Ces particules ont une grande affinité pour plusieurs antigènes dont les spores de *Plasmodium brassicae* [182] ou le vaccin saisonnier trivalent contre l'influenza [183]. En modifiant son avidité d'interaction avec le virus d'influenza, la fonction adjuvante des VLP de PapMV est encore plus importante [183]. De plus, la vaporisation de PapMV dans les poumons de souris permet l'induction locale de l'immunité innée et une protection contre des pathogènes aériens [184]. Finalement, les VLP de PapMV stimulent précisément l'activité du récepteur TLR7 augmentant ainsi la réponse immunitaire cellulaire et permettant une protection contre la *Listeria monocytogenes* [185]. Cette reconnaissance par le SI comme un signal de danger permet également l'amélioration de la réponse humorale [186].

Le laboratoire de notre collaborateur, Denis Leclerc, a élaboré des nanoparticules de PapMV chimériques pouvant présenter directement à leur surface des épitopes reconnus par des anticorps [170] ou des épitopes pouvant être présentés par CMH I de façon croisée [169,171,172]. Plusieurs sites de fusion d'épitopes ont été identifiés dans la structure de la protéine de surface (*coat protein*) permettant ainsi l'introduction de multiples épitopes différents [187]. Les épitopes insérés dans la structure de la VLP sont présentés de façon croisée indépendamment du protéasome [172] et permettent l'induction *in vivo* d'une immunité cellulaire protectrice [171]. Dans la section suivante, je décrirai plus en détails la présentation antigénique croisée pour exposer ensuite les résultats obtenus dans l'étude du mécanisme de présentation de PapMV.

Dans les travaux de cette thèse, je présenterai également une VLP composée de la protéine de surface du virus de la mosaïque de la Malva (MaMV). Ce virus filamenteux identifié en 2008 possède des propriétés similaires aux autres virus de la famille de potexvirus [188]. La VLP de MaMV a été utilisée pour former un vaccin contre l'influenza chez le chien en ajoutant l'épitope conservé extracellulaire de la protéine M2 [189]. Durant mon doctorat, j'ai, pour la première fois, étudié la présentation croisée médiée par la VLP formée de ce virus (Chapitre 1).

## Présentation antigénique croisée par CMH I

### *Description des voies de présentation*

La présentation antigénique classique par CMH I est une voie de présentation ubiquitaire. Brièvement, la majorité des protéines endogènes sont dégradées par le protéasome et les peptides formés par cette dégradation sont transportés dans le ER pour être chargés sur les molécules de CMH I. Plusieurs chaperonnes et molécules accessoires sont nécessaires dans ce processus (revue dans [190,191]). Dans le cadre de cette thèse, je m'attarderai plus spécifiquement aux mécanismes de présentation antigénique croisée. Ce type de présentation a été décrit pour la première fois en 1976 par Michael J Bevan dans un contexte de transplantation allogénique [192]. Ce mécanisme consiste donc en la présentation d'épitopes dérivés des protéines exogènes (extracellulaires) sur le CMH I. Nous savons maintenant que la présentation croisée est effectuée par les APC. Les mécanismes de présentation croisée ont été principalement étudiés dans les DC, plus spécifiquement les DC CD8 $\alpha^+$  et les DC CD103 $^+$  [193-196]. Par contre, nos recherches précédentes démontrent que les lymphocytes B activés au CD40L (CD40B) possèdent pleinement la capacité de présenter des protéines exogènes par le CMH I [172]. De plus, d'autres groupes ont étudiés autant *in vitro* que *in vivo* la capacité de présentation croisée des lymphocytes B [197-199]. La présentation antigénique croisée par le CMH I permet aux APC d'activer les CTL contre des antigènes de virus qui ne les ont pas infectées ou contre des antigènes tumoraux. En faisant un retour sur les différentes formes de présentation croisée décrites dans la littérature, nous pouvons les classer en deux catégories distinctes, la voie cytosolique et la voie vacuolaire (Figure 5).

### VOIE CYTOSOLIQUE

La voie de présentation croisée cytosolique est la plus fréquemment décrite dans la littérature. Des expériences ont permis de mettre en évidence les mécanismes menant à cette présentation croisée. Par exemple, les billes de polystyrène enrobées de la protéine OVA sont des antigènes qui sont classiquement présentés par la voie cytosolique [200]. C'est-à-dire que l'antigène après son endocytose dans l'APC atteint le cytoplasme et est dégradé par le

protéasome pour libérer les peptides qui seront apprêtés et chargés sur les CMH I après leur transport par le transporteur associé à la présentation antigénique (TAP) dans le ER. Après la sortie de l'antigène dans le cytoplasme, cette voie est très similaire à la présentation classique par CMH I.

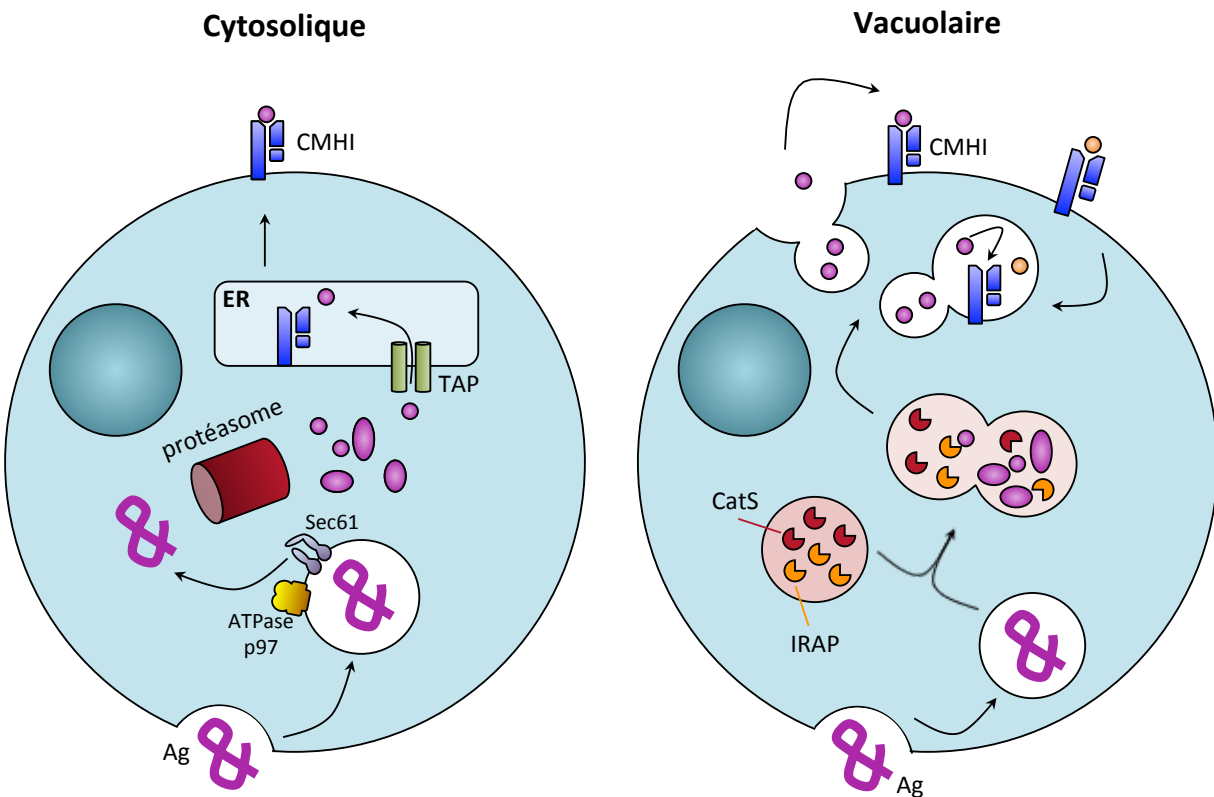
Le mode de transport des antigènes à travers la membrane endosomale reste encore une source de questionnement. Plusieurs hypothèses ont été décrites. Tout d'abord, il semble que lors de la phagocytose, le ER pourrait fournir des segments de membrane aux phagosomes [201-203]. Ceci permettrait de localiser la machinerie du complexe de dégradation associé au ER (ERAD) au niveau de l'endosome. Il a été présenté tout d'abord que, pour être transférées, les protéines devaient être dépliées, donc l'inhibition de GILT (*γ-interferon-inducible lysosomal thiol reductase*) menant à la réduction des ponts disulfures réduit la présentation croisée cytosolique [204]. Par la suite, il a fallu identifier le transporteur que les protéines utilisaient pour se retrouver dans le cytoplasme. Le pore protéique, Sec61, appartenant au complexe du ERAD, fut proposé pour cette fonction. Son inhibition chimique ou sa réduction par ARNi diminue la présentation croisée cytosolique [205-207]. Finalement, l'ATPase p97 semble fournir l'énergie nécessaire pour cette translocation, car l'ajout de cette protéine reconstitue la sortie des antigènes à partir de phagosome isolé [205].

Une fois la protéine dans le cytoplasme, celle-ci peut être dégradée par la voie protéasomale classique. Des études ont montré la concentration importante de protéasome près de la membrane phagosomale [203]. De plus, certaines études proposent que le phagosome ayant acquis les propriétés du ER pourrait permettre le chargement direct des peptides produits par le protéasome à proximité dans les phagosomes pour rapidement présenter des complexes CMH I-peptide à la surface de la cellule [208,209]. Bien sûr, ces résultats n'excluent pas le fait que les antigènes dans la voie de présentation croisée cytosolique emprunte TAP directement dans le ER et la voie de chargement classique sur le CMH I, nécessitant le transport dans l'appareil de golgi.

## VOIE VACUOLAIRE

Dans la présentation croisée par CMH I dite vacuolaire, l'antigène emprunte uniquement la voie endo-lysosomale pour être apprêté et chargé sur le CMH I. Cette voie est moins bien décrite dans la littérature, mais certaines études décrivent une voie purement lysosomale. Cette voie de présentation n'est pas affectée par des inhibiteurs du protéasome ou la déficience en TAP [210]. La recherche de l'identification de la protéase impliquée dans la dégradation du peptide a permis d'identifier la cathepsine S comme candidate potentielle [211]. D'autres protéases semblent être impliquées dans la production de ligand pouvant s'associer au CMH I dans le compartiment endosomal. Par exemple, l'aminopeptidase régulée par l'insuline (*insulin-regulated aminopeptidase*; IRAP) [212,213] colocalise avec le CMH I après l'endocytose d'antigène dans les DC et est capable de générer des octamères ou nonamères compatibles avec la présentation par CMH I [212]. Ensuite, les peptides doivent être chargés sur les CMH I pour être présentés au CTL. Certaines études montrent l'importance des endosomes de recyclage pour le chargement des peptides dans la voie vacuolaire [214,215]. De plus, il a été observé que le chargement pourrait se faire directement à la surface de la cellule par le relargage de vésicules contenant les peptides apprêtés [216].

Il existe plusieurs exemples d'antigènes qui empruntent cette voie vacuolaire. Tout d'abord, des études ont montrés que le virus de l'influenza est présenté par une voie rapide indépendante du protéasome par les pDC [214]. L'activation par le TLR9 peut activer la voie de présentation vacuolaire de l'ovalbumine soluble dans des cellules TAP-déficientes [217]. De plus, l'utilisation de la chaperonne HSP90 (*heat shock protein*) permet également une présentation TAP indépendante sensible aux inhibiteurs de lysosomes [218]. La nucléotidase de *Leishmania major* est aussi présentée par cette même voie [219]. Finalement, une forme non-infectieuse de vaccinia présentant un épitope de la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial (RSV) a été identifié pour emprunter une voie de présentation croisée lysosomale indépendante du transport par TAP [220].



**Figure 5** Présentation antigénique croisée par CMH I

Les deux formes de présentation croisée permettent la capture d'un antigène (**Ag**) exogène pour le chargement de peptide sur le complexe majeur d'histocompatibilité (**CMH**) I. À gauche, la présentation de type cytosolique permet le transfert de l'Ag dans le cytoplasme où il pourra être dégradé par le protéasome et chargé par la voie classique de présentation par CMH I. À droite, la voie vacuolaire conserve l'Ag dans le compartiment endosomal et digère la protéine avec des enzymes comme la cathepsine S (**CatS**) ou **IRAP** (*insulin-regulated aminopeptidase*). Les peptides produits sont ensuite dirigés vers les endosomes de recyclage ou directement relâchés à la surface pour permettre le chargement sur CMH I. **ER** : réticulum endoplasmique, **TAP** : *transporter associated with antigen presentation*

### *Implication de l'autophagie*

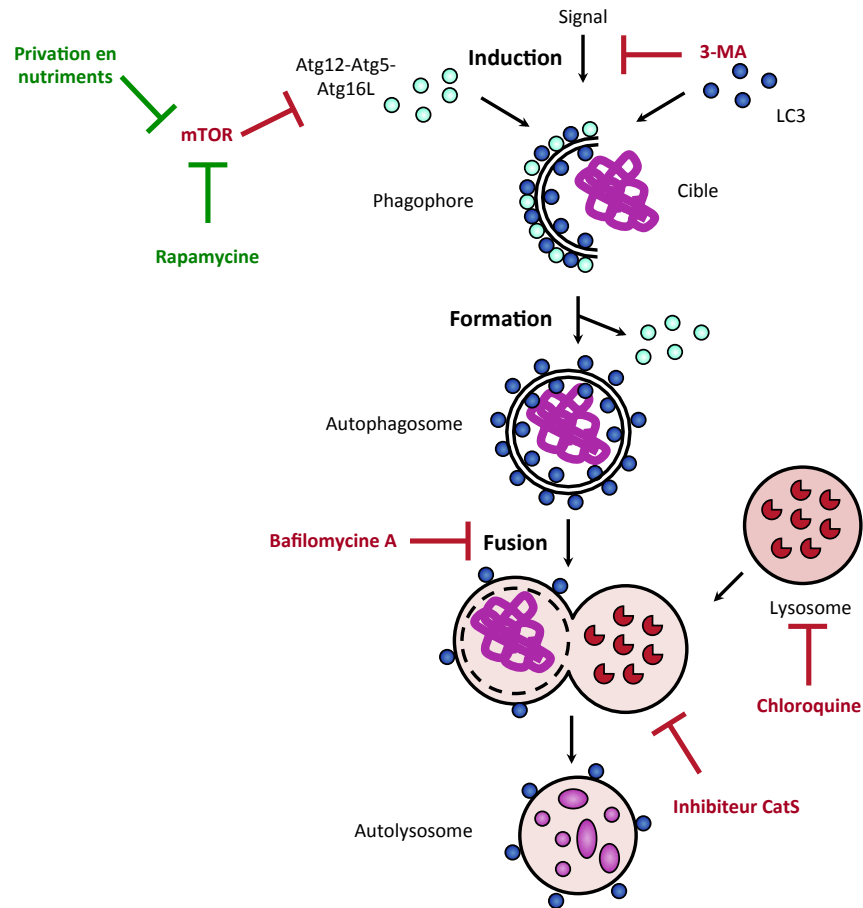
L'autophagie est un processus cellulaire déclenché dans la quasi-totalité des cellules lors d'une privation en nutriments ou d'un autre signal de stress. La résultante principale de cette voie de digestion « phagie » du soi « auto » est la dégradation de protéines et organelles endommagées pour le recyclage des éléments de bases, tels les acides aminés, les bases azotés et les lipides. La Figure 6 présente les différentes étapes de la macroautophagie,



ultérieurement appelé autophagie pour alléger le texte. Tout d'abord, les signaux menant à l'activation de l'autophagie sont multiples, classiquement, la privation en nutriments permet l'inhibition de la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*), régulateur négatif majeur de la voie autophagique (revue dans [221]). L'induction de l'autophagie est médiée par le complexe ULK1 (*UNC-51-like kinase*) qui est directement inhibé par mTORC1. La nucléation forme ensuite un segment de membrane grâce au complexe PI3K classe III composée des molécules Vps34, Atg14L, p150 et Beclin-1 qui est inhibé par le 3-méthyladénine (3-MA) [222]. L'élongation du phagophore en autophagosome est dépendante de deux réactions semblables à l'ubiquitination. La première réaction conjugue Atg12 et Atg5 ensemble grâce à l'action d'Atg7 et Atg10. Par la suite, le complexe Atg12/5 se liera à Atg16L pour permettre la deuxième réaction de liaison de LC3 (homologue d'Atg8) à la phosphatidyl-éthanolamine (PE) avec l'aide d'Atg7 et Atg3 [223,224]. Une fois l'autophagosome formé, il fusionnera ensuite avec le compartiment lysosomal pour permettre la dégradation de son contenu [225,226].

Plusieurs outils sont maintenant à notre disposition pour l'étude de l'autophagie [227]. La technique d'observation de l'induction de l'autophagie la plus fiable est l'utilisation de la microscopie électronique où il est possible de photographier les autophagosomes qui possèdent deux membranes ce qui les distinguent des autres structures vésiculaires. Par immunobuvardage de type western, il est possible d'observer la lipidation de LC3 lorsque couplé à l'autophagosome. Pour ce faire, il est important de contrôler convenablement les expériences avec différents inhibiteurs du flux autophagique, car une augmentation de la forme lipidée peut représenter autant une induction d'autophagie que le blocage de la dégradation des autophagosomes. De plus, le marquage de LC3 avec GFP (protéine fluorescente verte) permet l'observation des autophagosomes par microscopie à fluorescence. Finalement, l'utilisation de différents composés chimiques permet de moduler le flux autophagique à différents niveaux (voir exemples dans la Figure 6) [227]. Grâce à toutes ces techniques d'analyse, la voie autophagique a été très étudiée dans les dernières années et elle semble impliquée dans une variété de processus cellulaires en plus de la survie. Plus précisément, dans les cellules immunitaires, l'autophagie a été associée à une myriade de fonctions, dont le maintien de l'homéostasie, mais aussi à une participation dans l'induction de

la réponse aux pathogènes. (revue dans [228,229]). Je m'attarderai particulièrement sur les pistes d'informations qui décrivent un rôle de l'autophagie dans la présentation antigénique.



**Figure 6** Voie autophagique et ses inhibiteurs

Un signal active l'induction médié par l'activation du complexe de la PI3 kinase de classe III comprenant beclin-1. La première réaction de liaison du complexe Atg5-Atg12-Atg16L qui forme un E3-like ubiquitine ligase qui permet la liaison de LC3 à la PE à la surface membranaire pour activer la formation d'un phagophore. Ce phagophore englobera des agrégats protéiques ou organelles défectueuses. L'autophagosome fusionnera ensuite avec un lysosome pour la dégradation de son contenu. Il est possible d'inhiber la formation de l'autophagosome avec le **3-MA** qui inhibe la PI3 kinase de classe III. La **chloroquine**, inhibe l'acidification des lysosomes alors que l'inhibiteur de la cathepsine S affecte spécifiquement cette protéase. Finalement la **bafilomycine A** inhibe la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes. Il est également possible d'induire l'autophagie en utilisant la **rapamycine** ou la **privation en nutriments** pour inhiber **mTOR** (*mammalian target of rapamycin*).

## PRÉSENTATION PAR LE CMH II

Tout d'abord, l'implication de l'autophagie dans la présentation antigénique par le CMH II lors de la sélection des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans le thymus a été démontrée [230]. Les cellules épithéliales du thymus présentent le plus haut niveau d'autophagie homéostatique comparativement à toutes les autres cellules du corps [231]. De plus, l'utilisation de souris déficientes en autophagie (ATG5<sup>-/-</sup>) spécifiquement dans les cellules épithéliales thymiques, montre que ce phénomène est essentiel au développement de la tolérance centrale et à la régulation du répertoire des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> [232]. Dans ce contexte, l'autophagie permet de transporter les protéines endogènes au compartiment vacuolaire pour être présentées par le CMH II et permettre la délétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qui sont spécifiques aux protéines du soi. Plus globalement, en observant les protéines qui étaient présentées sur les CMH II, il a été découvert que jusqu'à 20 % provenait de protéines cytoplasmiques ou nucléaires [233]. Des études ultérieures ont expliqués que l'autophagie est impliquée dans l'inversion des protéines cytoplasmiques vers le compartiment lysosomal pour le chargement sur le CMH II [228,234-237]. Ce phénomène semble être universel et mène à un flux constant de protéines endogènes vers les compartiments de chargement sur les CMH II dans les APC [229].

## PRÉSENTATION PAR LE CMH I

Dans la présentation antigénique par le CMH I, les évidences de l'implication de l'autophagie sont plus sommaires. Les expériences visant à localiser les antigènes au niveau de l'autophagosome par jumelage avec LC3 n'ont pas permis de démontrer un impact sur la présentation par le CMH I [229]. Par contre, l'autophagie semble être impliquée dans certains contextes particuliers. Tout d'abord, lorsque les cellules tumorales meurent, il y a une augmentation de la présentation croisée des débris cellulaires provenant de cellules activant l'autophagie comparativement à des cellules déficientes en autophagie [238]. Le même phénomène est observé dans les cellules infectées au virus d'influenza, si ces dernières sont déficientes en autophagie, il y a moins de présentation antigénique par le CMH I à la suite de l'endocytose de fragments cellulaires [239]. De plus, des voies parallèles de présentation

croisée par CMH I utilisant l'autophagie ont été décrites. Par exemple, lors d'une infection par le virus simplexe de l'herpès (*herpes simplex virus*; HSV), au stade tardif de l'infection, des voies de présentation dépendante d'ATG5 sont importantes pour la présentation sur le CMH I [240]. Finalement, l'autophagie a été tout récemment impliquée dans une voie de présentation croisée vacuolaire indépendante de TAP. En effet, la protéine pUL138 du cytomégalovirus humain (HCMV) présentée de façon TAP indépendante requiert la présence d'autophagie. [241].

## **Indoleamine 2,3-dioxygénase**

La stratégie visant à bloquer les mécanismes d'auto-régulation pour améliorer la vaccination et la réponse immunitaire a été suggérée dans plusieurs contextes. Tout d'abord, il a été proposé d'administrer des thérapies en parallèle de la vaccination pour activer la présentation antigénique et ainsi favoriser la reconnaissance des cellules infectées ou tumorales par les CTL [242]. En immunothérapie du cancer, une thérapie qui a montré des résultats encourageants consiste au blocage des voies d'inhibition, tel PD-1/PD-L1 et CTLA-4, grâce à des anticorps spécifiques bloquant les interactions avec leur ligands [87,243-246]. Autant dans des modèles murins que dans les essais cliniques de l'ipilimumab (anti-CTLA-4) et de nivolumab (anti-PD-1), le blocage des voies d'auto-régulation et d'épuisement du SI permet de potentialiser la réponse anti-tumorale [247]. Finalement, un autre mécanisme d'évasion important présent dans l'environnement tumoral est la production de l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Annexe I et [248]). Dans la prochaine section, je parlerai plus en détails des stratégies d'inhibition de cette molécule immunosuppressive.

### *Stratégies d'inhibition d'IDO*

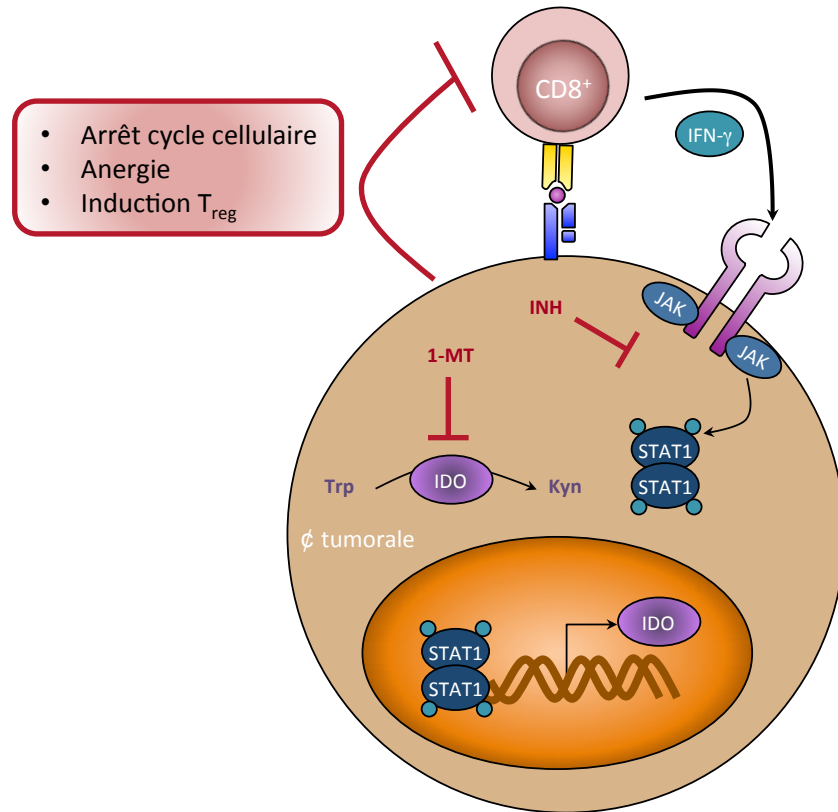
Tout d'abord, il est possible d'altérer l'activité enzymatique d'IDO par des inhibiteurs compétitifs. Le principal inhibiteur enzymatique est un analogue du tryptophane, le 1-méthyltryptophane (1-MT). Des essais cliniques sont présentement en cours pour tester l'indoximod (1-méthyl-D-tryptophan) en combinaison avec des chimiothérapies classiques en

cancer du sein, du pancréas, du mélanome ou tumeur du cerveau métastatique. D'autres essais cliniques tentent aussi de combiner l'indoximod avec le Sipuleucel-T en cancer de la prostate métastatique [249]. Des études pharmacologiques ont permis d'identifier d'autres petites molécules avec une plus grande affinité qui auraient un impact sur l'activité enzymatique d'IDO [250]. Des formes modifiées du 1-MT, les 1-MT-tirapazamines (1-MT-TZP) ont une activité d'inhibition d'IDO *in vitro* non seulement en condition normoxique, mais avec une meilleure efficacité en condition hypoxique [251]. L'utilisation des 1-MT-TZP pourrait être intéressante dans le cas de tumeurs connues pour être hypoxiques, comme le cancer du rein où la composante hypoxique joue un rôle important dans la tumorigénèse, grâce à la protéine HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor-1 alpha*) [252]. Plusieurs petites molécules de la famille du benzylthiourée peuvent inhiber à très faible concentration l'activité enzymatique d'IDO [253,254]. Récemment, un composé phytochimique, le galanal, a montré un effet inhibiteur sur la dégradation du tryptophane par IDO à très faible dose [255]. De plus, une hydrazine (la phenylhydrazine) a également la capacité d'inhiber IDO à faible dose sans toxicité pour la cellule en se fixant à l'hème contenu dans IDO [256].

IDO possède également une fonction immunorégulatrice qui n'est pas dépendante de son activité enzymatique [257,258]. Il serait donc important de ne pas inhiber uniquement le catabolisme du tryptophane, mais aussi l'expression de cette protéine. Tout d'abord, la voie Bin1 pourrait être ciblé puisque la perte du gène suppresseur de tumeur Bin1 augmente l'expression d'IDO [259]. Par contre, aucune stratégie pharmacologique n'a encore été évaluée à ce sujet. L'expression d'IDO est contrôlée dans plusieurs tissus (placenta, transplant, APC ou tumeur) par l'IFN- $\gamma$  [260-262]. Cette cytokine est sécrétée par les lymphocytes T activés. De plus, des cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale (TNF)- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  favorisent l'expression du récepteur à l'IFN- $\gamma$ , augmentant ainsi l'expression d'IDO [263]. L'IFN- $\gamma$  induit la signalisation via son récepteur par la voie JAK-STAT1 menant à la dimérisation de STAT1 dépendante de sa phosphorylation par la kinase Janus (JAK) [264]. Le dimère de STAT1 est transloqué au noyau et peut se fixer à la séquence IFN- $\gamma$  activatrice (GAS) présente en amont de plusieurs gènes dont l'IDO (Figure 7) [265].

Plusieurs composés chimiques ont montré que l'inhibition de la voie JAK/STAT1 affectait négativement l'expression d'IDO. Par exemple, le sodium butyrate inhibe

l'expression de l'IDO dans une lignée de cancer du nasopharynx [266] en altérant la phosphorylation de STAT1 à la tyrosine 701, sa translocation au noyau et la fixation à la région GAS [267]. Au niveau de la régulation génique, un inhibiteur réversible de l'histone désacétylase (HDAC), l'acide hydrozamique subéroylanilide (SAHA), inhibe également l'expression de l'IDO dans des cellules du cancer de la vessie via la voie de signalisation JAK/STAT1 [268]. Des composés naturels possèdent aussi la propriété d'inhiber l'expression de l'IDO. La catéchine, présente dans le thé vert, l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) inhibe l'induction de l'expression d'IDO autant dans les DC murines [269] que dans des cellules humaines de cancers oraux [270]. De plus, un autre groupe de recherche japonais a décrit l'activité de l'EGCG dans des cellules colorectales humaines [271]. Le mécanisme d'action de l'EGCG semble dépendre de la phosphorylation de STAT1. D'autres exemples comme le resvératrol [272], l'acide rosmarinique [273] et le curcuma [274] peuvent également inhiber l'induction de l'expression de l'IDO *in vitro*.



**Figure 7** Activation et mécanismes de suppression de l'IDO

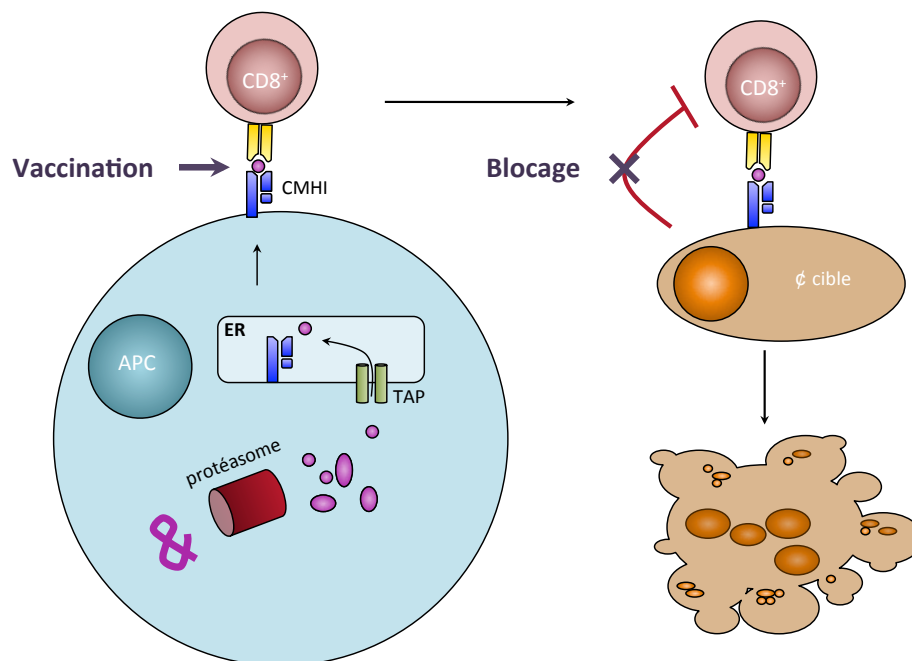
L'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) dans les cellules tumorales peut être induite par la liaison de l'IFN- $\gamma$ . La liaison de cette cytokine à son récepteur engendre la phosphorylation de JAK et par la suite de STAT1. STAT1 phosphorylé forme un dimère qui en se transloquant au noyau pourra activer l'expression de l'IDO. La fonction enzymatique de l'IDO peut être inhibée par de petites molécules dont le 1-méthyltryptophane (1-MT). Nous posons l'hypothèse qu'il est également possible de réduire l'expression de l'IDO en ciblant la voie de signalisation JAK-STAT1. **IFN- $\gamma$**  : interféron-gamma, **JAK** : Janus kinase, **STAT1** : *signal transducers and activators of transcription 1*, **INH** : inhibiteur, **Trp** : tryptophane, **Kyn** : kynurénine.

## Mise en situation et hypothèses de la recherche

### *Mise en contexte de la thèse*

Dans tous les types de traitement impliquant le SI (comme la vaccination et l'immunothérapie du cancer), il est important de tenir compte des mécanismes que le SI peut mettre en place pour contrer une suractivation. De plus, plusieurs pathogènes et les cellules

tumorales exploitent ces mécanismes de régulation pour se protéger contre nos défenses immunitaires qui devraient les éradiquer. Pour manipuler le SI à mieux reconnaître et tuer les cellules infectées ou cancéreuses, il est possible d’agir de deux façons. Tout d’abord, la **vaccination** permet d’aider la génération de CTL effecteurs qui pourront, suivant l’acquisition d’un phénotype mature, effectuer la lyse des cellules exprimant l’antigène inclus dans le vecteur vaccinal. Deuxièmement, il est également possible d’effectuer un **blocage** de l’auto-régulation du SI ou des mécanismes immunosuppresseifs mis en place par la cellule cible pour amplifier la réponse immunitaire à médiation cellulaire (Figure 8).



**Figure 8** Deux stratégies d’action pour stimuler la réponse cellulaire spécifique

Pour induire une réponse cellulaire spécifique, il faut d’abord activer les lymphocytes T CD8+ par l’utilisation d’un vecteur de vaccination menant ultimement à la présentation antigénique par CMH I. De plus, il est nécessaire pour favoriser une réponse cellulaire optimale de bloquer les mécanismes d’immunosuppression mis en place par la cellule tumorale ou la cellule infectée (cible). **CMH I** : complexe majeur d’histocompatibilité, **ER** : réticulum endoplasmique, **APC** : *antigen presenting cell*, **TAP** : *transporter associated with antigen presentation*.



## *Hypothèses de recherche*

Dans les travaux de cette thèse, nous avons voulu étudier ces deux grandes stratégies, la vaccination et le blocage de l'immunosuppression. Pour l'étude de la vaccination, nous avons travaillé avec une nanoparticule virale, les VLP de PapMV. Tout d'abord, nous avons voulu comparer la présentation croisée par le CMH I d'une deuxième VLP, composée cette fois-ci de la protéine de surface de MaMV. Nous pensons que les propriétés de présentation croisée par les VLP de PapMV seront partagées par cet autre virus de la même famille, autant sur le plan de l'internalisation, de l'activation et de l'expansion *in vitro* de lymphocytes T spécifiques. Par la suite, puisque nous avons décrit que l'épitope inséré dans les VLP de PapMV est présenté de façon croisée sur le CMH I indépendamment à l'activité du protéasome [172], nous proposons que la voie de présentation antigénique croisée est de type vacuolaire. De plus, nous proposons que les VLP de PapMV activent la voie autophagique ce qui faciliterait la présentation antigénique par CMH I.

Finalement pour étudier le blocage de l'immunosuppression par l'IDO, nous avons proposé que l'utilisation d'un agent chimiothérapeutique accepté en clinique qui a démontré des effets négatifs *in vitro* sur la phosphorylation de STAT1 pourrait être une stratégie d'inhibition de l'expression de l'IDO. Pour ce faire, nous avons testé l'effet dans des lignées de cancers humains sur l'expression de l'IDO stimulé par l'IFN- $\gamma$ , de la fludarabine, analogue de purine qui a un effet négatif sur la phosphorylation de STAT1 dans les PBMC [275].

## **Objectifs spécifiques de la recherche**

Pour répondre aux hypothèses que nous avons posées, voici les objectifs spécifiques de la recherche de mon doctorat :

- 1. Comparer la présentation croisée par le CMH I de la VLP de MaMV avec celle de la VLP de PapMV**
  - a. Valider l'internalisation dans les APC
  - b. Montrer l'activation et l'induction de la prolifération de lymphocytes T spécifiques

c. Activer l'expansion *in vitro* des lymphocytes T spécifiques à partir de PBMC

**2. Identification du rôle de l'autophagie dans la présentation croisée vacuolaire par le CMH I de l'épitope insérée dans la VLP de PapMV**

a. Confirmer la présentation croisée par la voie vacuolaire

b. Observer l'induction de l'autophagie par PapMV

c. Déterminer le rôle de l'autophagie dans la présentation croisée par CMH I médiée par PapMV

**3. Caractérisation d'un mécanisme d'inhibition de l'induction de l'IDO par l'IFN- $\gamma$**

a. Confirmer l'importance de STAT1 dans l'expression de l'IDO par l'IFN- $\gamma$

b. Inhiber l'expression de l'IDO par la fludarabine (précédemment décrit pour inhiber la phosphorylation de STAT1)

c. Déterminer le mécanisme d'inhibition de l'IDO par la fludarabine; rôle du protéasome

## Chapitre 1 : Comparaison de deux potexvirus

### Two distinct potexviruses share antigenic cross-presentation properties of MHC I epitopes

Vaccine, 2010 Aug 2; 28(34):5617-26.

*L.-A. Hanafi est responsable de la majorité de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article. M. Bolduc, M.-È. Laliberté-Gagné ont apporté une contribution technique pour la production des VLP (Tableau 1 et Figure 1A et 2 du manuscrit). F. Dufour et Y. Langelier ont apporté une contribution technique dans les expériences d'activation de la caspase 8 (Figure 7E du manuscrit). M. R. Boulassel et J.-P. Routy ont contribué à l'obtention des échantillons biologiques (leucaphérèse de donneurs normaux) utilisés pour les travaux de recherche (Tableau 2 et Figure 6 du manuscrit). D. Leclerc a participé à la planification expérimentale et fourni la collaboration nécessaire pour la production des virus PapMV et MaMV chimériques. R. Lapointe a supervisé l'ensemble de l'étude.*

**Title :** TWO DISTINCT CHIMERIC POTEXVIRUSES SHARE ANTIGENIC CROSS-PRESENTATION PROPERTIES OF MHC CLASS I EPITOPES

**Running Title :** Potexviruses share cross-presentation properties

**Authors:** Laïla-Aïcha Hanafi<sup>1</sup>, Marilène Bolduc<sup>2</sup>, Marie-Ève Laliberté Gagné<sup>2</sup>, Florent Dufour<sup>1</sup>, Yves Langelier<sup>1</sup>, Mohammed-Rachid Boulassel<sup>3</sup>, Jean-Pierre Routy<sup>3,4</sup>, Denis Leclerc<sup>2</sup> and Réjean Lapointe<sup>1\*</sup>

**Affiliations:** <sup>1</sup>Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) – Hôpital Notre-Dame, Université de Montréal and Institut du Cancer de Montréal

<sup>2</sup>Centre de recherche en infectiologie, Pavillon Centre hospitalier de l'Université Laval (CHUL), Université Laval

<sup>3</sup>Immunodeficiency Service and Division of Haematology, Royal Victoria Hospital, McGill University Health Center, McGill University

<sup>4</sup>Research Centre, CHUM – Hôpital St-Luc

**Keywords:** potexvirus, cross-presentation, virus-like particles

**Nonstandard abbreviations used:** APC: antigen presenting cells; PapMV: Papaya mosaic virus, MaMV: Malva mosaic virus; CP: coat protein; CD40B: CD40-activated B lymphocytes; VLP: virus-like particles; CTL: cytotoxic T lymphocytes; moDC: monocyte-derived DC

\*Corresponding author: Réjean Lapointe,

## **Abstract**

Chimeric VLPs made of papaya mosaic virus (PapMV) trigger a CTL response through antigenic presentation of epitopes on MHC class I. Here, a chimeric VLP composed of malva mosaic virus (MaMV) was shown to share similar properties. We demonstrated the capacity of both VLPs to enter human APCs. The chimeric constructions were cross-presented in CD40-activated B lymphocytes leading to *in vitro* expansion of antigen-specific T lymphocytes. We showed that high concentrations of chimeric MaMV induced cell death, suggesting that some modifications can trigger collateral effects *in vitro*. Results suggest that potexvirus VLPs are an attractive vaccine platform for inducing a CTL response.

## Introduction

Since the development of the first vaccine against smallpox in the 1790s by Edward Jenner, scientists have explored many roads in order to expand the efficacy of vaccination strategies to various infectious diseases. Inactivated and live attenuated forms of the infectious agents are generally the most common approaches used in vaccination [1]. Interestingly, even if vaccination has been shown to be the most efficient and least costly approach in the control of viral and bacterial diseases, vaccines for some infectious diseases warrant only partial protection due to their weak immunogenicity. Consequently, the main motivation of researchers in this field has become the development of more immunogenic vaccines. The security of vaccines used in prophylaxis is a priority for regulatory authorities [2]. The development of subunit vaccines is promising, considering that live attenuated vaccines can potentially revert or recombine with a circulating pathogenic strain giving rise to agents which can be more lethal. Subunit vaccines are very safe but have often proven less immunogenicity than current vaccines and necessitate the addition of an adjuvant to their formulation to ensure the triggering of a strong immune response. Considering that alum is the only adjuvant on the market in North America, the search for efficient adjuvant and vaccine platform to improve the efficacy of vaccines has become a priority.

The majority of current vaccines triggers only the humoral response thus neglecting the cytotoxic-T-lymphocyte (CTL) response which is an important arm of the immune defence, especially for viral diseases [3]. The ideal vaccine should elicit both arms of the immune system (humoral and CTL) to optimize protection. Infectious pathogens such as human immunodeficiency virus (HIV) and influenza virus have evolved to escape immune surveillance by frequently mutating their extracellular proteins, resulting in the induction of a poor antibody response. It is therefore highly relevant to develop an efficient vaccine that can trigger CTL in order to generate cellular protection against intracellular antigens.

Recently, virus-like particles (VLP) regained interest in the field with the licensing of the first VLP-based vaccine against the L1 protein from the human papillomavirus [4]. Since their structures are similar to those of native viruses, VLPs are strong immunogens and a neutralizing humoral response for influenza has been demonstrated [5]. These particles are composed of structural proteins lacking in the viral genome which appear to trigger efficient humoral response against conformational epitopes in the proteins structure of self-assembled VLPs. Subunit vaccines have showed an excellent safety profile. Engineered VLPs presenting antigenic epitopes

from pathogens at their surface could also be exploited to elicit humoral response against the selected antigen. For example, tomato bushy stunt VLPs displaying the ricin toxin antigen trigger a humoral response against the antigen in absence of response against the platform [6]. PapMV VLPs displaying the influenza M2e antigen previously triggered a protective humoral response in mice submitted to a lethal challenge of influenza virus [7]. Many other plant VLPs have also been designed against HCV [8] and HIV antigens (Reviewed in [9]). The highly ordered structure of VLPs appears to be important for VLP immunogenicity [8].

Some VLPs have also been shown to trigger CTL responses. Those VLPs are captured and presented by APCs by a mechanism identified as major histocompatibility (MHC) class I cross-presentation. This antigenic presentation pathway seems to vary depending on which cell type or VLP is studied. For example, VLPs from parvoviruses follow an endosome-to-cytosol pathway [10]. Also, hepatitis C VLPs use a TAP-dependent or -independent pathway depending on the cell type [11]. Multiple studies have also demonstrated that specific T lymphocytes can become activated following MHC class I cross-presentation. For instance, a chimeric parvovirus VLP carrying foreign epitopes from the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) activates a CTL response in injected mice independent of adjuvant administration [12]. In addition, recombinant hepatitis B surface antigen fused with respiratory syncytial virus (RSV) or human papillomavirus (HPV) epitopes elicited a cellular protective immune response in immunized mice [13].

Based on this concept, we have developed chimerical VLPs derived from plant virus coat proteins, genetically modified to carry epitopes from different viral and tumor antigens [7, 8, 14, 15]. Plant viruses have previously been proven to elicit a humoral response against HIV gp41 epitope expressed on potato virus X [16]. Papaya mosaic virus (PapMV) coat protein (CP) expression in *E. coli* leads to auto-assembly around a positive-strand RNA in a repetitive rod-like structure similar to wild type virus structure [17]. We previously demonstrated that a strong humoral response can be induced by PapMV VLPs fused to hepatitis C virus epitopes. This response seems to be dependent of the multimerization of the CP [8]. Also, PapMV VLPs can trigger an IgG2a humoral response against the M2e peptide of the influenza virus [7]. IgG2a appears to be the classical humoral response induced by VLPs [18, 19]. We subsequently showed that PapMV VLPs induce Th1/Th2 immune responses in mice and protected against LCMV

infection in the absence of adjuvant [14]. In human antigen presenting cells (APCs) *in vitro*, PapMV VLPs containing influenza matrix protein M1 and melanoma antigen gp100 epitopes mediated MHC class I cross-presentation of the inserted peptides, which was proteasome-independent and was efficient in inducing antigen-specific T cell expansion from autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [15].

The PapMV platform therefore appears to be an excellent candidate in eliciting a protective immune response through the induction of both arms of the immune system. However, we attempted to demonstrate that VLPs made from the coat protein of the malva mosaic virus (MaMV), a related but distinct potexvirus, share antigenic cross-presentation properties.



## Materials and Methods

### 2.1 Cloning and engineering of PapMV, MaMV gp100 and M1 constructs

The PapMV, PapMV M1, PapMV gp100 and the MaMV constructs used in this report have been described elsewhere [15, 20]. MaMV was modified by PCR by introduction of the SpeI-MluI restriction sites at its C-terminus which generated the MaMV-SM clone. The primers used for the PCR were respectively 5'-GGTACATGTCGAACTCTGGTTCAGCCG-3' (forward primer) and 5'ACTAGTACCACGCGTCACCATCACCATCACCATAGTAAG-GATCCGGCTGCTAA-3' (reverse primer). The PCR amplification conditions used were: 45s at 94°C, 45s at 65°C and 60 s at 72°C for 33 cycles with a pre-incubation of 3 minutes at 94°C using the Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR system (Roche Diagnostics) under standard conditions recommended by the manufacturer. The final PCR product was cloned as a AflIII-BamHI fragment in the compatible NcoI-BamHI linearized pET 3D as previously described [20]. The MaMV-SM was digested with SpeI and used to clone the following oligonucleotides that were annealed and digested by SpeI (Table 1). The resulting clones, MaMV gp100 and MaMV M1 harbour a fusion of a peptide at their C-termini followed by a six-histidine tag for the purification process. We kept five amino acids on either side of the HLA-A\*0201 epitopes to ensure efficient processing, as in native gp100 and influenza virus M1 proteins (Figure 2). The sequences of the PapMV clones were confirmed by DNA sequencing.

### 2.2 Expression and purification of the PapMV and MaMV constructs from *E. coli*

The same production and purification procedure was used for all the constructs presented in this manuscript. Briefly, *E. coli* strain BL21 (DE3) RIL cells (Invitrogen) was transformed with each construct. Fresh culture medium (2x YT, 50 mg/mL ampicillin) was inoculated from a pre-culture of approximately 10 isolated colonies and grown until an optical density (OD) of 0.6–0.8 was reached. Protein expression was induced by the addition of IPTG (Promega) to a final concentration of 1 mM and the culture was incubated at 22°C for 16h at 225 rpm. The cells were then centrifuged and resuspended in lysis buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole pH 8.0) in presence of 20 mM PMSF (EM Science), 1x protease cocktail inhibitor (Roche) and 1 mg/mL lysozyme (Sigma) before lysis on a French press. The lysate was centrifuged and the supernatant was incubated for 3 h at 4°C in presence of 3 mL of nickel-NTA

agarose beads and transferred to an elution column (Bio Rad). Beads were washed with 25 mL of each of the following buffers: once with washing buffer 1 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 50mM imidazole, pH 8.0); once in washing buffer 2 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0, 0.5% triton X-100); once in washing buffer 1; three times in washing buffer 3 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0 and 1% Zwittergent pH 8) and once in washing buffer 4 (10 mM Tris-HCl, 50 mM imidazole, pH 8.0). Proteins were then incubated for 30 minutes in presence of elution buffer (10 mM Tris-HCl, 1 M imidazole, pH 8.0) and eluted. The eluate was dialysed against 20 volumes of 10mM Tris HCl pH 8.0 for 1 hour, and a second against 20 volumes of new dialysis buffer for an additional 16 hours. The VLPs were isolated following ultracentrifugation through a sucrose cushion. The pellet was resuspended in sterile PBS. Purified proteins were analyzed by SDS-PAGE to confirm purity. The exact proportion of each PapMV form (VLPs vs discs/20mer) was monitored by passing the purified protein through a gel filtration column (Superdex 200) as described previously [21]. The level of LPS in the purified protein was evaluated with the Limulus test according to the manufacturer's instructions (Cambrex). The level of LPS contamination was always inferior to 0.01 endotoxin units (EU)/µg of purified protein.

### **2.3 Cells and reagents**

T2 and KG-1 were obtained from the American Type Culture Collection (Bethesda, MD, USA). T2 cell line was cultured in RPMI 1640 complete medium containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 10 µg/ml gentamicin (all from Wisent). KG-1 cell line was cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (Invitrogen) supplemented with 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 10 µg/ml gentamicin.

T lymphocytes, dendritic cells (DC) and CD40-activated B lymphocytes (CD40B) were cultured in complete medium which is Iscove's modified Dulbecco's medium (Invitrogen) supplemented with 7.5% human serum (heat inactivated, Gemini), 2mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin and 10 µg/mL gentamicin. CD40B were expanded and cultured from PBMCs by the addition of 1000 ng/mL of soluble trimeric CD40L (Immunex Corporation) and 250 U/mL recombinant human interleukin-4 (rIL-4; PeproTech, Rocky Hill, NJ). Monocyte-derived dendritic cells (moDC) were generated from PBMCs of human healthy donors, as

described elsewhere [22]. Briefly, PBMCs were incubated for 2 h at 37°C in RPMI complete medium (Wisent). Non-adherent cells were removed, and fresh medium containing 1000 U/ml human rGM-CSF and 100 ng/ml human rIL-4 was added. Monocytes were differentiated to DCs for seven days, with the addition of GM-CSF and IL-4 every two days.

## **2.4 Electron microscopy**

Proteins were diluted in PBS and were adsorbed for 3 minutes on carbon-coated formvar grids. The grids were washed twice with deionized water and stained with 2% uranyl acetate for 10 minutes at room temperature. The grids were then observed on a JEOL JEM220FS transmission electron microscope. Average VLP length was evaluated by measuring 100 VLPs using the program MetaMorph offline version 6.2r2 (Molecular Devices Corp. Downingtown, PA, USA).

## **2.5 Cross-presentation assays from VLP-pulsed CD40B**

CD40B were analyzed for MHC class I presentation of defined epitopes with gp100- or influenza virus M1-specific T cells. Gp100-specific CD8<sup>+</sup> T cell clones kindly provided by Mark Dudley (National Cancer Institute; NIH, Bethesda, MD) are specific to native and modified version of gp100 HLA-A\*0201-restricted epitope (209-217; ITDQVPFSV and IMDQVPFSV). T cell lines specific to the influenza virus M1-derived HLA-A\*0201-restricted epitope (58-67; GILGFVFTL) were generated as previously described [15].

To evaluate cross-presentation mediated by VLP, CD40B were pulsed with various versions of modified PapMV and MaMV from 5 to 100 µg/mL for 20 h. Cells were harvested, washed twice with PBS, and seeded in complete medium in 96-well plates. Gp100 or influenza virus M1-specific T cells were added at 1:1 ratio for 18 h. Culture supernatants were harvested, and IFN-γ was evaluated by ELISA. T cell proliferation was evaluated by 5-day coculture with VLP-pulsed CD40B. Briefly, M1-specific T cells were labeled with 5 µM of 5-6-carboxyfluorescein diacetate (CFSE; Molecular Probes). T cells were washed twice in PBS and seeded in complete medium in 96-well plates. VLP-pulsed CD40B or peptide-pulsed CD40B or T2 cells were added at 1:2 ratio for 5 days. IL-2 was added at 300 IU/ml at day 1 and 3. Cells

were harvested and T cell proliferation was assessed by flow cytometry with anti-CD8 Pacific Blue (BD biosciences) staining.

## 2.6 T cell expansion

CD40B were pulsed with 25 µg/ml of PapMV or MaMV M1 for 20h. Cells were harvested and washed twice in PBS. Pulsed CD40B ( $2 \times 10^5$ ) were co-cultured with autologous PBMC ( $5 \times 10^5$  cells) in 500 µl of complete media in single wells of a 48-well plate. For peptide stimulation,  $7 \times 10^5$  PBMCs were pulsed with peptide M1 (1mM) in 500 µl of complete media in single wells of a 48-well plate. On day 7, freshly VLP-pulsed CD40B ( $2.5 \times 10^5$ ) for 20h or peptide-pulsed CD40B for 3 h were added to individual cultures. IL-2 was then added at 300 IU/ml every 2 or 3 days. T cell specificity was assessed on day 21 to 24. Briefly expanded cells were co-cultured with peptide-pulsed T2 cells or with VLP-pulsed CD40B. Cytokines secretion was evaluated by ELISA and intracellular cytokine staining (ICS).

## 2.7 ELISA

Supernatants were harvested and tested for the presence of secreted IFN-γ by ELISA, as previously described [23]. Briefly, *MaxiSorp* flat-bottom 96-well plates (Nalge Nunc International) were incubated overnight at 4°C with an anti-IFN-γ mAb (0.4 µg/ml; Pierce Endogen). Plates were washed with PBS/0.5% Tween 20, and blocked for 30 minutes with PBS/5% FBS. Plates were washed again before biotinylated anti-IFN-γ antibody (0.2 µg/ml) (Pierce Endogen) and supernatants were added. After 90 minutes incubation at room temperature, the plates were washed and incubated for 30-45 minutes with 0.25 µg/ml Poly HRP20-streptavidin (Research Diagnostics Inc.), revealed with enhanced K-Blue® TMB substrate (Neogen), and the reaction was stopped with 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance was evaluated at 450 nm with a Versamax microplate reader (Molecular Devices).

## 2.8 Western blotting

VLP were resolved by 12.5% sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel and transferred on PVDF membranes. Each VLP was detected with polyclonal mouse anti-PapMV or MaMV produced by mouse immunization with 100 µg of respective VLP. Serums were harvested 14 days after the immunization. For caspase-8 cleavage detection, protein were prepared from VLP pulsed-CD40B after 7 hours in lysis buffer for 20 minutes (20 mM Tris-HCl, pH 8, 137 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 1% (v/v) Triton X-100, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and 2 mM EDTA) containing protease inhibitors (1 mM PMSF, 2 µM pepstatin A, 2 µM leupeptin, all from Sigma-Aldrich). Cell debris were pelleted and discarded, and protein concentration was measured by Lowry assay with a DC Protein Assay kit (Bio-Rad). Protein extracts (30 µg/well) were resolved by 12.5% SDS-polyacrylamide gel and transferred to PVDF membranes (Immun-Blot™, Bio-Rad). Caspase-8 protein was revealed by incubation with a mouse monoclonal anti-human caspase-8 antibody (1:1000; 1C12 NEB Cell signaling) overnight at 4°C. Membranes were washed and re-incubated for 1 hour with a secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG1 γ-chain antibody (1:30 000; Southern Biotech) before detection by Lightning plus (Perkin-Elmer). Chemifluorescence was quantified by autoradiography.

## 2.9 Flow cytometry

VLPs were conjugated with Alexa Fluor® 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit (Molecular Probes) following the manufacturer's instructions. VLP entry in different APCs was assessed by flow cytometry with Alexa647-conjugated VLP. Briefly, CD40B, DC and KG-1 were incubated 3 hours with 10 µg/ml of labeled VLP. Cells were washed twice in PBS 0.5% BSA and 0.1% sodium azide before flow cytometric analysis. For intracellular cytokine staining, expanded T cell lines and peptide-pulsed T2 were cocultured at a ratio of 2:1 for 6 hours in the presence 5 µg/ml of Brefeldin A (Sigma-Aldrich). Cells were stained using FITC conjugated anti-CD3, Pacific Blue anti-CD8, APC-H7 anti-CD4 (BD Biosciences) and LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Molecular Probes) to exclude dead cells. Cells were surface-stained for 30 minutes at 4°C, washed with staining buffer (PBS 0.5% BSA and 0.1% sodium azide) and then fixed and permeabilized in Fixation & Permeabilization buffer (eBiosciences) for 30 minutes at 4°C. Intracellular staining was performed by incubating cells with antibodies against

IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , or correspondent isotype in Permeabilization Buffer (eBiosciences) for 30 minutes at 4°C. Cells were washed twice in Permeabilization Buffer and resuspended in staining buffer. Cells were processed with an LSRII instrument (BD Bioscience) and analyzed using FlowJo software (Tree Star).

### **2.10 Confocal microscopy**

CD40B and KG-1 were incubated for 3 hours with 10  $\mu\text{g/ml}$  of VLP and fixed with formaldehyde 2%. Cells were cytopun on slides and mounted in Geltol mounting medium (Thermo scientific). Slides were examined with a Leica TCS 4D confocal scanning microscope. Cell-surface staining of apoptotic cells was performed with PE-labeled Annexin V Apoptosis Detection kit (BD Biosciences) as described by the manufacturer. CD40B were incubated with 25 or 100  $\mu\text{g/ml}$  of various construct of PapMV and MaMV for 7 hours before staining.

## Results

**3.1 CP from MaMV and PapMV are distinct. As for PapMV, MaMV has been identified as** a new member of the potexvirus family [20]. The CP of this virus shows only 31% identity with the PapMV CP (Figure 1A). Most of the homology between the two proteins is found in the core sequence of the CP. Importantly, the N- and C-termini of these proteins which are exposed at the surface of the virus do show very little homology [17, 24]. To confirm this observation, we showed that there is no cross-reactivity between IgG directed to the surface of PapMV and MaMV as evaluated by both ELISA and Western blot analysis which suggests that the surfaces of the VLPs are distinct (Figure 1B-D).

**3.2 Engineering of the MaMV CP with CTL epitopes.** Chimeric MaMV VLPs with the CTL epitopes M1 and gp100 (respectively MaMV M1 and MaMV gp100; Figure 2A), as previously used for the PapMV study [15] were prepared with the objective of evaluating their ability to induce presentation of a CTL epitope at the surface of APCs. The chimerical constructions harbor the HLA-A\*0201 epitopes derived from the gp100 melanoma antigen and influenza matrix protein M1, inserted in the C-terminal region of MaMV CP and flanked by five residues from the native antigen in the N- and C-termini of the epitope (Figure 2A). Observation by electron microscopy showed that MaMV CPs and their engineered forms produced VLPs upon expression in *E. coli* (Figure 2B). The average length of the VLPs was approximately 60 nm (data not shown). Wild type PapMV and MaMV CPs will serve as negative controls in cross-presentation assays

**3.3 PapMV and MaMV VLPs are internalized in different APCs.** APCs may uptake and cross-present different VLPs with diverse efficiencies We thus evaluated the uptake of Alexa647-labeled version of both VLPs in different APCs. The entry of the labeled VLPs was evaluated by flow cytometry and by confocal microscopy. The CD40B system developed by Schultze's group for antigen presentation [25] and described as an efficient model to study classical MHC class II presentation of extracellular antigens [26] and MHC class I cross-presentation by PapMV VLPs [15], the KG-1 cell line which is DC-like immortalized acute myelogenous leukemia cells, also

used as a tool for cross-presentation studies [27] and moDC which are classical human-derived APCs [28] were exploited as APC models used in the uptake assays. First, we assessed VLP uptake by incubating APCs in a time-course experiment with Alexa647-labeled PapMV or MaMV VLPs. Flow cytometric analysis revealed time-dependent uptake in all cell types (Figure 3A). VLP uptake appeared more efficient in KG-1 and moDC compared to CD40B. PapMV and MaMV VLPs showed equivalent uptake in CD40B, but an increased uptake for MaMV VLPs was observed in KG-1 and moDC when mean fluorescence intensity (MFI) in these cells was compared (Figure 3B).

To confirm VLP internalization by human APCs, we studied active endocytosis by incubating at 37°C and the passive cell surface interaction of labeled VLPs at 4°C. In all cell types, MFI were markedly increased at 37°C in comparison to 4°C suggesting that fluorescence was due to an active process (Figure 4A). Finally, internalization was further confirmed by confocal microscopy on VLP-pulsed CD40B and KG-1 (Figure 4B), which revealed uptake in internal vesicular compartments. Similarly to flow cytometric analysis, uptake in KG-1 seemed more efficient in comparison to CD40B. From these data, we confirmed VLPs internalization in endogenous vesicular structures in the two different sources of APC in a time-dependent fashion.

**3.4 PapMV and MaMV VLPs are cross-presented by CD40B, and induce T cell proliferation.** PapMV VLP has previously been characterized for their proteasome-independent cross-presentation property [15]. Here, chimeric MaMV VLP fused with influenza M1 epitope induced IFN- $\gamma$  secretion from M1-specific T cells (Figure 5A). MaMV VLPs appeared to be more efficient in activating M1-specific T cells for IFN- $\gamma$  secretion in comparison to PapMV VLP. Upon antigen-specific T cell receptor (TCR) stimulation, proliferation can also be induced in T lymphocytes, which can be measured by CFSE dilution. We observed M1-specific T cell expansion following stimulation with PapMV M1 and MaMV M1-pulsed CD40B compared to PapMV and MaMV WT used as controls (Figure 5B).

**3.5 Both PapMV and MaMV VLPs can lead to expansion of antigen-specific T lymphocytes.** We previously demonstrated that PapMV fused with an HLA-A\*0201 epitope from the influenza M1 matrix protein can expand M1-specific T cells from a heterologous T cell population in PBMCs [15]. We used a similar approach by co-culturing resting T lymphocytes from PBMCs



with VLP-pulsed autologous CD40B. After three weeks of expansion and two rounds of stimulation with VLP-pulsed CD40B or peptide-pulsed CD40B, specificity of expanded T lymphocytes was assessed by a T cell recognition assay with peptide-pulsed HLA-A\*0201<sup>+</sup> T2 cells. T lymphocyte lines expanded with both VLPs showed similar reactivity to M1 peptide loaded on T2 cells and IFN- $\gamma$  secretion is comparable to T lymphocyte lines expanded with synthetic peptide-pulsed CD40B (Figure 6A). Expanded T cells demonstrated reactivity to PapMV M1- or MaMV M1-pulsed APCs without any cross-recognition of PapMV gp100 or MaMV gp100 (Figure 6B). T lymphocyte expansion with chimerical VLPs from PapMV and MaMV failed to expand specific T cells against the VLP platforms (PapMV or MaMV CP). To confirm the CTL expansion, we demonstrated by intracellular staining that IFN- $\gamma$  detected by ELISA was secreted by CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (Figure 6C). Some of the IFN- $\gamma$ -producing cells also appear to secrete TNF- $\alpha$ . Expansion of specific T lymphocytes was observed with PBMCs from seven of eight (7/8) different healthy donors (Table 2). The latter data showed that both PapMV M1 and MaMV M1 VLP are efficiently presented on APCs and can equally expand specific T cells from PBMCs.

**3.6 High concentrations of MaMV M1 can trigger cell death in CD40B.** We next determined PapMV and MaMV cross-presentation efficacy by comparing different concentrations of VLPs pulsed on CD40B and assessed IFN- $\gamma$  secretion by M1- or gp100-specific T lymphocytes. MaMV VLPs proved to be more efficient in activating specific T cells for IFN- $\gamma$  secretion in comparison to PapMV VLP at the same concentration (Figure 5A and 7 A-B). However, as opposed to MaMV gp100, efficacy of cross-presentation of MaMV M1 decreased at high concentration. In an attempt to explain this result we firstly assessed the toxicity of VLPs on CD40B. Cells were incubated with VLPs and cell mortality was quantified by annexin-V and 7-AAD staining. Flow cytometric analyses revealed that the higher concentration of MaMV M1 induced cell mortality after 7 h of treatment as shown by a large increase in the percentage of dead cells (annexin V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+</sup>) proportion (Figure 7C-D). We thus concluded that impaired M1-specific T lymphocyte recognition can be explained by the higher mortality observed in APCs. Next, we attempted to characterize the cell mortality induced by high concentration of MaMV M1 by immunoblotting cellular lysates with a caspase-8 antibody recognizing procaspase-8 and its cleaved fragments. As

observed with anti-Fas (CH11) treatment, CD40B incubated with high concentration of MaMV M1 showed accumulation of the p43/p41 and p18 cleaved fragments of procaspase-8. In contrast, CD40B treated with other MaMV or PapMV M1 VLPs did not show more caspase-8 cleaved fragments than untreated cells (Figure 7E). In summary, the MaMV VLP seems to have a greater cross-presentation capacity on CD40B for the M1 or gp100 epitope. However, high concentrations of MaMV M1 induced cell death and caspase-8 activation in APC.

## Discussion

The CPs of PapMV and MaMV, two members of the potexvirus family were genetically engineered to display immuno-dominant HLA-A\*0201 peptides from the M1 protein of the influenza virus and from gp100, a melanoma tumoral antigen. Although the CPs of both viruses share only 31% of identity, they are capable of auto-assembly into VLPs that appears similar to that of native viruses in *E. coli*. As anticipated from the amino acid sequences at the surface exposed N- and C-terminus of the two viruses, IgG directed to the surface of one of the virus failed to recognize the surface of the other virus by ELISA and Western blot assay (Figure 1 B-D). We confirmed that the internalization of VLPs in three different sources of APC: KG-1, moDC and CD40B in a time-dependent fashion. In KG-1 and CD40B, the fluorescently-labeled VLPs of PapMV and MaMV were localized in endogenous vesicular compartments after internalization with a similar efficacy. Both VLPs were cross-presented in CD40B and lead to IFN- $\gamma$  secretion and proliferation of specific T lymphocytes. We successfully generated avid T cells by *in vitro* T lymphocyte expansion from PBMCs with both PapMV M1 and MaMV M1 VLPs. Finally, chimerical VLPs appeared to cross-present gp100 and M1 epitopes in a dose-dependent manner. However, the MaMV M1 construction induced caspase-8-dependant mortality in some APCs at higher concentrations.

Due to their repetitive and crystalline structures, plant viruses as vaccine vectors are stable and induce strong immunogenicity. PapMV CP have previously been chosen to trigger an efficient humoral response mostly due to multiple exposed antigens at their surfaces [7]. Interestingly, chimeric VLPs can also be cross-presented on APC and generate a cellular immune response. In this paper, we inquire whether the observed cross-presentation capacity is shared by another member of the potexviruses family. MaMV CPs engineered to display M1 and gp100 epitopes form VLP when expressed in *E. coli* (Figure 2). MaMV was used to reveal this property because of the limited homology between MaMV and PapMV CP (Figure 1A). Comparison of the two potexviruses helped to understand intrinsic properties essential for antigenic cross-presentation. Also the availability of a second virus immunologically distinct from PapMV would eliminate the neutralizing antibody response, thus allowing a prime boost protocol.

Vaccines must first get internalized in competent APCs. PapMV VLPs have been previously described to enter and activate splenic DCs in a mouse model [14]. We showed that fluorescently-labeled PapMV and MaMV VLPs could be taken up by three different human APC models. Nevertheless, uptake efficiency varies between cells of lymphoid or myeloid origins and vesicular-based and time-dependent internalization can be observed in KG-1, moDC or CD40B. Uptake of different VLPs has been previously reported in human DCs; confocal microscopy revealed rapid internalization of Hepatitis C VLPs in human DCs [29]. Also, DCs and Langerhans cells seem to solicit two different endocytosis pathways for papillomavirus-like particle uptake. A clathrin-dependent pathway and caveolar associated vesicles can both lead to cross-presentation of HPV-like particles [30]. The pathway of internalization of potexvirus-like particles in human APCs remains unknown, but further investigations will provide information on the uptake of these particles in CD40B and moDC.

After the notable importance of stability and security, the prerequisite when developing a new vaccine platform is to ensure its capacity to increase the frequency of specific T lymphocytes in peripheral blood. This stimulation leads to an antigen-specific response and to the establishment of a pool of memory T lymphocytes as, it is the case, with Epstein-Barr VLPs [31]. First, we established the capacity of CD40B to cross-present M1 epitope from chimerical PapMV and MaMV. This cross-presentation led to IFN- $\gamma$  secretion and proliferation of M1-specific T cells (Figure 5). Also, we tested the capacity of those chimerical potexvirus-like particles to expand specific T lymphocytes against the M1 epitope from a polyclonal pool of PBMCs. To achieve this, we developed an *in vitro* vaccination model with a prime at day 0 and a boost seven days later. Results showed great specificity of T cell lines generated with this protocol. PapMV VLPs have already shown specific T lymphocyte expansion as a result of an identical protocol [15]. However, we confirmed these results with six of eight donors, whereas MaMV VLPs expanded specific T lymphocytes from seven of eight donors successfully (Table 2). Importantly, no cellular reactivity against the platform was detected from either PapMV or MaMV VLP-based construct (Figure 6B). These data confirm the potential of potexvirus-like particles as an efficient vaccine.

It has been previously demonstrated that PapMV VLPs mediate cross-presentation of the inserted epitope in CD40B [15], which appears to be mediated through a proteasome-independent pathway. In this study, we confirmed that activated B lymphocytes can efficiently cross-present

the M1 or gp100 antigens from MaMV and PapMV VLPs by assessed IFN- $\gamma$  secretion and proliferation of specific T cells. We speculated that MaMV VLPs use a similar pathway to efficiently present epitopes on APCs. However, the results presented in figure 7 also revealed a toxicity of the MaMV M1 construction. As previously shown, LPS contamination from *E.coli* can induce apoptosis through TLR-4 activation [32, 33]. However, LPS contamination was not responsible for increased cell mortality because lipopolysaccharide concentration was controlled in the preparations and MaMV M1 did not contain an increased LPS concentration. Furthermore, MaMV intrinsic properties do not seem to be the cause of toxicity because the MaMV gp100 or MaMV WT revealed no increase in cell death after incubation with CD40B. However, CD40B appear more sensitive to cell death *in vitro* than APCs are *in vivo*, because overnight incubation with commercial influenza vaccine Fluviral<sup>®</sup> from GlaxoSmithKline also induced high percentage of cell mortality (data not shown).

In conclusion, we demonstrated the efficacy of both PapMV and MaMV VLPs to be internalized and cross-presented in human APCs leading to *in vitro* expansion of M1-specific T lymphocytes. By comparing these two VLPs (PapMV and MaMV), we will further deepen our knowledge of the mechanism of cross-presentation induced by these molecules. Furthermore, this finding increases our motivation in developing a treatment in cancer immunotherapy and of viral diseases based on these platforms.

## Tables and Figures

**Tableau 1 (Hanafi et al. Vaccine Table 1).** Oligonucleotide sequences used for the introduction of the gp100 and the influenza M1 sequences at the C-terminus of MaMV CP.

| Name of the Oligonucleotide | Sequence of the oligonucleotide                                       |
|-----------------------------|---|
| gp100 (sense)               | 5'-CTAGTTCTTCTGCGTTCACCATCATGGACCAGGTTCCGTTCTCTGTTTCTGTTTCTCAGCTGA-3' |
| gp100 (antisense)           | 5'CTAGTCAGCTGAGAAACAGAAACAGAGAACGGAACCTGGTCCATGATGGTGAACGCAGAAGAA-3'  |
| M1 (sense)                  | 5'CTAGTTCTCCGCTGACCAAAGGTATCCTGGGTTTCGTTTTACCCCTGACCGTTCCGTCTGAAA-3'  |
| M1 (antisense)              | 5'CTAGTTTTCAGACGGAACGGTCAGGGTGAAAACGAAACCCAGGATACCTTTGGTCAGCGGAGAA-3' |

**Tableau 2 (Hanafi et al. Vaccine Table 2).** M1-specific T cell expansion results with eight normal donors stimulated with chimerical VLP or synthetic peptide

| Normal Donor # | Stimulation by APCs loaded with: |            |              |
|----------------|----------------------------------|------------|--------------|
|                | PapMV M1                         | MaMV M1    | Peptide M1   |
| 405            | 0/5* (0%)                        | 4/5 (80%)  | 3/10 (30%)   |
| 542            | 3/3 (100%)                       | 3/3 (100%) | 10/10 (100%) |
| 548            | 2/4 (50%)                        | 2/4 (50%)  | 4/4 (100%)   |
| 614            | 4/4 (100%)                       | 3/3 (100%) | 5/5 (100%)   |
| 621            | 3/3 (100%)                       | 3/3 (100%) | 8/10 (80%)   |
| 716            | 0/4 (0%)                         | 0/4 (0%)   | 0/4 (0%)     |
| 724            | 4/4 (100%)                       | 4/4 (100%) | 4/4 (100%)   |
| 735            | 4/4 (100%)                       | 4/4 (100%) | NA           |

\*Results are presented as positive M1-specific T cell line on total expanded cell lines (percentage). A M1-specific T cell line is described as recognizing M1-pulsed T2 over 100pg/ml of IFN- $\gamma$  and being more than twice the background of gp100-pulsed T2, NA= not available.

**A**

```

PapMV CP                               MSKSSMSTPNTAFAITQEQMSSIKVDPTSNL
                                         P   A T E + +I   T+
MaMV CP  MSNSGSAAAAPSQPSAAKKPAENIPSQEPQPADPADPTRAPTLEDLKAINVSTTTA

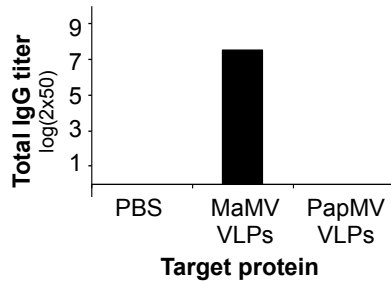
PapMV CP  LPSQEQLKSVSTLMVAAKVPAASVTTVALELVNFCYDNGSSAYTVTGPS--SIFEIS
          + + ++K + L   + A +V   +L   D +S + S S P I+
MaMV CP  VATPAEIKLLGDLFRKKGIDANAVAPAMWDLARAYADVQASRSAILSGSTPSNPSIT

PapMV CP  LAQLASIVKASGTSRLKFCRYFAPIIWNLR-TDKMAPANWEASGYKPSAKFAAFDFF
          LA + + + R+FC YFA I+WN+   PANW   G   K+A FDFE
MaMV CP  RTALAKQLYSIDLTPRQFCMYFAKIVWNMMLATHTPPANWAKQGLPEDCKYAGDFF

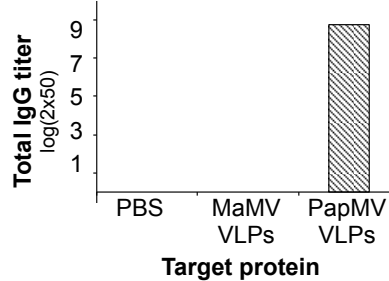
PapMV CP  DGVENPAAMQPPSGLIRSPTEERIANATNKQVHLFQAAAQDNFNFAFSAFITKGQI
          +GV +P+A++P GLIR P Q+E A++T K L + Q+ N+ SN A +T G+
MaMV CP  EGVLSPSALEPADGLIRMPNQEIQAHSTAKYGLARQRIQNGNYVSNLAEVTHGRA

PapMV CP  SGSTPTIQFLPPPE 214
          G PPE
MaMV CP  GGVNAMYAIEAPPEF 243
  
```

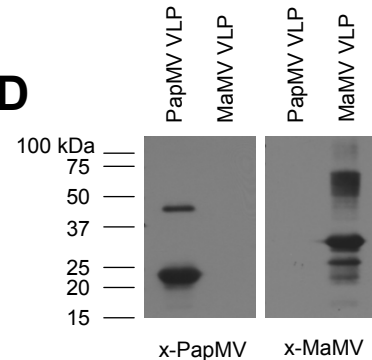
**B**



**C**



**D**

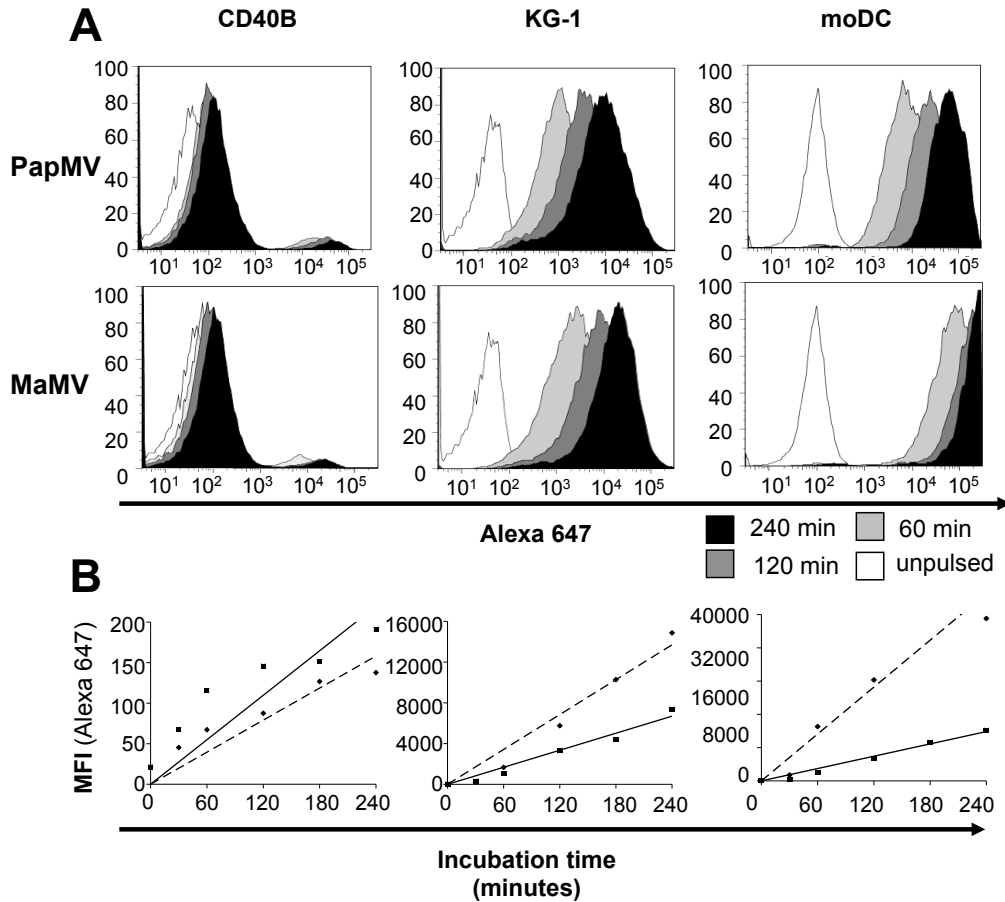


**Figure 9 (Hanafi et al. Vaccine Figure 1) PapMV and MaMV coat proteins are distinct.**

(A) Alignment of the PapMV and the MaMV CP amino acid sequences. The N-terminal extension (25 amino acids in length) and the last amino acid of MaMV CP are underlined because they were not considered in the sequence alignment. The identical amino acids were highlighted and the homologous amino acids were identified with a (+). The two CP have 63 amino acids in common which correspond to 31% identity in the stretch that was used for the alignment. Alignment was performed using Blastp algorithm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). (B) ELISA using PapMV antiserum and MaMV VLPs as a substrate. PapMV IgG do not cross react with MaMV VLPs. Antiserum was obtained from Balb/C mice immunized once with 100 µg PapMV VLPs. Mice were bled 14 days after immunization. (C) ELISA using MaMV antiserum and PapMV VLPs as a substrate. MaMV IgG do not cross react with PapMV VLPs. Antiserum was obtained from Balb/C mice immunized once with 100 µg MaMV VLPs. Mice were bled 14 days after immunization. (D) Western blotting of 2 µg of PapMV and MaMV VLP with mouse polyclonal antibody (1:5000).

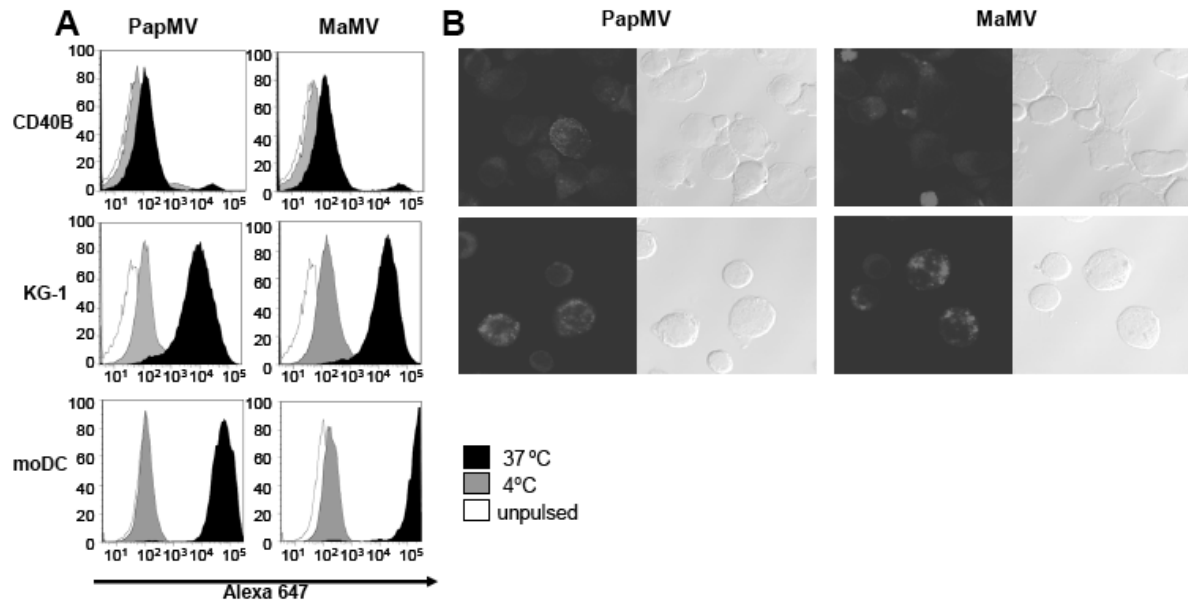






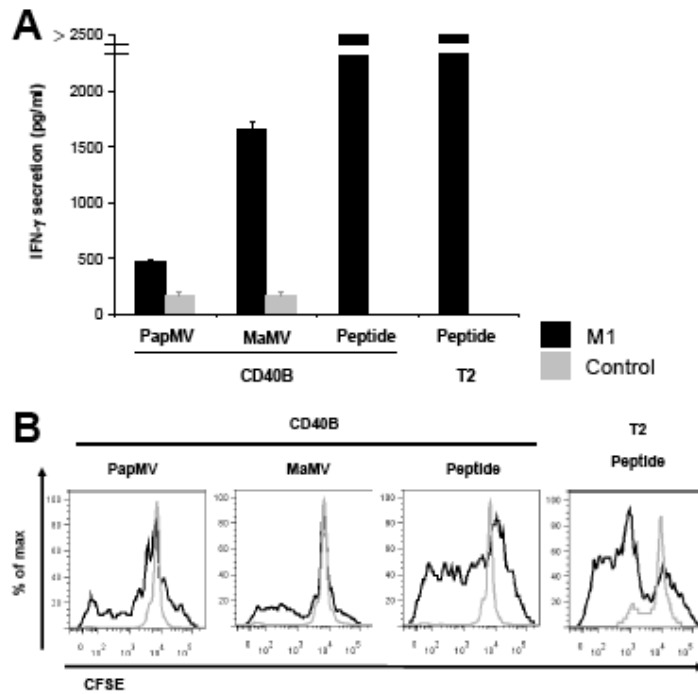
**Figure 11 (Hanafi et al. Vaccine Figure 3)** Time course of VLPs entry in APCs.

(A) CD40B, KG-1 and moDC were incubated for different durations with 10  $\mu\text{g/mL}$  of each Alexa647-labelled VLP before integration was assessed by flow cytometric analysis. (B) Mean fluorescence intensity was linearly correlated with incubation time in each cell type (PapMV solid line, MaMV dashed line). Representative of two independent experiments.



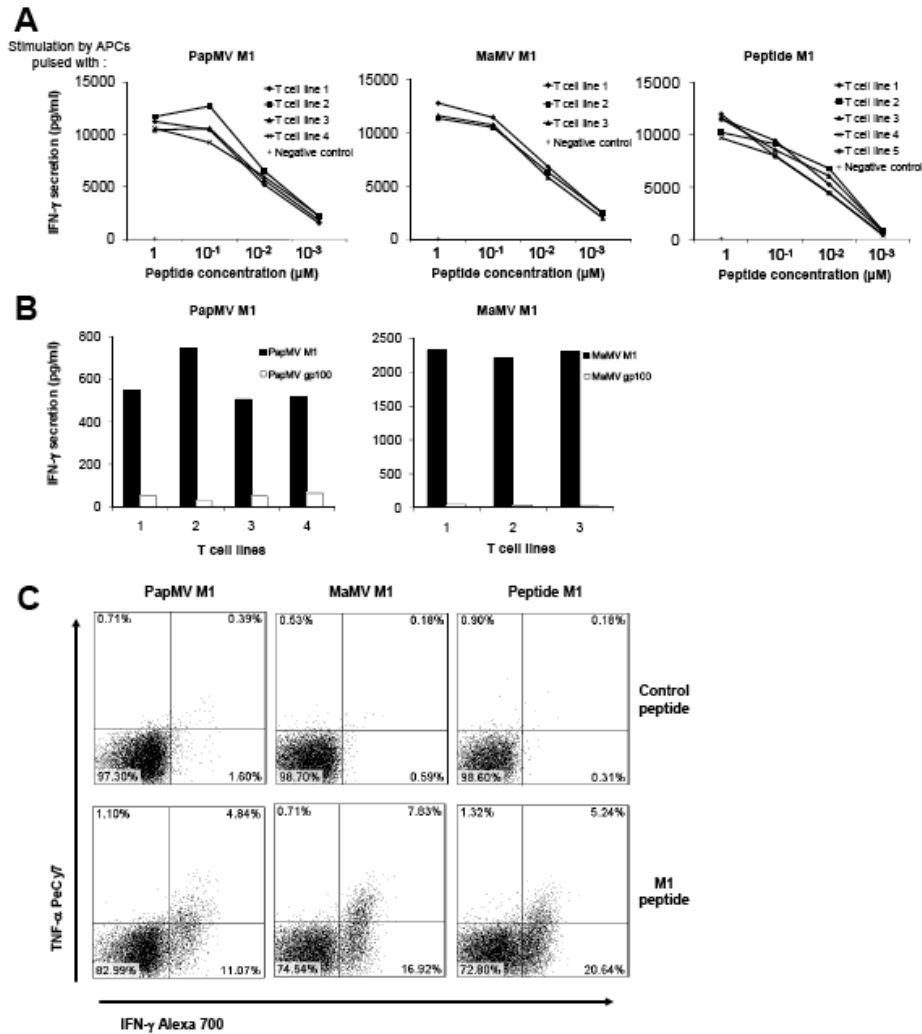
**Figure 12 (Hanafi et al. Vaccine Figure 4)** PapMV and MaMV were internalized in vesicular compartments in CD40B, KG-1 and moDC.

(A) All cell types were incubated for 4h with Alexa647-labelled VLPs at 37oC or 4oC followed by flow cytometric analysis. Representative of two independent experiments. (B) KG-1 and CD40B treated as described in A were cytospun on slides and fixed with formaldehyde 2%. Fluorescently labeled VLPs were observed by confocal microscopy.



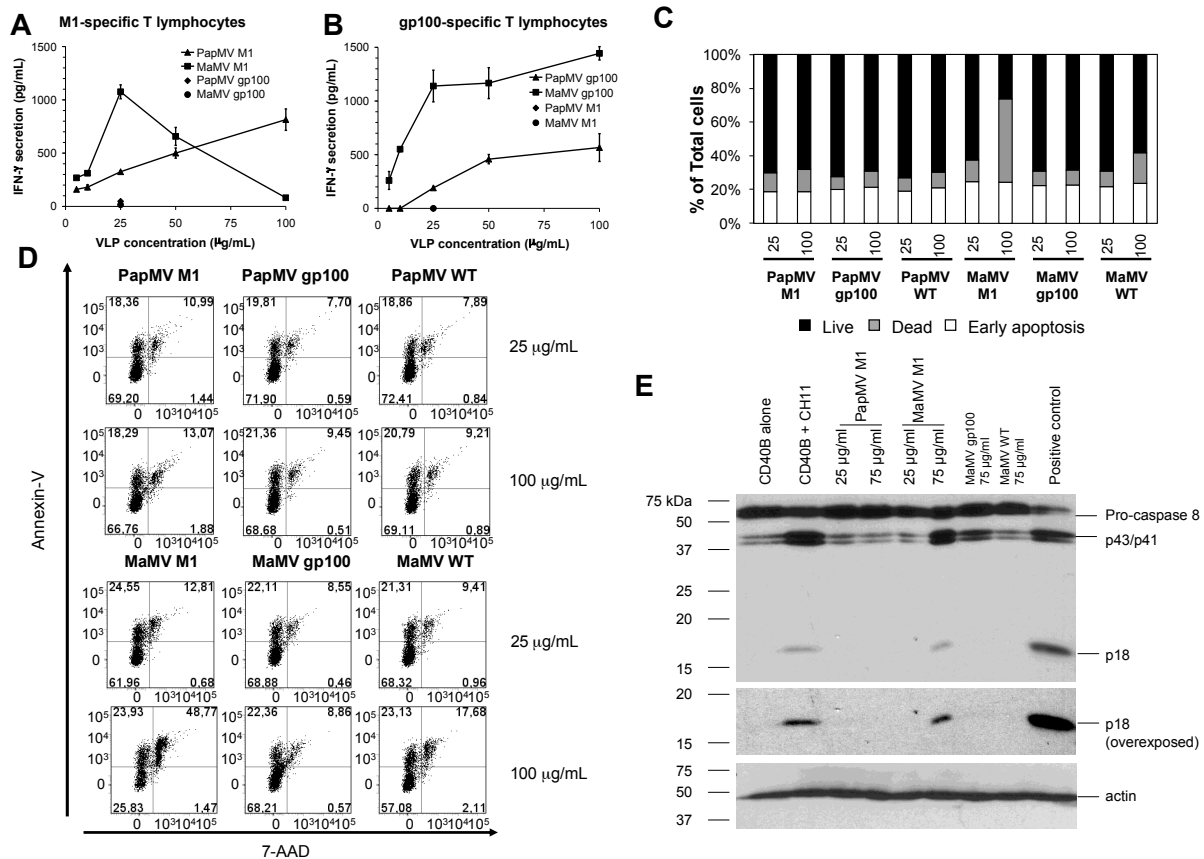
**Figure 13 (Hanafi et al. Vaccine Figure 5)** PapMV and MaMV were cross-presented by CD40B and led to specific T cell proliferation.

(A) CD40B were pulsed for 20 hours with 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of PapMV and MaMV VLPs. CD40B were washed and M1-specific T cells were added for 18 hours. Culture supernatants were harvested and IFN- $\gamma$  secretion was determined by ELISA. (B) CD40B were pulsed for 20 hours with 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of PapMV and MaMV VLPs. VLP-pulsed CD40B were washed and CFSE-labeled M1-specific T cells were added for 5 days. T cell proliferation was evaluated by flow cytometric analysis by gating on CD8<sup>+</sup> cells.



**Figure 14 (Hanafi et al. Vaccine Figure 6)** PapMV M1 and MaMV M1 lead to expansion of specific T lymphocytes from PBMC.

(A) After expansion of T cells with autologous CD40B pulsed with 25  $\mu\text{g/ml}$  of PapMV M1 or MaMV M1 or 1  $\mu\text{M}$  of synthetic peptide following the protocol described in material and methods, specificity of expanded T cells was assessed by co-culturing with T2 cells pulsed with indicated concentrations of M1 or gp100 peptides. (B) M1-specific T cell lines expanded with VLP-pulsed CD40B were evaluated for VLP reactivity using CD40B pulsed with original VLPs and control VLPs with gp100 epitope. (C) Following expansion, M1-specific T cell lines were incubated with T2 cells pulsed with M1 or control peptides for 6 hours in the presence of brefeldin A (5  $\mu\text{g/ml}$ ). TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  staining is shown for CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> population following flow cytometry analysis. Representative results are presented from 8 (A-B) or 3 (C) different HLA-A\*0201<sup>+</sup> donors.



**Figure 15 (Hanafi et al. Vaccine Figure 7)** Caspase-8 cleavage is induced in CD40B pulsed with high concentration of MaMV M1.

(A-B) CD40B were pulsed for 20h with varying concentrations of VLP. CD40B were washed and (A) M1-specific or (B) gp100-specific T cells were added for 18 hours. Culture supernatants were harvested and IFN- $\gamma$  secretion was determined by ELISA. (PapMV solid line, MaMV dotted line). (C-D) Toxicity of each construction was determined by 7-AAD and annexin V staining on CD40B pulsed for 7 hours with 25 or 100  $\mu$ g/ml of VLP. Viability of cells was analyzed by flow cytometry. Live cells are 7-AAD- Annexin V-, cells in early apoptosis are 7-AAD- Annexin V+ and dead cells are stained for 7 AAD+ Annexin V+. (E) Procaspase-8 cleavage was detected by western blot with anti-caspase-8 monoclonal antibody. Cells were incubated for 7 hours with 25 or 75  $\mu$ g/mL of PapMV M1, MaMV M1, MaMV gp100 or MaMV WT. CD40B were also incubated for 7 hours with 100 ng/mL of anti-Fas (CH11). Positive control refers to apoptosis induced in HeLa cells with TNF- $\alpha$  (2.5 ng/mL) and cycloheximide (15  $\mu$ g/mL)

## **Acknowledgements**

This work was supported by a grant from the Cancer Research Society (CRS) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Financial support: R.L. and J.P.R. are recipients of Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) scholarships. We thank Ovid Da Silva from the “Bureau d’aide à la recherche” (From Centre Hospitalier de l’Université de Montréal) for text editing.

## References

- [1] Ada G. Vaccines and Vaccination. *The New England Journal of Medicine* 2001;345(14):1042-53.
- [2] Daar AS, Martin DK, Smith AC, Nast S, Singer PA. Top ten biotechnologies for improving health in developing countries. *Nature genetics* 2002;32:229-32.
- [3] Stern AM, Markel H. The History Of Vaccines And Immunization: Familiar Patterns, New Challenges. *Health Affairs* 2005;24(3):611-21.
- [4] Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *The Lancet* 2004;364:1757-65.
- [5] Quan F-S, Huang C, Compans RW, Kang S-M. Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus. *Journal of virology* 2007;81(7):3514-24.
- [6] Kumar S, Ochoa W, Singh P, Hsu C, Schneemann A, Manchester M, et al. Tomato bushy stunt virus (TBSV), a versatile platform for polyvalent display of antigenic epitopes and vaccine design. *Virology* 2009;388:185-90.
- [7] Denis J, Acosta-Ramirez E, Zhao Y, Hamelin M-e, Koukavica I, Baz M, et al. Development of universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform. *Vaccine* 2008;26(27-28):3395-403.
- [8] Denis J, Majeau N, Acosta-Ramirez E, Savard C, Bedard M-C, Simard S, et al. Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: evidence for the critical function of multimerization. *Virology* 2007;363(1):59-68.
- [9] Marusic C, Vitale A, Pedrazzini E, Donini M, Frigerio L, Bock R, et al. Plant-based strategies aimed at expressing HIV antigens and neutralizing antibodies at high levels. Nef as a case study. *Transgenic research* 2009.
- [10] Moròn VG, Rueda P, Sedlik C, Leclerc C. In Vivo, Dendritic Cells Can Cross-Present Virus-Like Particles Using an Endosome-to-Cytosol Pathway. *The Journal of Immunology* 2003;171:2242-50.
- [11] Ruedl C, Storni T, Lechner F, Bächli T, Bachmann MF. Cross-presentation of virus-like particles by skin- derived CD8 – dendritic cells: a dispensable role for TAP. *European Journal of Immunology* 2002;32:818-25.

- [12] Sedlik C, Dridi A, Deriaud E, Saron MF, Rueda P, Sarraseca J, et al. Intranasal Delivery of Recombinant Parvovirus-Like Particles Elicits Cytotoxic T-Cell and Neutralizing Antibody Responses. *Journal of virology* 1999;73(4):2739-44.
- [13] Woo W-p, Doan T, Herd KA, Tindle RW. Hepatitis B Surface Antigen Vector Delivers Protective Cytotoxic T-Lymphocyte Responses to Disease-Relevant Foreign Epitopes. *Journal of virology* 2006;80(8):3975-84.
- [14] Lacasse P, Denis J, Lapointe R, Leclerc D, Lamarre A. Novel plant virus-based vaccine induces protective cytotoxic T-lymphocyte-mediated antiviral immunity through dendritic cell maturation. *Journal of virology* 2008;82(2):785-94.
- [15] Leclerc D, Beauseigle D, Denis J, Morin H, Pare C, Lamarre A, et al. Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells. *Journal of virology* 2007;81(3):1319-26.
- [16] Marusic C, Rizza P, Lattanzi L, Mancini C, Spada M, Belardelli F, et al. Chimeric Plant Virus Particles as Immunogens for Inducing Murine and Human Immune Responses against Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of virology* 2001;75(18):8434-9.
- [17] Tremblay M-H, Majeau N, Gagné M-EL, Lecours K, Morin H, Duvignaud J-B, et al. Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaic potexvirus coat protein. *The FEBS journal* 2006;273(1):14-25.
- [18] Zhang S, Cubas R, Li M, Chen C, Yao Q. Virus-like particle vaccine activates conventional B2 cells and promotes B cell differentiation to IgG2a producing plasma cells. *Molecular Immunology* 2009;46:1988-2001.
- [19] Haynes JR, Dokken L, Wiley JA, Cawthon AG, Bigger J, Harmsen AG, et al. Influenza-pseudotyped Gag virus-like particle vaccines provide broad protection against highly pathogenic avian influenza challenge. *Vaccine* 2008:1-12.
- [20] Côté F, Paré C, Majeau N, Bolduc M, Leblanc E, Bergeron MG, et al. Nucleotide sequence and phylogenetic analysis of a new potexvirus: Malva mosaic virus. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2008;8(1):83-93.
- [21] Laliberté ME, Lecours K, Gagné S, Leclerc D. The F13 residue is critical for interaction among the coat protein subunits of papaya mosaic virus. *FEBS Journal* 2008;275:1474-84.
- [22] Lapointe R, Toso JF, Butts C, Young HA, Hwu P. Human dendritic cells require multiple activation signals for the efficient generation of tumor antigen-specific T lymphocytes. *European Journal of Immunology* 2000;30:3291-8.
- [23] Pelletier S, Tanguay S, Lee S, Gunaratnam L, Arbour N, Lapointe R. TGF- $\alpha$  as a candidate tumor antigen for renal cell carcinomas. *Cancer Immunology Immunotherapy* 2009;58(8):1207-17



- [24] Baratova LA, Grebenshchikov NI, Shishkov AV, Kashirin IA, Radavsky JL, Jarvekulg L, et al. The topography of the surface of potato virus X: tritium planigraphy and immunological analysis. *Journal of General Virology* 1992;73:229-35.
- [25] Schultze JL, Michalak S, Seamon MJ, Dranoff G, Jung K, Daley J, et al. CD40-activated Human B Cells: An Alternative Source of Highly Efficient Antigen Presenting Cells to Generate Autologous Antigen-specific T Cells for Adoptive Immunotherapy. *Journal of Clinical Investigation* 1997;100:2757-65.
- [26] Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P. CD40-stimulated B Lymphocytes Pulsed with Tumor Antigens Are Effective Antigen-presenting Cells That Can Generate Specific T Cells. *Cancer Research* 2003;63:2836-43.
- [27] Ackerman AL, Cresswell P. Regulation of MHC Class I Transport in Human Dendritic Cells and the Dendritic-Like Cell Line KG-1. *The Journal of Immunology* 2003;170:4178-88.
- [28] Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual Review of Immunology* 1991;9:271-96.
- [29] Barth H, Ulsenheimer A, Pape GR, Diepolder HM, Hoffmann M, Thimme R, et al. Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells. *Blood* 2005;105:3605-14.
- [30] Yan M, Peng J, Jabbar IA, Liu X, Filgueira L, Frazer IH, et al. Despite differences between dendritic cells and Langerhans cells in the mechanism of papillomavirus-like particle antigen uptake, both cells cross-prime T cells. *Virology* 2004;324:297-310.
- [31] Adhikary D, Behrends U, Feederle R, Delecluse H-j, Mautner J. Standardized and Highly Efficient Expansion of Epstein-Barr Virus-Specific CD4+ T Cells by Using Virus-Like Particles. *Journal of virology* 2008;82(8):3903-11.
- [32] Lehner M, Bailo M, Stachel D, Roesler W, Parolini O, Holter W. Caspase-8 dependent apoptosis induction in malignant myeloid cells by TLR stimulation in the presence of IFN-alpha. *Leukemia Research* 2007;31:1729-35.
- [33] Wang HL, Akinci IO, Baker CM, Urich D, Bellmeyer A. The Intrinsic Apoptotic Pathway Is Required for Lipopolysaccharide-Induced Lung Endothelial Cell Death. *The Journal of Immunology* 2007;179:1834-41.

## **Chapitre 2 : Présentation croisée par CMH I dépendante de l'autophagie**

*MHC class I antigen cross-presentation mediated by PapMV nanoparticles in human antigen presenting cells is dependent on autophagy*

Manuscrit soumis à *Autophagy*

*L.-A. Hanafi est responsable de la majorité de la réalisation des travaux de recherche. A. Bellemare-Pelletier et É. Gagnon ont participé aux expériences de shRNA (Figure 5 du manuscrit). K. Hamelin et M.-J. Hébert ont fourni le support technique pour la microscopie confocale (Figure 3 C-E du manuscrit). D. Leclerc est responsable du design et de la production de PapMV M1 et gp100, M.-J. Hébert, M. Desjardins, É. Gagnon et D. Leclerc ont fourni un apport intellectuel. L.-A. Hanafi et R. Lapointe sont responsable du design expérimental et de l'écriture du manuscrit. R. Lapointe a supervisé l'ensemble de l'étude.*

# **MHC class I antigen cross-presentation mediated by PapMV nanoparticles in human antigen presenting cells is dependent on autophagy**

Laïla-Aïcha Hanafi<sup>a</sup>, Angélique Bellemare-Pelletier<sup>b</sup>, Katia Hamelin<sup>a</sup>, Marie-Josée Hébert<sup>a</sup>,  
Michel Desjardins<sup>b</sup>, Étienne Gagnon<sup>b</sup>, Denis Leclerc<sup>c</sup> and Réjean Lapointe<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Université de Montréal and Institut du Cancer de Montréal

<sup>b</sup>Département de Microbiologie et Immunologie, Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC), Université de Montréal

<sup>c</sup>Centre de recherche en infectiologie, CHU of Quebec and Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université Laval

Running title: Autophagy mediated MHC I cross-presentation

To whom correspondence should be addressed: Réjean Lapointe, CRCHUM, Tour Viger,

## **Keywords**

MHC class I antigen cross-presentation,  
vacuolar pathway,  
vaccine platform,  
virus-like particles,  
EBV-immortalized B lymphocytes

## **List of abbreviations**

3-MA: 3-methyladenine  
APC: antigen presenting cell(s)  
ATCC: American type culture collection  
CD40B: CD40-activated B lymphocytes  
CTL: cytotoxic T lymphocyte  
DMSO: dimethyl sulfoxide  
EBV-B: Epstein-Barr virus immortalized B lymphocytes  
ECL: electrochemiluminescence  
FACS: fluorescence-activated cell sorting  
GFP: green fluorescent protein  
gp100 : melanoma glycoprotein 100  
HBSS: Hank's balanced salt solution  
HCMV: human cytomegalovirus  
HIV: human immunodeficiency virus  
HLA: human leukocyte antigen  
HPV: human papilloma virus  
HSV-1: herpes simplex virus-1  
IFN: interferon  
IL-4: interleukin-4  
M1: influenza matrix protein 1  
MaMV: Malva mosaic virus  
MFI: mean fluorescence intensity  
MHC: major histocompatibility complex  
OVA: ovalbumin  
PapMV: papaya mosaic virus  
PBMC: peripheral blood mononuclear cells  
pDC: plasmacytoid dendritic cells  
RHDV: rabbit hemorrhagic disease virus  
SDS-PAGE: sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
SEM: standard error of the mean  
TAP: transporter associated with antigen presentation  
TLR: toll-like receptor  
VLPs: virus-like particle(s)

## **Abstract**

We have engineered papaya mosaic virus (PapMV) coat protein to produce nanoparticles that are a new vaccination platform for triggering cellular immunity. A cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitope was inserted in the PapMV nanoparticle. This vaccine platform has previously been described as activating specific T lymphocytes against the inserted epitope through a proteasome-independent MHC class I cross-presentation. In this study, we provide novel insights into the mechanism of the MHC class I cross-presentation mediated by PapMV nanoparticles. Our results demonstrate that PapMV nanoparticles do not require the transporter associated with antigen presentation (TAP), but rather depend on lysosome acidification and cathepsin S protease activity. We have also linked the induction of autophagy with this vacuolar MHC class I cross-presentation process. Interestingly, autophagy is induced in APC after PapMV nanoparticle exposure and inhibition of autophagy reduces MHC class I cross-presentation. Also, induction of autophagy using starvation enhances MHC class I cross-presentation of PapMV nanoparticles. This study is the first to demonstrate that autophagy is associated with TAP and proteasome-independent MHC class I cross-presentation. A deeper understanding of the autophagy-dependent MHC class I cross-presentation will be useful in designing vaccination platforms that aim to trigger an efficient CTL response.

## Introduction

Among the various vaccine vectors that have recently been developed, the utilization of virus-like particles (VLPs) has multiple advantages. VLPs are composed of viral proteins assembled in a non-productive, virus-like structure that reduces the risks linked to productive infection by attenuated viruses while keeping their immunogenicity. VLPs can serve as vaccine carriers through the addition of sequences coding for major histocompatibility complex (MHC) class I epitopes from viral or tumor target proteins into the coat protein virus sequence<sup>1</sup>.

We have developed VLPs in which HLA-A2 epitopes of influenza matrix 1 (M1) or melanoma glycoprotein 100 (gp100) were inserted at the C-terminus of the papaya mosaic virus (PapMV) coat protein sequence<sup>2</sup>, the building block of the PapMV nanoparticles. We have previously demonstrated that the inserted epitopes are cross-presented on MHC class I by antigen presenting cells (APCs) through a proteasome-independent mechanism<sup>3</sup>. Other VLPs have demonstrated the same capacity of MHC class I antigen cross-presentation. Specifically, we have observed that Malva mosaic virus (MaMV) VLPs are internalized, cross-presented by APC and lead to specific T lymphocyte expansion<sup>2</sup>. Also, a Hepatitis B VLP containing ovalbumin (OVA) epitope is presented on MHC class I and class II in dendritic cells<sup>4</sup>. In addition, HIV-based VLPs coupled with E7 oncoprotein of HPV can cross-present E7 epitopes and induce an anti-tumor response<sup>5</sup>. Proteasome-independent cross-presentation has also been described for other particulate antigens, such as the VLPs prepared from the rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV), which is presented via the MHC class I recycling pathway<sup>6</sup>. This last pathway involves processing in vacuolar compartments and depends on cathepsin S for protein degradation. An antigen cross-presentation pathway dependent on recycling process and cathepsin S has also been described in plasmacytoid dendritic cells (pDCs), where it showed rapid potential for presentation from this particular vacuolar process<sup>7</sup>.

In this report, our aim was to define the MHC class I cross-presentation pathway mediated by PapMV VLPs. From the previously described MHC class I antigen cross-presentation, we can categorize all the different pathways into two different subtypes: the cytosolic pathway where internalized antigens must access the cytosol to be processed through the classical MHC class I machinery (proteasome degradation and endoplasmic reticulum loading<sup>8</sup>) and a second pathway

where degradation and loading onto MHC class I molecules is performed entirely in the vacuolar compartment<sup>9, 10</sup>. This last pathway is defined as vacuolar or vesicular cross-presentation. Since our previous data suggested a proteasome-independent pathway, we have investigated the role of transporter associated with antigen presentation (TAP), cathepsin S, and lysosome acidification in PapMV cross-presentation.

We have also identified autophagy as an important cellular activity for the MHC class I cross-presentation of the CTL epitopes fused to PapMV. Autophagy is a ubiquitous cellular survival process that has previously been implicated in many immunological processes, including antigen presentation<sup>11, 12</sup>. First, it plays a role in T lymphocyte development during the negative selection of CD4<sup>+</sup> T cells in the thymus, where autophagy is highly implicated in MHC class II presentation of endogenous proteins<sup>13, 14</sup>. However, the role of autophagy in MHC class I presentation is poorly characterized. Autophagy seems to be involved in MHC class I antigen presentation in a context where classical MHC class I is inhibited by infection with the herpes simplex virus (HSV)-1<sup>15, 16</sup>. Also, when TAP is inhibited, autophagy is implicated in MHC class I presentation of human cytomegalovirus<sup>17</sup>. We hypothesized that PapMV VLP is cross-presented by MHC class I through an autophagy-dependent vacuolar pathway.

We report here that MHC class I cross-presentation of epitopes inserted on PapMV nanoparticles requires cathepsin S enzymatic activity and endosomal acidification. We have further demonstrated that the cross-presentation of PapMV VLPs was independent on TAP transport to the endoplasmic reticulum. Also, we observe induction of autophagy in APCs exposed to PapMV. Finally, the MHC class I antigen cross-presentation mediated by PapMV VLPs requires autophagic processes to be efficient.

## Results

### *PapMV cross-presentation is a TAP-independent active process*

To study antigen cross-presentation mediated by PapMV VLPs, we have developed an *in vitro* assay<sup>3</sup> consisting of a 6-hour loading of APC with PapMV VLPs fused to a specific epitope. After extensive washing, we co-culture the APC with CD8<sup>+</sup> T lymphocytes specific to this inserted epitope. We are then able to quantify the cross-presentation level by the activation of T cells through the secretion of IFN- $\gamma$  in the co-culture supernatant. We first proceed with a cross-presentation assay in EBV-B cells with PapMV exposure performed at either 37°C or 4°C to verify that the release for antigen presentation of the epitope inserted in the VLP structure is mediated by an active degradation by the APC. As shown in Figure 1A, PapMV M1 loaded APCs were efficiently recognized only when pulsed at 37°C, demonstrating that presentation by PapMV VLPs requires active processes. As expected, external loading of APCs with a peptide corresponding to the minimal epitope was almost equally recognized by the specific T lymphocytes at both 37°C and 4°C.

We performed the same antigen cross-presentation assay using pulsed T2 cells, a TAP-deficient cell line<sup>18</sup>. TAP is implicated in the transport of peptides from the cytoplasm to the endoplasmic reticulum and is essential in classical MHC class I antigen presentation, as well as in cytosolic antigen cross-presentation<sup>19, 20</sup>. The efficient T lymphocyte-mediated recognition of T2 cells pulsed with PapMV VLPs suggests that antigen cross-presentation pathway is independent of TAP, and again, only cells pulsed at 37°C were efficiently recognized (Figure 1B).

These data strongly suggest that PapMV VLP mediated cross-presentation is independent of TAP transport of the epitope into the endoplasmic reticulum and requires an active intracellular process. This supports our hypothesis that the PapMV VLP is cross-presented by a vacuolar cross-presentation pathway.

### *Induction of cross-presentation using PapMV nanoparticles transit through the vacuole*

Due to the first results presented, suggesting that the PapMV VLP is cross-presented via the vacuolar pathway, we wanted to confirm the role of previously described mediators of the vacuolar pathway (lysosomes and cathepsin S) by using chemical inhibitors. Chloroquine, an inhibitor of lysosome acidification<sup>21</sup>, efficiently inhibited MHC class I cross-presentation, as



illustrated by reduced IFN- $\gamma$  secretion by epitope-specific T lymphocytes (Figure 2A). This reduction was significant compared to the small effect of chloroquine on the recognition of the externally loaded APC.

Similarly, cathepsin S protease has previously been linked to proteasome-independent MHC class I cross-presentation<sup>22, 23</sup>. When APCs were pretreated with cathepsin S specific inhibitor before PapMV loading, we observed that PapMV cross-presentation was decreased, while external loading of MHC class I with a short peptide was not affected by this treatment (Figure 2B).

We also controlled whether blocking of MHC class I cross-presentation by both inhibitors was due to a blocking of PapMV internalization. Our results demonstrate that there is no significant difference in fluorescent PapMV internalization measured by flow cytometry with these inhibitor concentrations (Figure 2C-D). Collectively, these results show that chloroquine and cathepsin S do not affect PapMV internalization, but do block PapMV antigen processing, confirming a role for lysosome and cathepsin S in PapMV nanoparticle processing.

#### *Autophagy is induced in APC by PapMV nanoparticles*

Starting from our hypothesis that autophagy can be implicated in MHC class I cross-presentation by PapMV VLPs, we first wanted to evaluate the induction of autophagy on PapMV exposure. We first measured autophagy using the lipidated form of LC3 (LC3II) as a marker for autophagosome formation. In Figure 3A, we show that PapMV (at both 25 or 50  $\mu\text{g/ml}$ ) induces the formation of autophagosomes in EBV-B cells. This induction can be quantified by the ratio of LC3II over LC3I (the cytosolic form). Incubation with PapMV and the positive control rapamycin significantly enhances the LC3II/LC3I ratio (Figure 3B). The autophagosome induction inhibitor (3-methyladenine (3-MA)) reduces autophagy induction by both PapMV and rapamycin (Figure 3A-B).

To confirm these results obtained by immunoblotting, we observed the induction of autophagy by confocal microscopy, using transfected APCs with a plasmid expressing GFP-labeled LC3. As transfection efficiency was less than 40%, we enriched GFP<sup>+</sup> cells through fluorescence-activated cell sorting (FACS). Cells were then treated with PapMV or rapamycin to induce autophagy and observed by confocal microscopy. As presented in Figure 3C, PapMV and rapamycin exposure enhances the numbers of LC3-GFP<sup>+</sup> puncta. When we quantified the

formation of LC3-GFP<sup>+</sup> vesicles in multiple cells, we observed a 3-4 fold increase in the number of LC3<sup>+</sup> puncta per cell in the presence of PapMV and rapamycin as compared to untreated cells (Figure 3D). Also, the total surface covered by GFP<sup>+</sup> puncta was larger in treated cells with PapMV and rapamycin (Figure 3E)

*PapMV cross-presentation is dependent on autophagy pathway*

To confirm the implication of autophagy in PapMV MHC class I cross-presentation, we incubated our APCs with 3-MA to inhibit autophagy during the recognition assay. We controlled endocytosis of PapMV in presence of 3-MA, and showed that this inhibitor had no impact on PapMV endocytosis (Figure 4A). Pre-treatment of APC with 2 or 5 mM 3-MA resulted in significant reductions of MHC class I cross-presentation mediated by PapMV VLPs as compared to untreated cells, and as compared to peptide-pulsed APC after similar treatment (Figure 4B).

We also evaluated whether the induction of autophagy prior to the recognition assay would increase the level of IFN- $\gamma$  secretion by specific T lymphocytes. We induced autophagy by pre-treating the cells with 0.1 or 0.05  $\mu$ M of rapamycin (similar to Figure 3); this induction of autophagy in APC down-regulated antigen presentation by PapMV. The effect was within the range observed with external peptide loading and did not affect PapMV internalization (Figure S1A-B). This could be explained by a significant downregulation of surface MHC class I by rapamycin treatment (Figure S1C). We then assessed whether cell starvation was another inducer of autophagy in APC through the mTOR pathway<sup>24</sup>. We incubated APCs for 3 hours in HBSS (Hank's balanced salt solution) during the 6-hour antigen loading and proceeded with the recognition assay described above. Incubation in HBSS for 3 hours induced the lipidation of LC3 in our cells (Figure 4C) and the upregulation of antigen recognition with PapMV, but not with the peptide (Figure 4D). In summary, the data presented in Figure 4 demonstrate that MHC class I cross-presentation by PapMV is inhibited in presence of 3-MA (autophagy induction inhibitor) and is enhanced when the loading occurs under starvation conditions (autophagy activator).

We also used RNA interference as an alternative method to inhibit autophagy. APCs were transduced with lentivirus expressing mAmetrine (fluorescent protein) and shRNA against ATG5 (shATG5) or a scramble shRNA (shSCR). After sorting for mAmetrine<sup>+</sup> cells, we obtained a population of EBV-B cells having a 40-60% knockdown of ATG5 as calculated by immunoblot

densitometry (Figure 5A). Internalization of PapMV was not significantly different between shATG5, shSCR and untransduced cells (Figure 5B). When these cells were pulsed with PapMV for a recognition assay, we observed a significant downregulation of MHC class I cross-presentation with shATG5 compared to shSCR (Figure 5C). Overall, the results presented in Figure 3-5 demonstrate for the first time the implication of autophagy in MHC class I vacuolar cross-presentation.

## Discussion

MHC class I cross-presentation is an essential pathway for the priming of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. When APCs are not infected by pathogens or when cancer antigens are not expressed in APCs, the induction of a cross-presentation using a vaccine platform is an attractive method to improve the uptake and presentation of antigens to prime naive CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and mount an effective cellular immune response. Our data support the PapMV vaccine platform as a very efficient and attractive technology for developing this type of vaccines.

Multiple pathways of MHC class I cross-presentation have been previously described. Some processes depend on the transfer of endocytosed antigens into the cytosol for their degradation by the proteasome and are loaded on MHC class I in the ER (Review in Zehner *et al.*<sup>8</sup>). In our system, epitopes inserted in the PapMV VLP vaccine platform are presented on MHC class I through a proteasome-independent mechanism<sup>3</sup>. In this study, we have demonstrated that MHC class I cross-presentation of PapMV VLPs is also TAP-independent and showed that it is dependent on lysosome and cathepsin S. Many viruses have evolved to inhibit TAP activity to evade anti-viral immune surveillance<sup>25-27</sup>. However, the immune system has developed different MHC class I presentation pathways that do not require TAP activity<sup>28</sup>. Interestingly, some individuals who are deficient in the TAP transporter are still able to present viral associated antigens<sup>29</sup>.

The implication of autophagy in alternative MHC class I antigen presentation has been described in different situations. During the late stages of infection by HSV-1, a novel form of autophagy using the nuclear envelope is implicated in MHC class I antigen presentation<sup>15, 16</sup>. This antigen presentation pathway still requires the MHC class I classical machinery, including proteasome and TAP. In contrast, when using TAP deficient cells, Tey *et al.* demonstrated the existence of a vacuolar MHC class I antigen presentation mechanism dependent on autophagy after active infection with human cytomegalovirus (HCMV)<sup>17</sup>. In our study, we observed the same vacuolar autophagy-dependent pathway, but for cross-presentation, while previous studies required active infection and protein translation for classical MHC class I presentation. We show that starvation-induced autophagy enhances antigen cross-presentation mediated by PapMV VLPs (Figure 4D). In addition, inhibition of autophagy by 3-MA or using ATG5 shRNA

significantly reduces cross-presentation of the epitope inserted in PapMV VLPs (Figure 4B-5C). We concluded that the PapMV nanoparticle vaccine platform induces autophagy in APCs, which consequently enhance MHC class I cross-presentation.

The next question to be addressed is how cathepsin S-generated peptides are able to access MHC class I loading. Several hypotheses were derived from other models. First, because MHC class I is constantly recycled from the cell surface, endo-lysosomes can fuse with recycling endosomes to allow peptide loading on MHC class I<sup>7, 9, 30</sup>. There is also evidence that tubular recycling endosomes can participate in the early stage of autophagosome formation and share their membranes<sup>31</sup>. The second pathway for MHC class I peptide loading is cross-presentation involving exogenous release of newly formed peptides. This form of cross-presentation has been described in immature DCs and CpG-activated DCs<sup>32</sup>. Autophagy can also be an important regulator of this peptide release. Autophagy has been linked to exosome release from apoptotic/autophagic endothelial cells and multivesicular bodies responsible for exosome release and can fuse with autophagosome under autophagic conditions<sup>33, 34</sup>. These lines of evidence suggest that autophagy can be implicated in MHC class I loading in PapMV VLP vacuolar antigen cross-presentation.

In conclusion, we present a novel implication of autophagic complex pathway in MHC class I antigen cross-presentation through a vacuolar process. We also demonstrate that a vaccine platform composed of a chimeric plant VLP is efficiently cross-presented through vacuolar cross-presentation pathway dependent on autophagy. This knowledge can help us to design new vaccine platforms that will have greater autophagy induction properties to promote their cross-presentation by APC and enhance cellular immunity.

## Methods

**Cells and reagents** A T2 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (cat #CRL-1992). EBV-B cells were generated from HLA-A2 normal donor peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with supernatants containing Epstein-Barr virus as previously described<sup>39</sup>. Both cell lines were cultured in RPMI 1640 supplemented (cat #350-000-CL) with 10 % (v/v) fetal bovine serum (cat #080-150), 2 mM L-glutamine (cat #609-065-EL), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (cat #450-201-EL) and 10 µg/ml gentamicin (cat #400-135-UG) (all from Wisent). Rapamycin (cat #553210; Calbiochem) was used at 0.1-1 µM from a stock solution of 10 mM in DMSO (cat #D4540; Sigma). 3-methyladenine (3-MA cat #M9281; Sigma) was prepared in dimethylformamide (cat #D4551; Sigma) at 100 mM stock solution. Cathepsin S inhibitor (cat #219393; Calbiochem) and chloroquine (cat #C6628; Sigma) were prepared in DMSO at 11.7 mM and 100 mM stock solution respectively.

**PapMV VLP preparation** The PapMV M1 and PapMV gp100 VLPs used in this report have been described elsewhere<sup>3</sup>. The sequences of the PapMV clones were confirmed by DNA sequencing.

**shRNA lentivirus production and infection** Specific shRNA targeting the ATG5 was designed based on the sequences reference TRCN0000330394 (sequence: CCTGAACAGAATCATCCTTAA). The non-target scramble control shRNA sequence is (sequence: CAACAAGATGAAGAGCACCAA). As described before, annealed forward and reverse hairpin oligonucleotides were cloned into a modified pLKO.1-TRC1.5 vector where the puromycin-resistance gene was replaced with mAmetrine<sup>40</sup>. Lentiviral particles were produced by cotransfecting in HEK293T cells the shRNA-containing pLKO-mAM vector along with pMD2-VSVG, pMDLg/pRRE, and pRSV-REV, as previously described<sup>40</sup>. Viral supernatants were used to transduce EBV-B and cells were sorted according to mAmetrine fluorescence on a FACS Aria about 1 week after lentivirus transduction. Validation of the knockdown was performed by immunoblot analyses.

**Cross-presentation assay** EBV-Bs or T2s were loaded with PapMV containing M1 or gp100 epitope (PapMV; 25 µg/ml) or 1 µM peptide M1 (GILGFVFTL) or mutated gp100

(IMDQVPFSV) for 6 hours. Cells were washed extensively and cocultured overnight with antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells, generated as previously described<sup>2</sup>. For 4°C control, cells were loaded and washed all on ice. In the assays with chemical inhibitors, cells were pretreated for 1 h with indicated concentrations of inhibitors before adding PapMV M1/gp100 or peptide M1/gp100 without removing the inhibitor for the 6-hour loading. For starvation induction, APCs were first incubated for 3 hours with PapMV or peptide in Hank's balanced salt solution 1x (HBSS; cat #20-021-CV, Wisent) and afterwards for an additional 3 hours in complete medium, again with PapMV or peptide.

**Flow cytometry** EBV-B cells were pretreated with the indicated concentration of the inhibitor for 1 hour. PapMV labeled with Alexa647 fluorochrome, according to the manufacturer's protocol (cat #A20186; Life technologies) was added and cells were incubated for 3 hours. Cells were washed and fluorescence was detected with a LSR Fortessa flow cytometer.

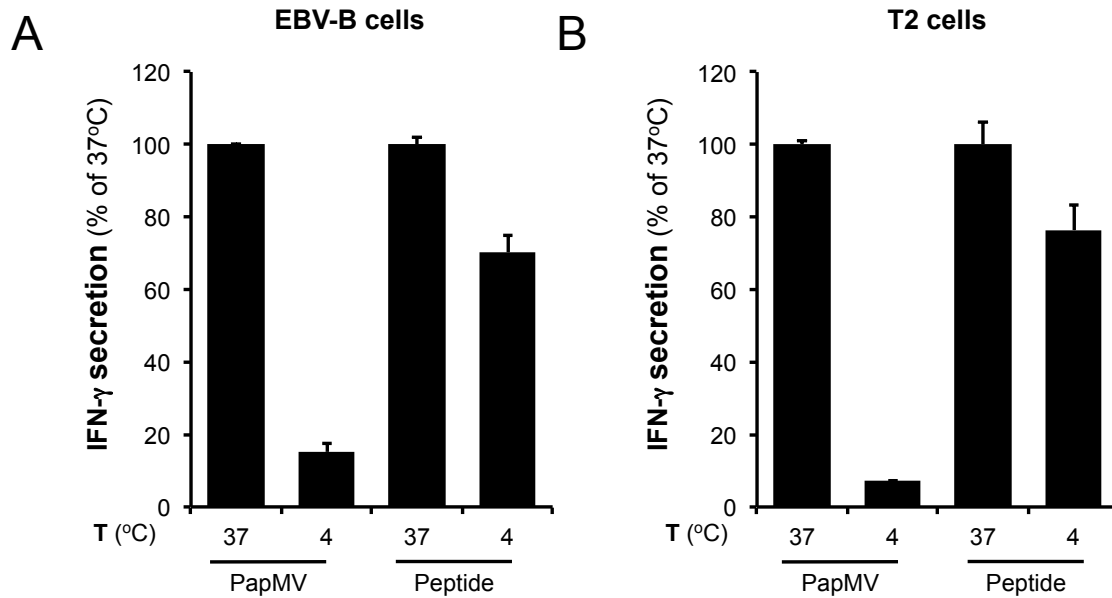
**Immunoblotting** EBV-B cells were treated for 3 hours with PapMV nanoparticles or rapamycin, with or without 5 mM 3-MA pre-treatment. Cells were washed in PBS. Proteins were prepared in the presence of HALT proteinase/phosphatase inhibitors (cat #78440; Thermofisher) from the above-mentioned pelleted cells, quantified by Bio-Rad protein assay (cat #500-0006), resolved on 15% acrylamide SDS-PAGE, and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (cat #162-0177; Bio-Rad). The membranes were incubated with rabbit anti-human LC3B antibody (Ab; 1:3,000) (cat #NB100-2220; Novus Biologicals), rabbit anti-ATG5-specific Ab (cat# 2630S; Cell Signaling) or mouse anti-human  $\beta$ -actin-specific Ab (1:10,000) (cat #MAB1501; Millipore). Membranes were revealed with horseradish peroxidase (HRP)-linked anti-rabbit (cat #AP107P) (1:5,000) or anti-mouse (cat #AP124P) (1:40,000 for  $\beta$ -actin) Abs (Chemicon) followed by ECL prime detection (cat #RPN2232; Amersham) on film. Densitometry was calculated with ImageJ software and indicated as the ratio between the densities of LC3-II band on LC3-I band or the ratio of ATG5 over  $\beta$ -actin band.

**Confocal microscopy** EBV-B cells were transfected with LC3-eGFP plasmid, kind gift of John Brumell; University of Toronto, using a microporator (model #MP-100; Digital Bio) with 100  $\mu$ l Neon kit (cat #MPK10025; Life technologies). One day later, GFP<sup>+</sup> cells were sorted using a BD

Biosciences FACS Aria. Sorted cells were incubated with PapMV-Alexa647 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) or rapamycin (0.1  $\mu\text{M}$ ) for 3 hours. Cells were cytopun using a Cytofuge 2 (model #M801-22; StatSpin) on slides and coverslips were mounted with Prolong gold anti-fade with DAPI (cat #P36941; Life Technologies). Pictures were taken on an Olympus FV100 confocal microscope and analyzed with ImageJ software for LC3-GFP<sup>+</sup> vesicle count and surface quantification.

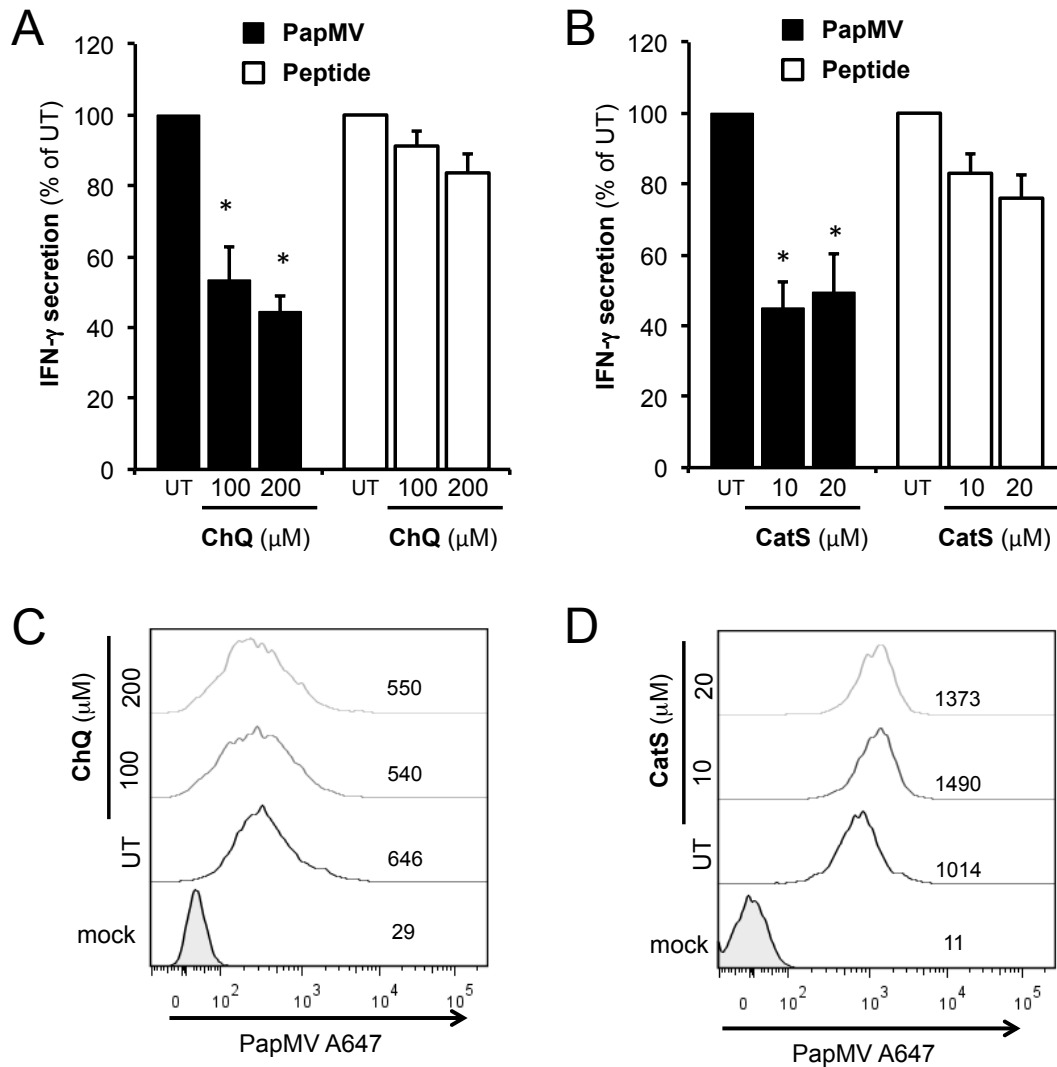


## Figures



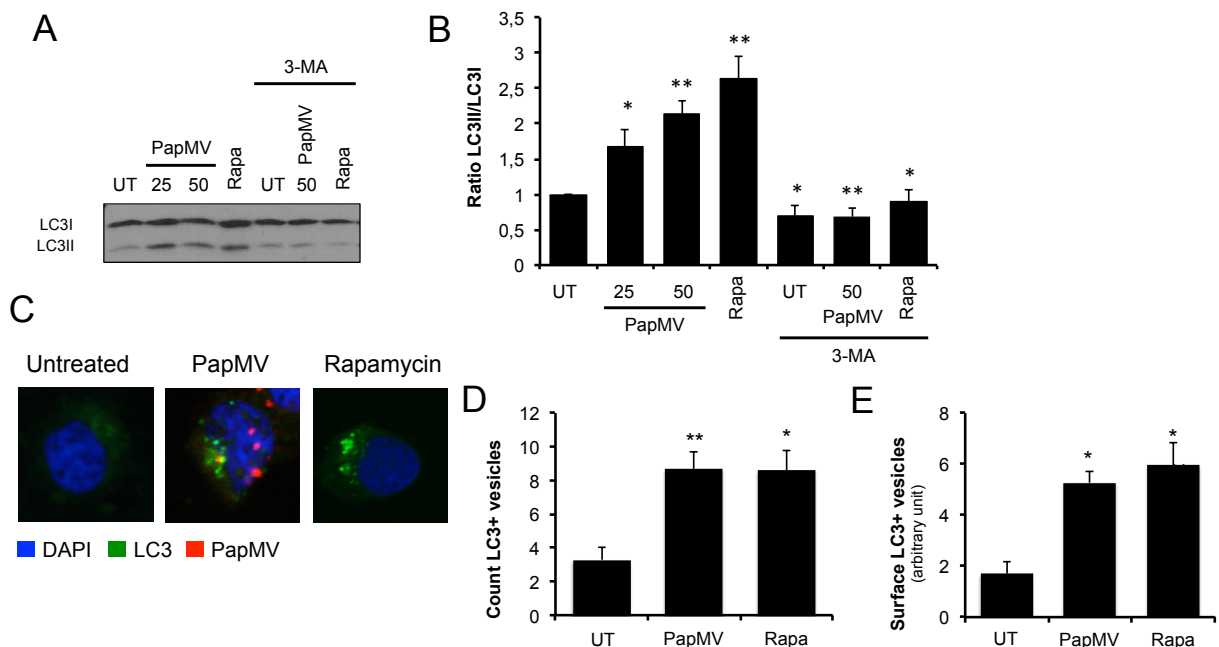
**Figure 16 (Hanafi et al. unpublished Figure 1)** PapMV VLP MHC class I cross-presentation requires active processing which is independent on TAP

**A** EBV-B or **B** T2 cells were loaded with PapMV M1 or M1 peptide for 6 hours at 4°C or 37°C. Cells were then washed and cocultured with M1-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes for 16-18 hours at 1:1 ratio. Supernatants were harvested and IFN- $\gamma$  quantified by ELISA to evaluate MHC class I antigen cross-presentation. Results are represented in mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean) % of IFN- $\gamma$  secretion at 37°C from more than 3 experiments. \*  $p < 0.01$  Significantly lower than 37°C control with PapMV.



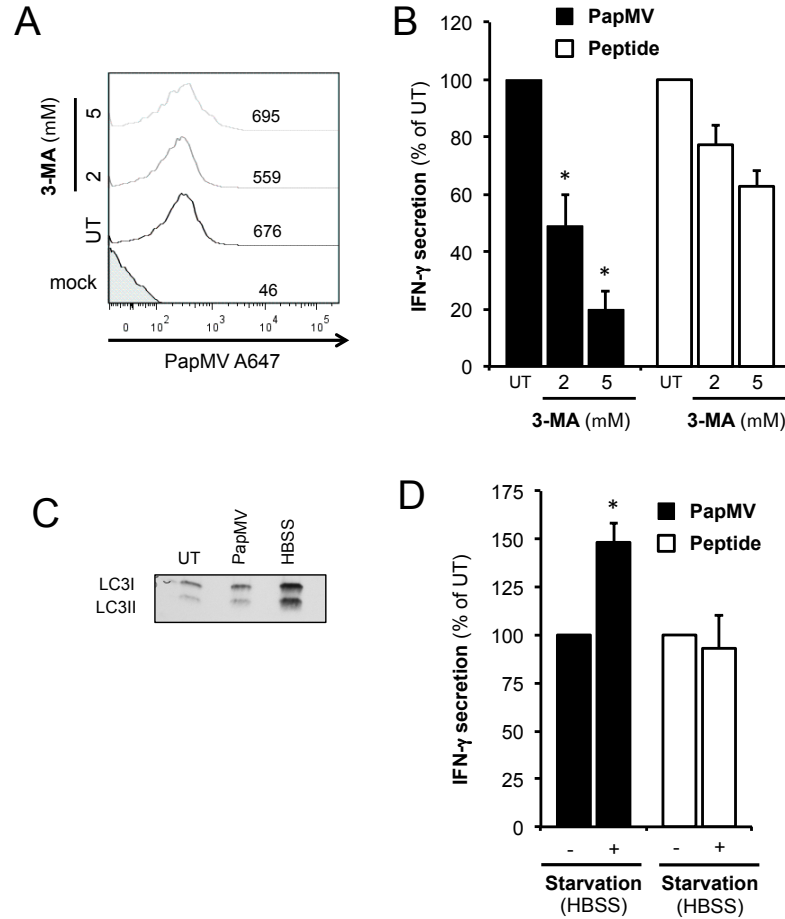
**Figure 17 (Hanafi et al. unpublished Figure 2)** Inhibition of cathepsin S and endocytic acidification abrogated MHC class I cross-presentation mediated by PapMV VLP

EBV-B cells were pretreated for 1 hour with **A-C** chloroquine or **B-D** a cathepsin S specific inhibitor at the indicated concentrations. **A-B** 25 μg/ml PapMV gp100 or 1 μM peptide gp100 was added to pretreated cells without washing and cells were incubated for 6 hours at 37°C. Cells were then washed and cocultured with gp100-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes for 16-18 hours at 1:1 ratio. Supernatants were harvested and IFN-γ quantified by ELISA to evaluate MHC class I antigen cross-presentation. Results are represented in mean +/- SEM % of IFN-γ secretion of untreated cells from more than 5 experiments. \* p<0.01 Significantly lower than peptide control at corresponding inhibitor concentration. **C-D** 10 μg/ml PapMV labeled with Alexa Fluor 647 was added for 3 hours and internalization was assessed by flow cytometry. Histograms represent PapMV internalization and indicated numbers in the graph are the mean fluorescence intensity (MFI). Representative of 3 independent experiments.



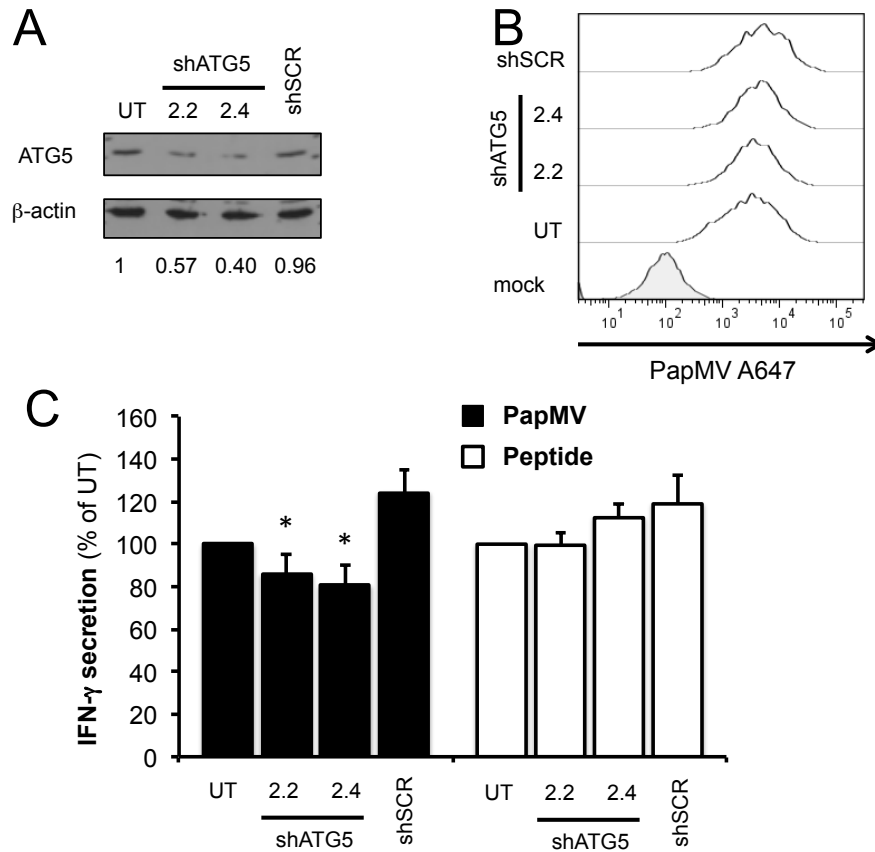
**Figure 18 (Hanafi et al. unpublished Figure 3)** Autophagy is induced in APC following PapMV VLP incubation

**A-B** EBV-B cells were treated 3 hours with PapMV (indicated concentration in  $\mu\text{g/ml}$ ) or rapamycin  $0.1 \mu\text{M}$  with or without 1-hour pre-treatment with  $5 \text{ mM}$  3-MA. Cells were harvested, protein extracted and loaded on 15% SDS-PAGE acrylamide gel and LC3 was revealed by immunoblotting. **B** Ratio of densitometry of LC3II band over LC3I. **C-E** EBV-B cells were transfected with LC3-GFP plasmid and GFP<sup>+</sup> cells were sorted and incubated for 3 hours with PapMV Alexa 647. **C** Pictures of one representative cell per condition (untreated, PapMV or rapamycin) Blue: DAPI, Green: LC3-GFP and Red: PapMV A647. **D-E** Quantification of the number of LC3<sup>+</sup> vesicles per cell (**D**) and the relative surface of LC3<sup>+</sup> vesicles over total cell surface (**E**). Data are from a compilation of over 30 cells per condition and represented as means  $\pm$  SEM.



**Figure 19 (Hanafi et al. unpublished Figure 4)** MHC class I cross-presentation mediated by PapMV VLP is dependent on autophagy induction and is enhanced by starvation-induced autophagy

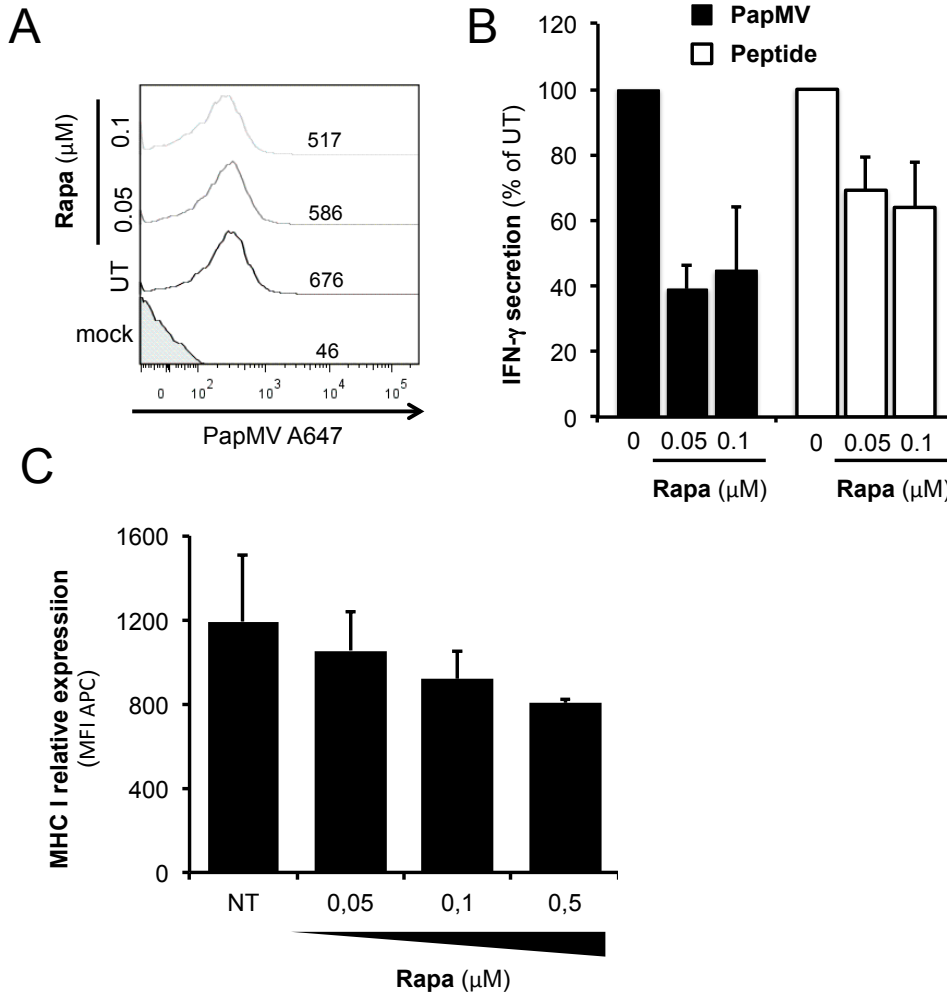
**A-B** EBV-B cells were pretreated for 1 hour with 3-MA at the indicated concentrations and **A** 10  $\mu\text{g/ml}$  PapMV labeled with Alexa Fluor 647 was added for 3 hours before internalization was assessed by flow cytometry. Histograms represent PapMV internalization and indicated numbers in the graph is the MFI. Representative of 3 independent experiments. **C** EBV-B cells were starved for 3 hours in HBSS. Cells were harvested; protein extracted and loaded on 15% SDS-PAGE acrylamide gel. LC3 was revealed by immunoblotting. Histograms represent the ratio of densitometry of LC3II band over LC3I. **D** EBV-Bs were loaded for 3 hours in HBSS, washed and incubated in complete medium for the last 3 hours of loading **B-D** 50  $\mu\text{g/ml}$  PapMV gp100 or 1  $\mu\text{M}$  peptide gp100 was added to pretreated cells without washing and cells were incubated for 6 hours at 37°C. They were then washed and cocultured with gp100-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes for 16-18 hours at 1:1 ratio. Supernatants were harvested and IFN- $\gamma$  quantified by ELISA to evaluate MHC class I antigen cross-presentation. Results represented in mean  $\pm$  SEM % of IFN- $\gamma$  secretion of untreated cells from more than 5 experiments. \*  $p < 0.01$  Significantly lower than peptide control.



**Figure 20 (Hanafi et al. unpublished Figure 5)** Inhibition of ATG5 reduced PapMV VLP mediated MHC class I antigen cross-presentation

EBV-B cells were transduced with lentivirus expressing mAmetrine and shRNA against ATG5 (clone 2.2 and 2.4) and scramble shRNA (shSCR). After expansion of transduced cells, mAmetrine<sup>+</sup> cells were sorted by flow cytometry. **A** ATG5 downregulation was evaluated by immunoblot. Cells were harvested, protein extracted and loaded on 10% SDS-PAGE acrylamide gel. ATG5 and β-actin were revealed by immunoblotting. Numbers represent densitometry of ATG5/β-actin relative to untransduced cells (UT). **B** Alexa Fluor 647-labelled PapMV at 10 μg/ml was added for 3 hours and internalization was assessed by flow cytometry. Histograms represent PapMV internalization. Representative of 3 independent experiments. **C** PapMV gp100 (50 μg/ml) or 1 μM peptide gp100 was added to pretreated cells without washing and cells were incubated for 6 hours at 37°C. They were then washed and cocultured with gp100-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes for 16-18 hours at 1:1 ratio. The supernatants were harvested and IFN-γ quantified by ELISA to evaluate MHC class I antigen cross-presentation. Results represented in mean +/- SEM % of IFN-γ secretion compared to untreated cells from 3 experiments. \* p<0.05 Significantly lower than shSCR control.

## Supplementary figure



**Figure 21 (Hanafi et al. unpublished Figure S1)** Rapamycin treatment reduced MHC class I surface expression and alter antigen presentation in EBV-B cells

**A-C** EBV-B cells were pretreated for 1 hour with rapamycin at indicated concentrations and **A** 10 μg/ml PapMV labeled with Alexa Fluor 647 was added for 3 hours and internalization was assessed by flow cytometry. Histograms represent PapMV internalization and indicated numbers in the graph is the MFI. Representative of 3 independent experiments. **B** EBV-B were loaded with 50 μg/ml PapMV gp100 or 1 μM peptide gp100 was added to pretreated cells without washing and cells were incubated for 6 hours at 37°C. They were then washed and cocultured with gp100-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes for 16-18 hours at 1:1 ratio. Supernatants were harvested and IFN-γ quantified by ELISA to evaluate MHC class I antigen cross-presentation. Results represented in % of IFN-γ secretion of untreated cells from more than 5 experiments. **C** After rapamycin pre-treatment EBV-B cells were labeled with anti-HLA-ABC antibody. Surface MHC class I molecule is represented by MFI of anti-HLA-ABC antibody.

## **Acknowledgements**

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Financial support: R.L. and L.A.H. are recipients of scholarships from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). We thank Anne Monette for text editing and we also thank Kathe Lieber from the CRCHUM “*Bureau d’aide à la recherche*” for the final text editing.

## References

1. Pushko P, Pumpens P, Grens E. Development of virus-like particle technology from small highly symmetric to large complex virus-like particle structures. *Intervirology* 2013; 56:141-65.
2. Hanafi LA, Bolduc M, Gagne ME, Dufour F, Langelier Y, Boulassel MR, et al. Two distinct chimeric potexviruses share antigenic cross-presentation properties of MHC class I epitopes. *Vaccine* 2010; 28:5617-26.
3. Leclerc D, Beauseigle D, Denis J, Morin H, Pare C, Lamarre A, et al. Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells. *Journal of virology* 2007; 81:1319-26.
4. Moffat JM, Cheong WS, Villadangos JA, Mintern JD, Netter HJ. Hepatitis B virus-like particles access major histocompatibility class I and II antigen presentation pathways in primary dendritic cells. *Vaccine* 2013; 31:2310-6.
5. Di Bonito P, Grasso F, Mochi S, Petrone L, Fanales-Belasio E, Mei A, et al. Anti-tumor CD8+ T cell immunity elicited by HIV-1-based virus-like particles incorporating HPV-16 E7 protein. *Virology* 2009; 395:45-55.
6. Win SJ, Ward VK, Dunbar PR, Young SL, Baird MA. Cross-presentation of epitopes on virus-like particles via the MHC I receptor recycling pathway. *Immunology and cell biology* 2011; 89:681-8.
7. Di Pucchio T, Chatterjee B, Smed-Sorensen A, Clayton S, Palazzo A, Montes M, et al. Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nature immunology* 2008; 9:551-7.
8. Zehner M, Burgdorf S. Regulation of antigen transport into the cytosol for cross-presentation by ubiquitination of the mannose receptor. *Molecular immunology* 2013; 55:146-8.
9. Basha G, Lizee G, Reinicke AT, Seipp RP, Omilusik KD, Jefferies WA. MHC class I endosomal and lysosomal trafficking coincides with exogenous antigen loading in dendritic cells. *PloS one* 2008; 3:e3247.
10. Fiegl D, Kagebein D, Liebler-Tenorio EM, Weisser T, Sens M, Gutjahr M, et al. Amphisomal route of MHC class I cross-presentation in bacteria-infected dendritic cells. *J Immunol* 2013; 190:2791-806.
11. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature reviews Immunology* 2013; 13:722-37.
12. Puleston DJ, Simon AK. Autophagy in the immune system. *Immunology* 2014; 141:1-8.
13. Wu C, Aichinger M, Nedjic J, Klein L. Thymic epithelial cells use macroautophagy to turn their inside out for CD4 T cell tolerance. *Autophagy* 2013; 9:931-2.
14. Aichinger M, Wu C, Nedjic J, Klein L. Macroautophagy substrates are loaded onto MHC class II of medullary thymic epithelial cells for central tolerance. *The Journal of experimental medicine* 2013; 210:287-300.
15. English L, Chemali M, Desjardins M. Nuclear membrane-derived autophagy, a novel process that participates in the presentation of endogenous viral antigens during HSV-1 infection. *Autophagy* 2009; 5:1026-9.
16. English L, Chemali M, Duron J, Rondeau C, Laplante A, Gingras D, et al. Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nature immunology* 2009; 10:480-7.



17. Tey SK, Khanna R. Autophagy mediates transporter associated with antigen processing-independent presentation of viral epitopes through MHC class I pathway. *Blood* 2012; 120:994-1004.
18. Salter RD, Howell DN, Cresswell P. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* 1985; 21:235-46.
19. Gromme M, Neefjes J. Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Molecular immunology* 2002; 39:181-202.
20. Gromme M, Uytdehaag FG, Janssen H, Calafat J, van Binnendijk RS, Kenter MJ, et al. Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96:10326-31.
21. McCoy KL, Schwartz RH. The role of intracellular acidification in antigen processing. *Immunological reviews* 1988; 106:129-47.
22. Rock KL, Farfan-Arribas DJ, Shen L. Proteases in MHC class I presentation and cross-presentation. *J Immunol* 2010; 184:9-15.
23. Shen L, Sigal LJ, Boes M, Rock KL. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 2004; 21:155-65.
24. Shang L, Chen S, Du F, Li S, Zhao L, Wang X. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108:4788-93.
25. Rensing ME, Luteijn RD, Horst D, Wiertz EJ. Viral interference with antigen presentation: trapping TAP. *Molecular immunology* 2013; 55:139-42.
26. Hansen SG, Powers CJ, Richards R, Ventura AB, Ford JC, Siess D, et al. Evasion of CD8+ T cells is critical for superinfection by cytomegalovirus. *Science* 2010; 328:102-6.
27. Croft NP, Shannon-Lowe C, Bell AI, Horst D, Kremmer E, Rensing ME, et al. Stage-specific inhibition of MHC class I presentation by the Epstein-Barr virus BNLF2a protein during virus lytic cycle. *PLoS pathogens* 2009; 5:e1000490.
28. Oliveira CC, van Hall T. Importance of TAP-independent processing pathways. *Molecular immunology* 2013; 55:113-6.
29. de la Salle H, Houssaint E, Peyrat MA, Arnold D, Salamero J, Pinczon D, et al. Human peptide transporter deficiency: importance of HLA-B in the presentation of TAP-independent EBV antigens. *J Immunol* 1997; 158:4555-63.
30. Zou L, Zhou J, Zhang J, Li J, Liu N, Chai L, et al. The GTPase Rab3b/3c-positive recycling vesicles are involved in cross-presentation in dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106:15801-6.
31. Longatti A, Lamb CA, Razi M, Yoshimura S, Barr FA, Tooze SA. TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *The Journal of cell biology* 2012; 197:659-75.
32. Chen L, Jondal M. Alternative processing for MHC class I presentation by immature and CpG-activated dendritic cells. *European journal of immunology* 2004; 34:952-60.
33. Fader CM, Colombo MI. Multivesicular bodies and autophagy in erythrocyte maturation. *Autophagy* 2006; 2:122-5.
34. Pallet N, Sirois I, Bell C, Hanafi LA, Hamelin K, Dieude M, et al. A comprehensive characterization of membrane vesicles released by autophagic human endothelial cells. *Proteomics* 2013; 13:1108-20.

35. Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer research* 2003; 63:2836-43.
36. Matheoud D, Moradin N, Bellemare-Pelletier A, Shio MT, Hong WJ, Olivier M, et al. *Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell host & microbe* 2013; 14:15-25.

## Chapitre 3 : Inhibition de l'IDO par la fludarabine

Fludarabine downregulates indoleamine 2,3-dioxygenase in tumors via a proteasome-mediated degradation mechanism

PLoS ONE, 2014 June 9<sup>th</sup>; 9(6) : e99211

*L.-A. Hanafi (Figure 5-6 et S1 du manuscrit), J. Godin-Ethier (Figure 2 et S2 du manuscrit) et D. Gauchat (Figure 1, 3A, 4 et S3 du manuscrit) sont responsables de la majorité de la réalisation des travaux de recherche. L.-A. Hanafi est la principale responsable de la rédaction de cet article. D. Possamaï a fourni une contribution technique pour la réalisation d'immunobuvardage de type Western de la protéine IDO (Figure S1 du manuscrit). J.-B. Duvignaud et D. Leclerc ont apporté une contribution technique pour les expériences de HPLC (Figure 3B et S3A du manuscrit). N. Grandvaux a participé à la planification expérimentale et l'apport d'anticorps pSTAT1. R. Lapointe a supervisé l'ensemble de l'étude.*

## **Fludarabine downregulates indoleamine 2,3-dioxygenase in tumors via a proteasome-mediated degradation mechanism**

Laïla-Aïcha Hanafi<sup>a</sup>, Dominique Gauchat<sup>a</sup>, Jessica Godin-Ethier<sup>a</sup>, David Possamai<sup>a</sup>, Jean-Baptiste Duvignaud<sup>b,c</sup>, Denis Leclerc<sup>b</sup>, Nathalie Grandvaux<sup>d</sup>, and Réjean Lapointe<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Université de Montréal and Institut du Cancer de Montréal

<sup>b</sup>Centre de recherche en infectiologie, Centre hospitalier universitaire de Québec and Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université Laval,

<sup>c</sup>PROTEO, Université Laval

<sup>d</sup>Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and Département of Biochemistry, Université de Montréal

To whom correspondence should be addressed: Réjean Lapointe,

## **Abstract**

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is found in multiple malignancies and exerts immunosuppressive effects that are central in protecting tumors from host T lymphocyte rejection. IDO is an enzyme involved in the catabolism of tryptophan resulting in inhibition of T lymphocyte function. While inhibition of IDO enzymatic activity results in tumor rejection, it is still unknown how we can directly target IDO expression within tumors using drugs. We have chosen to interfere with IDO expression by targeting the key-signaling event signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1). We evaluated the efficacy of fludarabine, previously described to inhibit STAT1 phosphorylation. Interestingly, fludarabine was efficient in suppressing protein expression and consequently IDO activity in two different cell lines derived from breast cancer and melanoma when IDO was activated with interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) or supernatants prepared from activated T lymphocytes. However, fludarabine had no inhibitory effect on STAT1 phosphorylation. Other IFN- $\gamma$ -responsive genes were only marginally inhibited by fludarabine. The level of IDO transcript was unaffected by this inhibitor, suggesting the involvement of post-transcriptional control. Strikingly, we have found that the inhibition of proteasome partially protected IDO from fludarabine-induced degradation, indicating that fludarabine induces IDO degradation through a proteasome-dependent pathway. Currently used in the clinic to treat some malignancies, fludarabine has the potential for use in the treatment of human tumors through induction of IDO degradation and consequently, for the promotion of T cell-mediated anti-tumor response.

**Keywords:** Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), fludarabine (purine analog), enzyme inhibitor, proteasome, immunosuppression

## Introduction

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is an enzyme involved in the catabolism of tryptophan affecting several immunoregulatory functions such as fetal protection [1], allograft tolerance and cancer progression [2]. IDO's immunosuppressive activity is due to decreased tryptophan availability and the generation of tryptophan metabolites, culminating in multi-pronged negative effects on T lymphocytes in proximity to IDO-expressing cells, such as inhibition of proliferation, effector functions and cell survival. IDO, which was developed as a key negative controller of anti-tumor T lymphocytes [3], is upregulated in response to activated T lymphocytes [4], and promotes the development of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes [5]. Consequently, inhibitors of IDO enzymatic activity have great therapeutic potential and some are currently being evaluated in clinical trials. The classic IDO inhibitor is 1-methyltryptophan (1-MT) [6]. However, it has been shown that the 1-D-MT isomer upregulates IDO1 in human cancer cells *in vitro* [7], and this upregulation can circumvent the enzymatic inhibitory effect of 1-MT. In addition, cancer cells may evolve to become resistant to this competitive inhibitor. Therefore, a more effective inhibitor is currently being tested in the clinic [8]. These approaches all target IDO activity directly, and there are only a few investigations aimed to target IDO expression pathways and stability.

IDO is usually expressed in antigen presenting cells such as dendritic cells and serves as a counter-regulatory mechanism to modulate immune responses [9]. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) has been identified as one of the main IDO inducers in multiple cell types [10]. We thus speculated that the IFN- $\gamma$  signaling pathway leading to IDO expression could be targeted for altering IDO expression in the cancer microenvironment. Accordingly, different natural compounds can modulate IDO expression. For example, curcumin [11], green tea [12], resveratrol [13] and rosemary [14] can downregulate IDO by inhibiting the JAK-STAT kinase pathway. This pathway is thus an important target for modulation of IDO expression. In this report, we study fludarabine, a compound used for the treatment of some hematological malignancies such as chronic lymphocytic leukemia (CLL) [15]. Fludarabine has been shown to downregulate signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) activation [16]. In our study, we confirm fludarabine's effect on IDO protein levels and its activity in tumor cell lines. Interestingly,

although fludarabine reportedly inhibits STAT1 phosphorylation in normal and cancer cells [17,18], the signaling cascade leading to IDO expression remained unaltered in our system. We further established that fludarabine-mediated IDO downregulation occurs through a proteasome-dependent degradation pathway.

## Material and Methods

*Ethics statement* – This entire study including methods, obtaining of patient cell lines, blood and the written informed consent procedure was approved by the Ethics Committee of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Written informed consent was obtained from each healthy donor and patient prior to the collection of tumor specimens and blood samples. The patients and healthy donors have consent for their data to be use in research purposes. The consents and all other data were kept in confidentiality anonymously numbered.

*Normal donors, patients and cell lines* – 624.38mel cells were obtained from the NIH Surgery branch. 624.38mel is a clone selected from melanoma cell line 624 for its high expression of HLA-A2 molecules on its cell surface [19]. The written consent from the patient was obtained at the time of the establishment of the 624 cell line at the NIH Surgery branch. MDA-231 cell line was obtained from the ATCC. Both cell lines were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10 % fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 10 µg/ml gentamicin (all from Wisent). Heparinized blood, obtained from healthy donors by leukapheresis, was centrifuged on lymphocyte separation medium (Wisent) to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Healthy donors were recruited by the Division of Hematology and Immunodeficiency Service of Royal Victoria Hospital (Dr Jean-Pierre Routy). Clinical samples were obtained from the *Banque de tissus et de données* of the *Réseau de recherche sur le cancer* of the *FRQ-S*, affiliated with the Canadian Tumour Repository Network (CTRNet). Freshly resected breast tumor samples were briefly stored in Iscove's modified Dulbecco's medium (Life technologies) prior to culture of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) as previously described [4].

*Reagents* – L-tryptophan, 1-methyl D,L-tryptophan (1-MT) and kynurenine (all from Sigma-Aldrich) were prepared in distilled water. IFN- $\gamma$  and interleukin (IL)-13 (Peprotech) were resuspended in Iscove's Modified Dulbecco's medium. Bortezomib (Selleck Chemicals), cycloheximide (Calbiochem) and fludarabine (TOCRIS Biosciences) were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO). 6-thioguanine, azathioprine and 5-fluorouracil (all from Sigma) were all prepared at 50 mg/ml in NaOH 1M, NH<sub>4</sub>OH 1M and DMSO, respectively.



*Induction of IDO in cancer cell lines* – Cancer cell lines were activated with 50 U/ml of IFN- $\gamma$ , anti-CD3- or IgG2a-activated TIL or PBMC supernatants, as described previously [4]. Cells were harvested 30-60 min after activation for phospho-STAT1 and -STAT6 quantification, and after 24 h for IDO reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), or IDO, STAT1, STAT6 and  $\beta$ -actin immunoblotting.

*RNA interference* – STAT1 was silenced in MDA-231 cells by using small interfering RNA (siRNA) at 5  $\mu$ M (STAT1-RNAi sense 5'-(P)CUACGAACAUGACCCUAUCUU-3', anti-sense 5'-(P)GAUAGGGU CAUGUUCGUAGUU-3', Dharmacon, ThermoFisher Scientific) transfected with Dharmafect2 reagent according to the manufacturer's instructions. siGenome non-targeting RNApool2 (Dharmacon) served as controls at the same concentration. Proteins were extracted after 48 h and analyzed by immunoblotting.

*Assessment of IDO stability* – MDA-231 cells were plated at  $2 \times 10^5$  cells/well in 12-well plate. Cells were then incubated for 24 h with 100  $\mu$ M fludarabine or with DMSO as control (fludarabine pre-treatment). The cells were washed and incubated with indicated concentration of bortezomib or DMSO as control for 1 h. IDO was induced with 50 U/ml of IFN- $\gamma$ . Approximately 24 h after activation, proteins were extracted and IDO revealed by immunoblot. To specifically assess IDO half-life, MDA-231 cells were plated at  $2 \times 10^5$  cells/well in 12-well plates and activated for 24 h with 50 U/ml IFN- $\gamma$ . Cells were washed and treated with 100  $\mu$ M of cycloheximide with or without 100  $\mu$ M fludarabine. IDO protein stability was assessed between 0 and 24 h of incubation by immunoblot analysis.

*Proteasomal activity assay* – MDA-231 were treated with various concentrations of fludarabine (10-200  $\mu$ M) for 24 h with or without 50 U/ml of IFN- $\gamma$ . Cells were harvested and plated at  $2.5 \times 10^4$  cells/well in white-bottom 96-well plates. Bortezomib was added at 50 nM as negative control for 1 h. Proteasome-Glo chymotrypsin-like cell-based assay reagent was added according to manufacturer instructions (Promega). Luminescence was quantified with the Synergy 4 microplate reader (BioTek).

*RT-PCR* – RNA from cancer cell lines was extracted by RNeasy™ micro kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. For quantitative RT-PCR analysis, cDNA was synthesized from mRNA with oligo-dT and random hexamers (both from Applied Biosystems), using the Omniscript reverse transcriptase kit (Qiagen). RT-PCR was performed as previously described [4].

*Immunoblotting* – Proteins were prepared in the presence of HALT proteinase/phosphatase inhibitors (ThermoFisher) from the above-mentioned pelleted cells, quantified, resolved on 10 % SDS-PAGE, and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad). The membranes were incubated with anti-human IDO antibody (Ab) (Hycult Biotechnology) or anti-human  $\beta$ -actin-specific mouse monoclonal Ab (Chemicon) [4]. For total STAT1, and Y701 or S727 phosphorylated forms, proteins were resolved on 7.5 % SDS-PAGE, incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal Ab (anti-STAT1, anti-Y701 and anti-S727 phospho-STAT1, all from Cell Signaling). IDO antibody specificity was confirmed using a plasmid encoding IDO which was transfected into MDA-231 cells using lipofectamine and plus reagent following manufacturer's instructions (Life technologies; Figure S1).

*IDO activity assay* – IDO activity was evaluated as previously described [20]. Briefly, MDA-231 and 624.38mel were plated at  $5 \times 10^4$  cells/well in 48-well plates, treated for 24 h with 100  $\mu$ M fludarabine or with DMSO as control, washed and stimulated with 50 U/ml IFN- $\gamma$ . Approximately 24 h after activation, the cells were washed and re-suspended in Hank's balanced salt solution (HBSS; Wisent) containing 100  $\mu$ M L-tryptophan and/or 500  $\mu$ M 1-MT. Cells were then incubated for an additional 4 h, before harvesting of the supernatant and removal of cell debris by centrifugation. Tryptophan and kynurenine were quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) [20]. IDO activity was presented as micromolar concentration of kynurenine converted from tryptophan in samples.

*Flow cytometry* – Non-specific binding sites were blocked with human gamma globulin (Jackson ImmunoResearch). Dead cells were eliminated from the analysis by staining with Live/Dead® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Life technologies). Cells were stained for 30 min at 4 °C with the following fluorescent dye-conjugated monoclonal Ab – human leukocyte antigen (HLA)-A, -

B, -C allophycocyanin (APC), and programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1), phycoerythrin-Cy7 (PE-Cy7) (both from BD Biosciences) – and washed in staining buffer (PBS containing 0.5 % BSA and 0.1 % NaN<sub>3</sub>). Flow cytometry data were acquired by LSR Fortessa cell analyzer with DIVA software (BD Biosciences). Mean fluorescence intensity (MFI) was calculated on cells stained positively with specific conjugated Ab.

## Results

*STAT1 is involved in IDO expression* – We evaluated whether the classical signaling pathways of IFN- $\gamma$  (STAT1) and IL-13 (STAT6) were activated in tumor cells following culture in activated lymphocyte-conditioned medium. As shown in Figure S2, MDA-231 breast tumor cells exposed to IFN- $\gamma$  or IL-13 induced phosphorylation of STAT1 and STAT6, respectively. However, only STAT1 was phosphorylated upon stimulation with activated T lymphocytes. To further mechanistically confirm the link between STAT1 and IDO expression, we silenced STAT1 in the MDA-231 cancer cell line by siRNA (Figure 1). In the absence of STAT1, IDO upregulation was abrogated after IFN- $\gamma$  treatment or exposure to supernatants prepared from activated TIL. This was specific to STAT1 shutdown as IDO was normally upregulated under the same conditions with control (scrambled) siRNA. Therefore, our results confirm that inhibition of IDO expression can be obtained through abrogation of STAT1 engagement.

*Fludarabine decreases IDO expression through a STAT1-independent process* – Fludarabine was previously found to inhibit STAT1 phosphorylation in stimulated PBMC (Figure 2A) [16] and in smooth muscle cells [17,21] as well as in renal cell carcinoma [18]. Interestingly, when we pre-treated the MDA-231 breast cancer cell line with a similar amount of fludarabine, IDO upregulation by IFN- $\gamma$  was reduced (Figure 2B). Furthermore, fludarabine also inhibited IDO expression in a breast cancer cell line exposed to supernatants prepared with anti-CD3-activated TIL from two different breast cancer samples (Figure 2B) and in a melanoma cell line treated with supernatants prepared from anti-CD3-activated T lymphocytes (Figure 2C).

We evaluated whether IDO inhibition by fludarabine occurred at the stage of STAT1 phosphorylation. Unexpectedly, fludarabine treatment had no consistent effect on STAT1 protein expression level and phosphorylation (Figure 2). When we pre-treated MDA-231 (Figure 2B) and 624.38mel (Figure 2C) with fludarabine, we consistently observed the loss of IDO upregulation in response to IFN- $\gamma$  or activated T lymphocyte supernatants. However, fludarabine had no negative effect on STAT1 phosphorylation at either Y701 or S727 sites (Figure 2B-C). In fact, we observed an upregulation of S727 phosphorylation in MDA-231 by fludarabine treatment in

presence or absence of IFN- $\gamma$  stimulation (Figure 2B).

*Fludarabine inhibits IDO activity independently of mRNA levels* – We then investigated whether fludarabine impacts IDO at the transcriptional level. As depicted in Figure 3A, IDO mRNA was clearly upregulated by IFN- $\gamma$  as expected, but fludarabine had no inhibitory effect, demonstrating that it does not affect IDO at the transcriptional level or during upstream IDO signaling events. This further suggests that fludarabine affects IDO at the protein level.

We next evaluated whether this decrease in IDO protein levels correlates with decreased IDO enzymatic activity. MDA-231 and 624.38mel were again pre-treated with fludarabine, and then exposed to IFN- $\gamma$ . IDO activity was assessed by evaluating the production of kynurenine, a metabolite of tryptophan degradation by IDO. As shown in Figure 3B, fludarabine had a strong inhibitory effect on kynurenine production. Our positive control, 1-MT, a classical inhibitor of IDO enzymatic activity [6], also has a negative effect on kynurenine production (Figure 3B).

In summary, fludarabine had a clear limiting effect on IDO upregulation and activity in response to stimulated T lymphocytes and IFN- $\gamma$ , but not one acting via the STAT1 signaling pathways (expression or phosphorylation) or at the level of IDO transcription.

*Expression levels of other IFN- $\gamma$ -responsive genes are not affected by fludarabine* – We next investigated whether fludarabine affects the expression of other IFN- $\gamma$ -responsive genes, such as the MHC I and PD-L1 genes [22]. Surprisingly, fludarabine had no negative effect on PD-L1 expression in MDA-231 and 624.38mel cells (Figure 4A). Furthermore, MHC I expression, as evaluated using a pan-specific antibody, was not negatively impacted by fludarabine in MDA-231 (Figure 4B), despite increases being observed in 624.38mel.

*The downregulation of IDO by fludarabine is higher compared to other nucleoside analogs* – We next evaluated whether other nucleoside analogs had similar effects on IDO. As presented in Figure 5, 6-thioguanine [23], azathioprine [24] and 5-fluorouracil [25] were tested at three different documented concentrations, though none of these showed an inhibitory effect on

IDO protein levels that was comparable to that by fludarabine. However, a significant downregulation of IDO protein expression was noted with azathioprine (Figure 5B).

*Fludarabine leads to IDO degradation through a proteasome-dependent pathway* – We first determined if fludarabine inhibitory effect on IDO protein expression could be obtained after induction with IFN- $\gamma$ . We upregulated IDO with IFN- $\gamma$  for 24 hours and then treated with fludarabine. Similarly to our pre-treatment experiments, we observe a decrease in IDO starting at 15 hours of post-treatment with fludarabine (Figure 6A). To evaluate the effects of fludarabine on IDO stability we performed experiments by treating MDA-231 with a proteasome inhibitor (bortezomib [26,27]). Cells were pre-treated with fludarabine or DMSO as a control. They were then stimulated with IFN- $\gamma$  in presence or absence of bortezomib, and IDO protein levels were analyzed by immunoblotting. As illustrated in Figure 6B, bortezomib restored IDO protein in a dose-dependent manner in fludarabine pre-treated cells. Also, bortezomib appeared to enhance IDO induction by IFN- $\gamma$  in the absence of fludarabine, indicating that a proteasome-dependent degradation process finely regulates IDO stability. This degradation is increased in the presence of fludarabine [28]. We investigated whether fludarabine directly impacted proteasome activity. For this, we performed a chemiluminescence-based assay of proteasome activity, and detected an upregulated proteasomal activity in MDA-231 cells pre-treated with various fludarabine concentrations with or without IFN- $\gamma$  (Figure 6C). This upregulation was measured at all concentrations in absence of IFN- $\gamma$ . In addition, we observed a fludarabine-dependent upregulation of proteasome activity with the IFN- $\gamma$  treatment as compared to untreated cells, and further upregulation using fludarabine at 100  $\mu$ M in presence of IFN- $\gamma$ . Finally, we performed an IDO protein stability assay to assess the accelerated degradation rate in presence of fludarabine. In Figure 6D-E, we observed that IDO protein became undetectable by immunoblotting at 15 h when using cycloheximide to block translation. In presence of fludarabine, this threshold was reached after only 9 h. We therefore conclude that fludarabine reduces IDO stability by accelerating its degradation.

## Discussion

In this study, we aimed to inhibit IDO expression induced by IFN- $\gamma$  by targeting STAT1 signaling in cancer cell lines. We first confirmed that IDO expression in our cancer cell line model was dependent on STAT1 signaling following exposure to IFN- $\gamma$  or CD3-activated T lymphocyte supernatant. The use of fludarabine, a known inhibitor of STAT1 phosphorylation, strikingly reduced IDO protein levels. However, this inhibition was STAT1-independent. We also demonstrated that the inhibition was indeed at the protein level, because IDO mRNA was not affected by fludarabine. Finally, we established that IDO was sensitive to proteasomal degradation and that fludarabine enhanced such degradation leading to reduced protein levels.

First, we demonstrated the importance of STAT1 in IFN- $\gamma$  signaling upstream of IDO expression in tumor cell lines. We have previously demonstrated that IDO expression in tumor cell lines is under the control of cytokines produced by activated T lymphocytes and that IL-13 has the capacity to repress IFN- $\gamma$ -dependent induction of IDO [4]. It is thus clear that STAT1 is phosphorylated in tumors in response to IFN- $\gamma$  but also when exposed to activated T lymphocytes. We concluded that the STAT1 is the dominating pathway in cancer cell lines following their interaction with activated T lymphocytes.

Furthermore, although IDO expression depends on IFN- $\gamma$  in multiple cell types, this is the first demonstration of STAT1 signaling involvement in a tumor cell line. Interestingly, STAT1 phosphorylation has been previously reported to be essential for IDO expression in CD19<sup>+</sup> splenic dendritic cells in mice, but not following IFN- $\gamma$  stimulation [29]. Still, we wanted to inhibit STAT1 phosphorylation and impair signaling leading to IDO expression with a chemical compound suitable for clinical application. To specifically target the STAT1 pathway, we chose fludarabine, a purine analog used as a chemotherapeutic agent in CLL [30] and hematopoietic tumors. It is also used as part of the cocktail in combination with cyclophosphamide as a non-myeloablative lymphodepletive regimen prior to the efficient treatment of melanoma patients by adoptive TIL transfer [31,32]. Fludarabine was initially used in this study for its inhibitory effect on STAT1 phosphorylation in other cell types [16-18]. However, the results showed that IDO is

downregulated in a STAT1-independent manner, which contradicts previous reports in a human lens epithelial cell line where fludarabine suppressed STAT1 phosphorylation [33]. Interestingly, another group has already reported that STAT1 expression was not affected by fludarabine in PBMC from CLL patients [34]. This confirmed that certain neoplastic cells respond differently to fludarabine treatment. In this study, we demonstrated a reproducible post-transcriptional inhibition of IDO with fludarabine in MDA-231 and 624.38mel cells, and also in the kidney cancer cell line, KTCL (Figure S3).

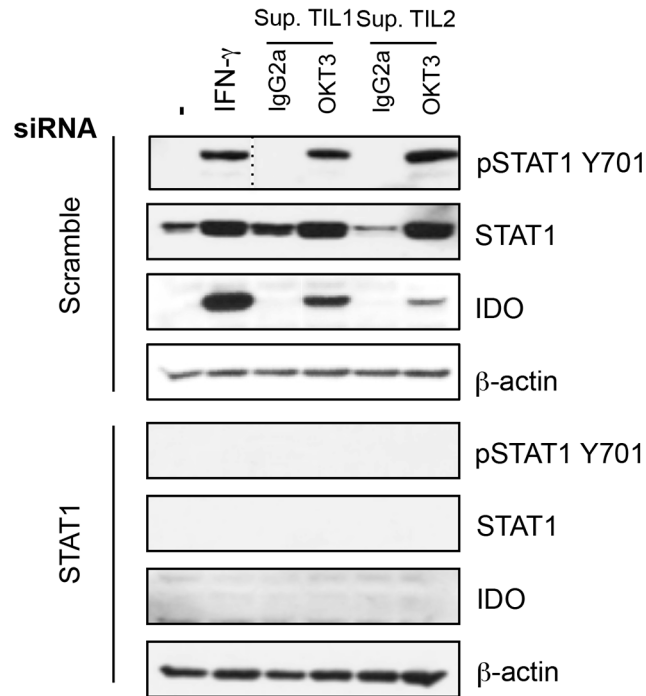
Finally, the mechanism of IDO inhibition by fludarabine may be due to an enhanced proteasomal activity. Control of IDO levels has previously been observed in the context of SOCS3 signaling leading to proteasomal degradation [28,35]. Also, sodium butyrate has been described to inhibit STAT1 signaling and to upregulate IDO ubiquitination in human nasopharyngeal cancer cell lines [36]. While the main strategy currently envisioned to tackle IDO clinically is by inhibiting its enzymatic activity [37], our study demonstrates that IDO is sensitive to proteasomal degradation, which can be enhanced with fludarabine. Enhancing IDO degradation is an interesting alternative and a complementary approach to the enzymatic inhibition of IDO. Our study has established that inhibition of IDO is induced by IFN- $\gamma$  stimulation. It will be interesting to define the impact of fludarabine on cancer cells constitutively expressing IDO, since the inhibition we report herein is a post-transcriptional one. Imatinib was used to repress constitutively expressed IDO in GIST [38], and fludarabine may be also useful in this context. Furthermore, as IDO also displays regulatory signaling capacity independent of its enzymatic activity [39,40], targeting IDO at the protein level not only reduces its enzymatic activity, but also prevents the long-term immune-suppressive impact of IDO-driven TGF- $\beta$  signaling.

In conclusion, considering that fludarabine impairs T cell dependent IDO upregulation, its use in pre-treatment of patients prior to immunotherapies involving a T cell response can potentially prevent IDO upregulation, thereby curtailing this immuno-suppressive mechanism. Our data suggest that fludarabine used in the context of non-myeloablative lymphodepletive regimens in multiple immune-therapeutic protocols [41,42] may involve a blockage of IDO activity through proteasomal degradation. The combination of fludarabine with other IDO



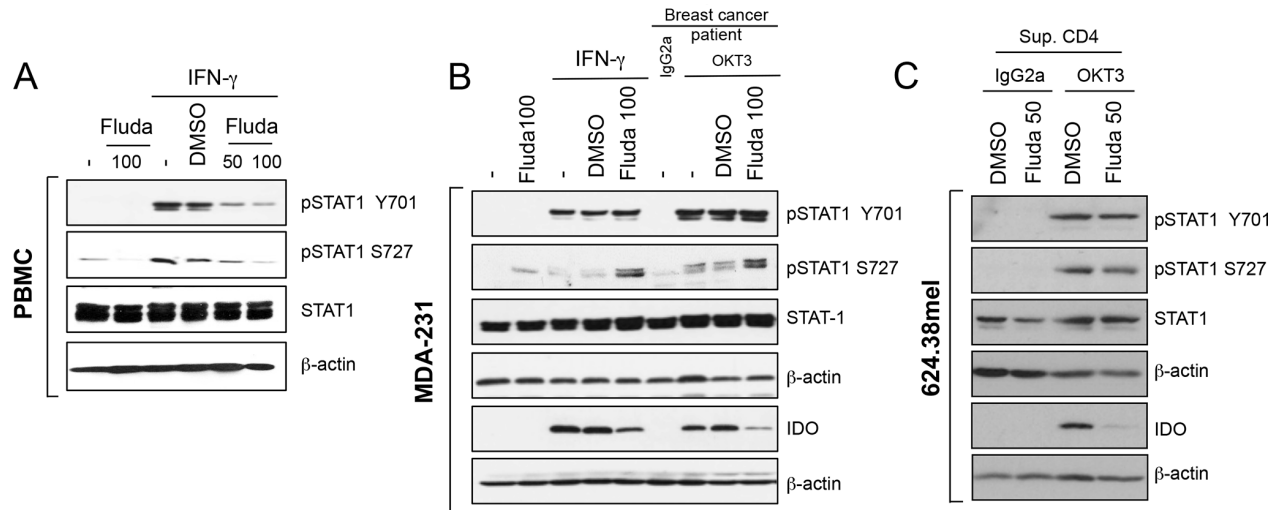
inhibitors, and with other immune-checkpoint modulators may dramatically decrease immune-suppression in immunotherapies. Such a complete IDO shutdown may be critical in controlling anti-tumor immunity, especially in considering the recent impact of immune-checkpoint modulators in clinical trials [43,44].

## Figures



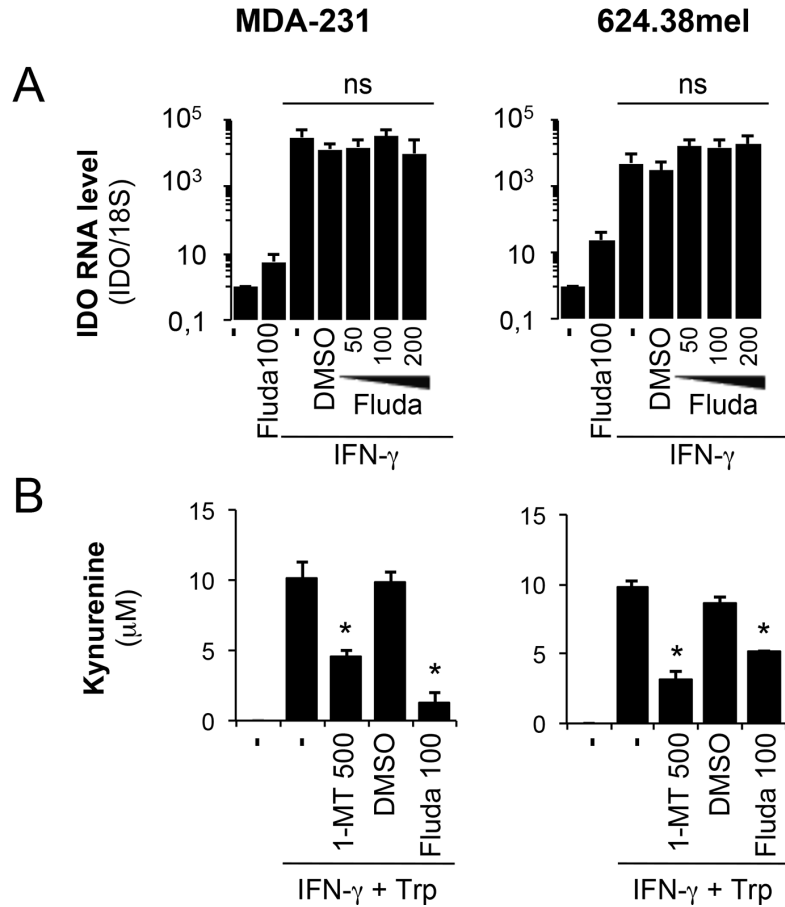
**Figure 22 (Hanafi et al. PlosOne Figure 1)** STAT1 is involved in IDO expression in response to T lymphocyte-derived factors.

MDA-231 were transfected with siRNA against STAT1 or scrambled siRNA before activation with IFN- $\gamma$  or supernatants of cultured TIL for 30 minutes (pSTAT1) or 24 h. Protein extracts were prepared for STAT1 (phosphorylated and total), IDO and  $\beta$ -actin immunoblot analysis. Results are representative of three independent experiments.



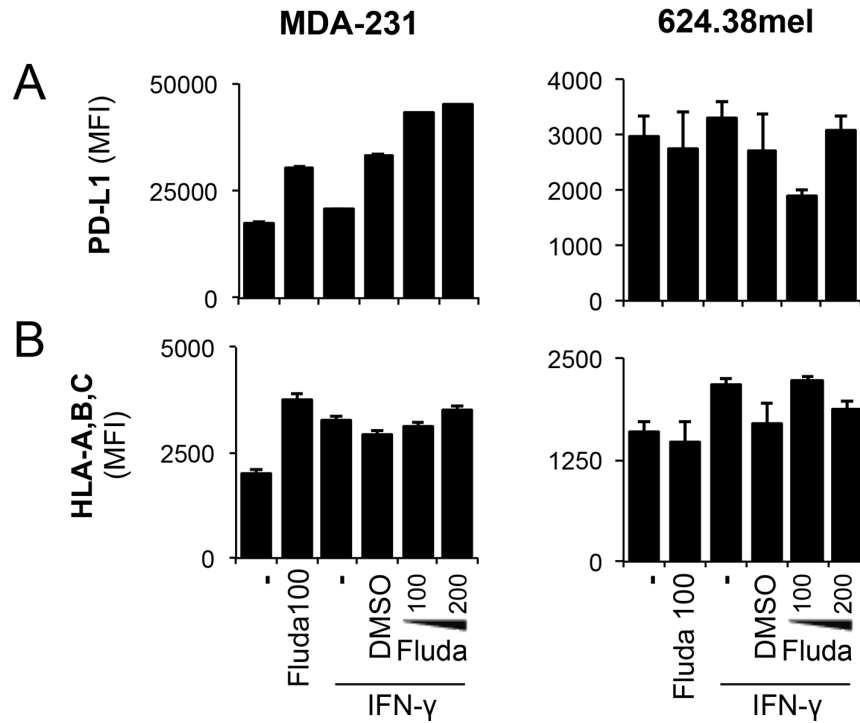
**Figure 23 (Hanafi et al. PlosOne Figure 2)** Fludarabine inhibits IDO protein independently of STAT1 phosphorylation on Y710 and S727.

**A-** PBMC were pre-treated with the indicated concentrations of fludarabine or DMSO (vehicle) for 24 h. Cells were washed and activated for 30 min (pSTAT1) or 24 h (total STAT1 and  $\beta$ -actin) with 50 U/ml of IFN- $\gamma$ . **B-** MDA-231 were pre-treated with 100  $\mu$ M fludarabine before activation with 50 U/ml of IFN- $\gamma$ , anti-CD3 (OKT3) or IgG2a-activated TIL supernatants (Sup.). **C-** 624.38mel were pre-treated with 50  $\mu$ M fludarabine, and cultured with anti-CD3 (OKT3) or IgG2a-activated CD4<sup>+</sup> T lymphocyte supernatants. **B-C** Cells were harvested after 30 min (pSTAT1, STAT1 and  $\beta$ -actin) or 24 h (IDO and  $\beta$ -actin). **A-C** Proteins were extracted for immunoblot analysis. Results are representative of three independent experiments.



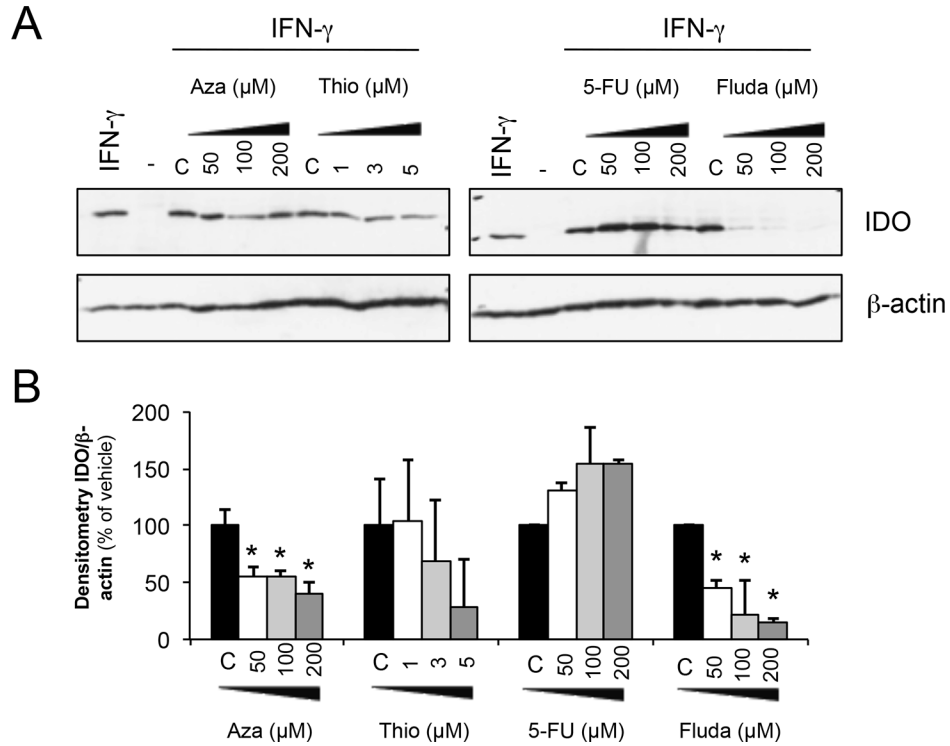
**Figure 24 (Hanafi et al. PlosOne Figure 3)** Fludarabine inhibits IDO activity independently of the mRNA level.

**A-** MDA-231 and 624.38 pre-treated with 100  $\mu$ M of fludarabine or DMSO prior to IFN- $\gamma$  activation with 50 U/ml for 24 h. RNA was extracted from activated cells. cDNA was prepared and IDO expression was evaluated by quantitative real-time RT-PCR and normalized to 18S rRNA. Error bars represent standard deviation. Results are representative of three independent experiments **B-** MDA-231 and 624.38 were pre-treated with 100  $\mu$ M of fludarabine or DMSO prior to IFN- $\gamma$  activation with 50 U/ml for 24 h. Cells were resuspended in HBSS with tryptophan with or without 1-MT and incubated for 4 h. Kynurenine was quantified by HPLC. Errors bars represent standard deviation of triplicates of one experiment. \*  $p < 0.05$  t-test compared to IFN- $\gamma$  without inhibitor. Results are representative of two independent experiments.



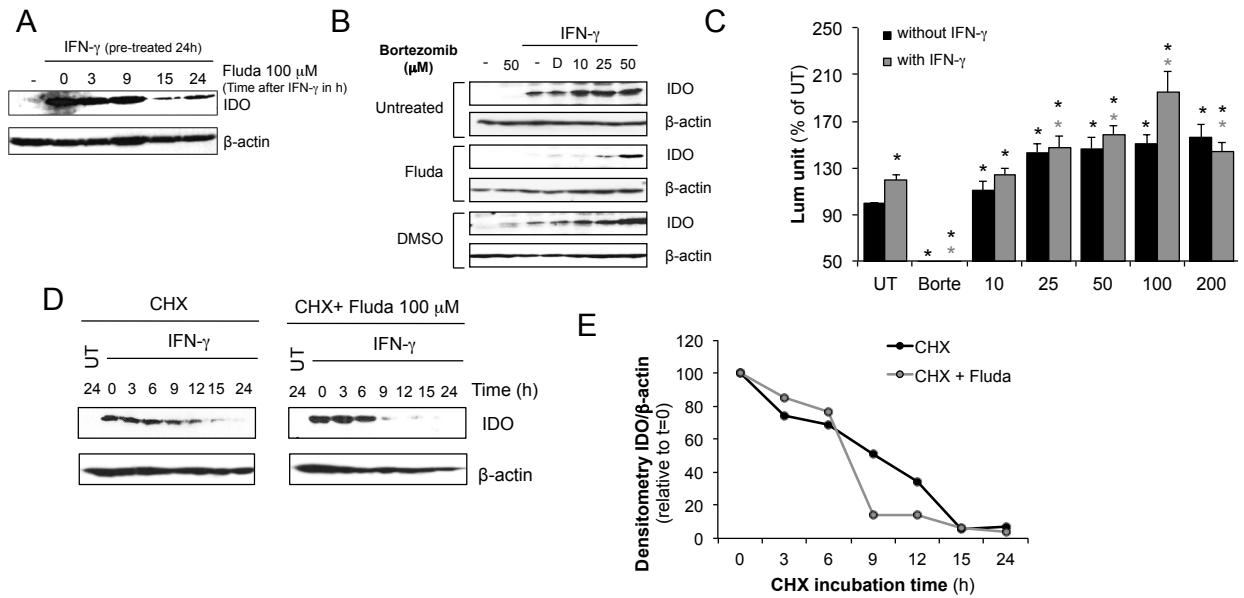
**Figure 25 (Hanafi et al. PlosOne Figure 4)** MHC I and PD-L1 expression levels remain unchanged following fludarabine treatment.

MDA-231 and 624.38mel were pre-treated with the indicated concentrations of fludarabine or DMSO prior to IFN- $\gamma$  activation with 50 U/ml for 24 h. Cells were harvested for flow cytometry analysis. MFI was assessed on viable populations for **A-** PD-L1 and **B-** HLA-ABC. Error bars represent standard deviation from one experiment. Results are representative of three independent experiments



**Figure 26 (Hanafi et al. PlosOne Figure 5) Downregulation of IDO by nucleoside analogs.**

**A-** MDA-231 were pre-treated with various nucleoside analogs at indicated concentrations or with vehicle of each inhibitor for 24 h. Cells were washed and 50 U/ml of IFN- $\gamma$  were added. Proteins were extracted after 24 h for immunoblot analysis. **B-** Compilation of densitometry analysis of three different immunoblots as described in **A**. \* significantly lower expression of IDO compared to vehicle ( $p < 0.05$  t-test).



**Figure 27 (Hanafi et al. PlosOne Figure 6)** Fludarabine inhibits IDO via a proteasome-mediated degradation pathway.

**A-** MDA-231 cells were first activated with IFN- $\gamma$  (50 U/ml) to induce IDO expression for 24 h. Cells were then washed and treated with 100  $\mu$ M of fludarabine for 3-24 h. Proteins were extracted for Immunoblot analysis. Immunoblots are representative of three independent experiments **B-** To evaluate the role of the proteasome, MDA-231 cells were pre-treated with 100  $\mu$ M of fludarabine for 24 h. Cells were washed and treated with indicated concentrations of bortezomib before IFN- $\gamma$  (50 U/ml) activation. Proteins were extracted after 24 h for immunoblot analysis. **D:** DMSO control (bortezomib vehicle). Bortezomib concentrations are expressed in nM. Immunoblots are representative of four independent experiments **C-** Cells were pretreated with indicated concentration of fludarabine with or without 50 U/ml of IFN- $\gamma$  and proteasomal activity was assessed using Proteasome-Glo kit. Results are represented as % of activity of untreated cells. Results combine data from 6 independent experiments and 3 independent experiments with IFN- $\gamma$ . Black \* p<0.01 t-test compared to untreated; grey \* p<0.01 t-test compared to untreated with IFN- $\gamma$ . **D-E** 50 U/ml of IFN- $\gamma$  were used to activate the cells to express IDO. 24 h later, cells were washed and incubated with 100  $\mu$ M of cycloheximide with or without 100  $\mu$ M fludarabine. IDO protein stability was assessed at indicated time by immunoblot. Results are representative of three independent experiments. **E-** Densitometry of IDO/actin by immunoblot in **D**.

Supplementary figures

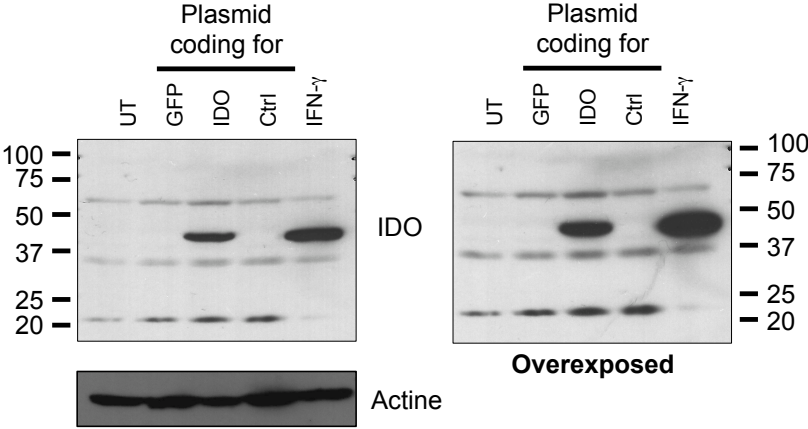
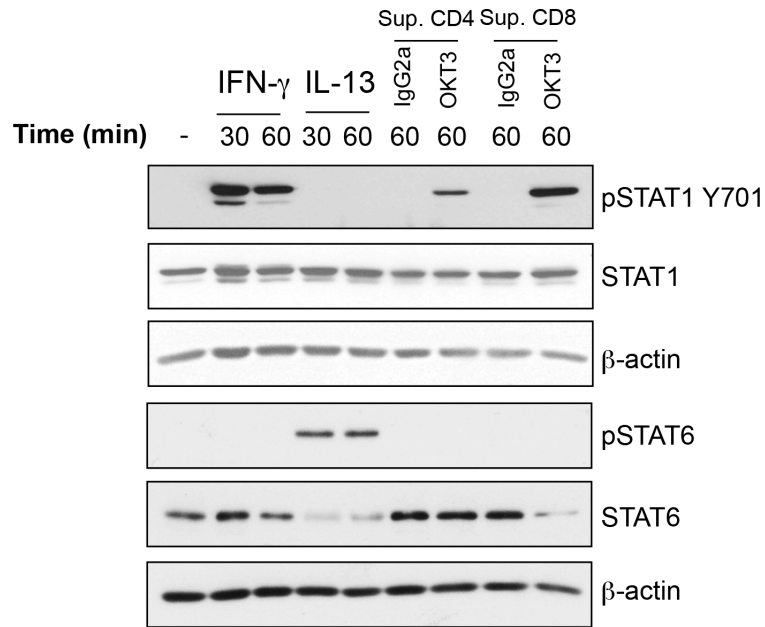


Figure 28 (Hanafi et al. PlosOne Figure S1) IDO antibody specificity assesment.

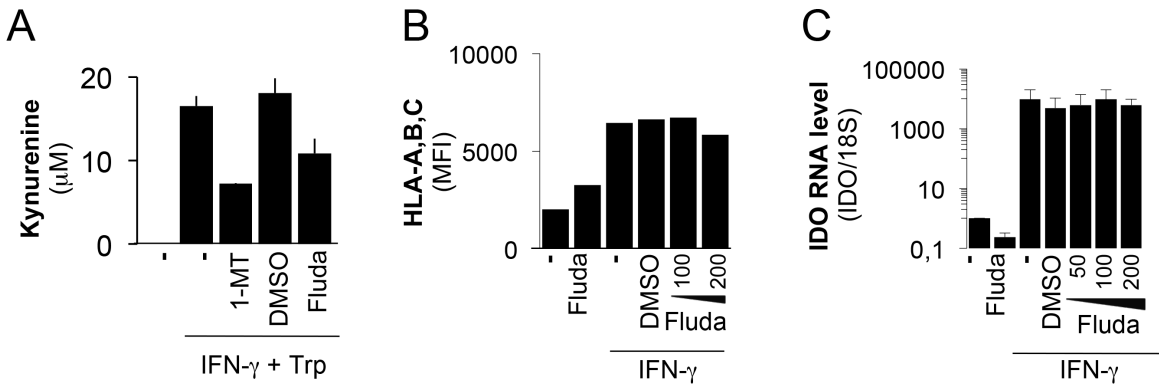
MDA-231 were transfected with plasmids encoding GFP, or IDO or irrelevant control protein. As a control, MDA-231 were untransfected and untreated (UT) or stimulated with IFN- $\gamma$  for 24h. Cells were harvested and proteins were prepared for IDO and  $\beta$ -actin immunoblot analysis.





**Figure 29 (Hanafi et al. PlosOne Figure S2)** STAT1 phosphorylation induction by PBMC supernatants.

MDA-231 were treated with IFN- $\gamma$ , IL-13 or supernatants of cultured CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from healthy donors PBMCs for the indicated time (30 or 60 min). Cells were harvested and protein extracts were prepared for STAT1 (total and pY701), STAT6 (total and phosphorylated) and  $\beta$ -actin immunoblot analysis.



**Figure 30 (Hanafi et al. PlosOne Figure S3)** IDO inhibition by fludarabine is reproduced in kidney cancer cell line.

**A-** KTCL were pre-treated with 100  $\mu\text{M}$  of fludarabine or DMSO prior to IFN- $\gamma$  activation with 50 U/ml for 24 h. Cells were resuspended in HBSS with tryptophan with or without 1-MT and incubated for 4 h. Kynurenine was quantified by HPLC. Errors bars represent standard deviation of triplicates of an experiment. **B-** KTCL were pre-treated with the indicated concentrations of fludarabine or DMSO prior to IFN- $\gamma$  activation with 50 U/ml for 24 h. Cells were harvested for flow cytometry analysis. MFI was assessed on viable populations for HLA-ABC. **C-** KTCL pre-treated with 100  $\mu\text{M}$  of fludarabine or DMSO prior to IFN- $\gamma$  activation with 50 U/ml for 24 h. RNA was extracted from activated cells. cDNA was prepared and IDO expression was evaluated by quantitative real-time RT-PCR and normalized to 18S rRNA. Error bars represent standard deviation. Representative of three independent experiments

## **Acknowledgments**

We thank Ovid Da Silva, Research Support Office, *Centre Hospitalier de l'Université de Montréal*, Alexandre Reuben and Anne Monette for their editing of the manuscript.

## References

1. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, et al. (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281: 1191-1193.
2. Prendergast GC, Chang MY, Mandik-Nayak L, Metz R, Muller AJ (2011) Indoleamine 2,3-dioxygenase as a modifier of pathogenic inflammation in cancer and other inflammation-associated diseases. *Curr Med Chem* 18: 2257-2262.
3. Godin-Ethier J, Hanafi LA, Piccirillo CA, Lapointe R (2011) Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives. *Clin Cancer Res* 17: 6985-6991.
4. Godin-Ethier J, Pelletier S, Hanafi LA, Gannon PO, Forget MA, et al. (2009) Human activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumors through Th1/Th2 balance. *J Immunol* 183: 7752-7760.
5. Sharma MD, Hou DY, Baban B, Koni PA, He Y, et al. (2010) Reprogrammed foxp3(+) regulatory T cells provide essential help to support cross-presentation and CD8(+) T cell priming in naive mice. *Immunity* 33: 942-954.
6. Cady SG, Sono M (1991) 1-Methyl-DL-tryptophan, beta-(3-benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and beta-[3-benzo(b)thienyl]-DL-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3-dioxygenase. *Arch Biochem Biophys* 291: 326-333.
7. Opitz CA, Litzenburger UM, Opitz U, Sahn F, Ochs K, et al. (2011) The indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor 1-methyl-D-tryptophan upregulates IDO1 in human cancer cells. *PLoS One* 6: e19823.
8. Munn DH (2012) Blocking IDO activity to enhance anti-tumor immunity. *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 734-745.
9. Heitger A (2011) Regulation of expression and function of IDO in human dendritic cells. *Curr Med Chem* 18: 2222-2233.
10. Taylor MW, Feng GS (1991) Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J* 5: 2516-2522.
11. Jeong YI, Kim SW, Jung ID, Lee JS, Chang JH, et al. (2009) Curcumin suppresses the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by blocking the Janus-activated kinase-protein kinase Cdelta-STAT1 signaling pathway in interferon-gamma-stimulated murine dendritic cells. *J Biol Chem* 284: 3700-3708.
12. Cheng CW, Shieh PC, Lin YC, Chen YJ, Lin YH, et al. (2010) Indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunomodulatory protein, is suppressed by (-)-epigallocatechin-3-gallate via

blocking of gamma-interferon-induced JAK-PKC-delta-STAT1 signaling in human oral cancer cells. *J Agric Food Chem* 58: 887-894.

13. Noh KT, Chae SH, Chun SH, Jung ID, Kang HK, et al. (2013) Resveratrol suppresses tumor progression via the regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 431: 348-353.

14. Lee HJ, Jeong YI, Lee TH, Jung ID, Lee JS, et al. (2007) Rosmarinic acid inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in murine dendritic cells. *Biochem Pharmacol* 73: 1412-1421.

15. Lu K, Wang X (2012) Therapeutic advancement of chronic lymphocytic leukemia. *J Hematol Oncol* 5: 55.

16. Frank DA, Mahajan S, Ritz J (1999) Fludarabine-induced immunosuppression is associated with inhibition of STAT1 signaling. *Nat Med* 5: 444-447.

17. Chaudhuri A, Yang B, Gendelman HE, Persidsky Y, Kanmogne GD (2008) STAT1 signaling modulates HIV-1-induced inflammatory responses and leukocyte transmigration across the blood-brain barrier. *Blood* 111: 2062-2072.

18. Hui Z, Tretiakova M, Zhang Z, Li Y, Wang X, et al. (2009) Radiosensitization by inhibiting STAT1 in renal cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 73: 288-295.

19. Rivoltini L, Barracchini KC, Viggiano V, Kawakami Y, Smith A, et al. (1995) Quantitative correlation between HLA class I allele expression and recognition of melanoma cells by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 55: 3149-3157.

20. Godin-Ethier J, Hanafi LA, Duvignaud JB, Leclerc D, Lapointe R (2011) IDO expression by human B lymphocytes in response to T lymphocyte stimuli and TLR engagement is biologically inactive. *Mol Immunol* 49: 253-259.

21. Torella D, Curcio A, Gasparri C, Galuppo V, De Serio D, et al. (2007) Fludarabine prevents smooth muscle proliferation in vitro and neointimal hyperplasia in vivo through specific inhibition of STAT-1 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2935-2943.

22. Lee SJ, Jang BC, Lee SW, Yang YI, Suh SI, et al. (2006) Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS Lett* 580: 755-762.

23. Yuan B, Zhang J, Wang H, Xiong L, Cai Q, et al. (2011) 6-Thioguanine reactivates epigenetically silenced genes in acute lymphoblastic leukemia cells by facilitating proteasome-mediated degradation of DNMT1. *Cancer Res* 71: 1904-1911.

24. Hernandez-Breijo B, Monserrat J, Ramirez-Rubio S, Cuevas EP, Vara D, et al. (2011) Preclinical evaluation of azathioprine plus buthionine sulfoximine in the treatment of human hepatocarcinoma and colon carcinoma. *World J Gastroenterol* 17: 3899-3911.

25. Rachakatla RS, Pyle MM, Ayuzawa R, Edwards SM, Marini FC, et al. (2008) Combination treatment of human umbilical cord matrix stem cell-based interferon-beta gene therapy and 5-fluorouracil significantly reduces growth of metastatic human breast cancer in SCID mouse lungs. *Cancer Invest* 26: 662-670.
26. Adams J, Behnke M, Chen S, Cruickshank AA, Dick LR, et al. (1998) Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett* 8: 333-338.
27. Teicher BA, Ara G, Herbst R, Palombella VJ, Adams J (1999) The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 5: 2638-2645.
28. Orabona C, Pallotta MT, Volpi C, Fallarino F, Vacca C, et al. (2008) SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20828-20833.
29. Mellor AL, Baban B, Chandler PR, Manlapat A, Kahler DJ, et al. (2005) Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling. *J Immunol* 175: 5601-5605.
30. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, et al. (2000) Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343: 1750-1757.
31. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, et al. (2002) Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298: 850-854.
32. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, et al. (2002) A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 25: 243-251.
33. Mailankot M, Nagaraj RH (2010) Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon-gamma in human lens epithelial cells: apoptosis through the formation of 3-hydroxykynurenine. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 1446-1454.
34. Gamberale R, Fernandez-Calotti P, Sanchez-Avalos J, Alberto MF, Geffner J, et al. (2006) The effect of fludarabine on interferon-gamma production by lymphoid cells from healthy donors and patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 91: 574-576.
35. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Grohmann U, Puccetti P, et al. (2010) Proteasomal Degradation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in CD8 Dendritic Cells is Mediated by Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3). *Int J Tryptophan Res* 3: 91-97.
36. Jiang GM, He YW, Fang R, Zhang G, Zeng J, et al. (2010) Sodium butyrate down-regulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase at the transcriptional and post-transcriptional levels. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 1840-1846.

37. Novitskiy SV, Moses HL (2012) Turn off the IDO: will clinical trials be successful? *Cancer Discov* 2: 673-675.
38. Balachandran VP, Cavnar MJ, Zeng S, Bamboat ZM, Ocuin LM, et al. (2011) Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. *Nat Med* 17: 1094-1100.
39. Fallarino F, Grohmann U, Puccetti P (2012) Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function. *Eur J Immunol* 42: 1932-1937.
40. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, et al. (2011) Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol* 12: 870-878.
41. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, et al. (2005) Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 23: 2346-2357.
42. de Souza JA, Davis ML, Rondon G, Cheng YC, Jones RB, et al. (2009) Prolonged disease control by nonmyeloablative allogeneic transplantation for metastatic breast cancer. *Bone Marrow Transplant* 44: 81-87.
43. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM (2012) Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 24: 207-212.
44. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, et al. (2013) Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 369: 122-13

## Discussion et perspectives

Pour stimuler l'immunité cellulaire, plusieurs stratégies peuvent être utilisées dans le but de favoriser l'activation des CTL afin de permettre une réponse immunitaire antivirale ou anti-tumorale. La vaccination est une forme d'activation immunitaire très répandue et permet de se prémunir contre plusieurs maladies infectieuses. Par contre, plusieurs infections virales ne sont pas contrôlées par les vaccins actuels. Ces vaccins induisent majoritairement la production d'anticorps, c'est pourquoi nous avons concentré nos études sur une plateforme de vaccination permettant l'induction d'une réponse cellulaire à la suite de la présentation croisée de l'antigène inséré dans la VLP de PapMV. En immunothérapie du cancer, nous voulons non seulement stimuler la réponse cellulaire, mais il est également nécessaire de contrer les mécanismes d'évasion enclenchés par les cellules tumorales résultant en un environnement immunosuppresseur. Nous avons donc étudié une stratégie permettant de réduire l'induction de l'expression de l'IDO, une enzyme dégradant le tryptophane et induisant la réduction de la réponse cellulaire.

Dans mes travaux de doctorat, j'ai tout d'abord observé que les VLP de MaMV avaient les mêmes capacités de stimulation et d'activation des lymphocytes T spécifiques que les VLP de PapMV. Dans un deuxième temps, l'étude de la présentation croisée médiée par les VLP de PapMV a permis d'identifier une nouvelle voie de présentation croisée vacuolaire dépendante de l'induction de l'autophagie. Finalement, en voulant utiliser un inhibiteur de STAT1 pour inhiber l'induction de l'expression de l'IDO induite par l'IFN- $\gamma$ , nous avons découvert que la fludarabine, contrairement à notre hypothèse de départ, avait un effet post-transcriptionnel sur l'expression de l'IDO et favorisait sa dégradation par le protéasome. Dans les sections suivantes, je reviendrai sur les résultats qui ont été présentés dans les trois chapitres précédents en les mettant en contexte avec la littérature pertinente. De plus, je proposerai des expériences pour approfondir la compréhension de la présentation antigénique par PapMV ainsi que le contrôle de l'expression de l'IDO par la fludarabine et son rôle potentiel en immunothérapie du cancer.



## Présentation antigénique par les VLP de potexvirus

### *PapMV et MaMV, similarités et différences*

#### RETOUR SUR LES RÉSULTATS

Dans le Chapitre 1 de cette thèse, nous avons présenté l'étude des propriétés de présentation croisée d'une VLP formée d'un deuxième virus de la famille des potexvirus, MaMV. Nous avons observé que cette VLP, malgré sa protéine de surface ayant que très peu d'homologie et n'étant pas reconnu par les anticorps reconnaissant PapMV (Figure 9), avait les mêmes capacités d'entrée (Figures 11-12), de présentation antigénique croisée (Figure 13) et de stimulation de la prolifération de lymphocytes T spécifiques (Figures 13-14). Cette ressemblance entre les deux virus n'est pas surprenante étant donné que nous savons maintenant que les diverses propriétés associées à ces virus sont dépendantes de leur multimérisation [170] et que les deux virus forment des VLP d'apparence similaire (Figure 9 et [172]). De plus, plusieurs propriétés immunoactivatrices de PapMV peuvent être associées à sa capacité agoniste du TLR7 dans les APC [185]. Nous suggérons que MaMV possède la même activité sur le TLR7 étant donné la présence, tout comme pour PapMV, d'ARN simple brin dans sa structure.

D'autres groupes ont également démontré que des VLP formées de virus de plante pouvaient être utilisées comme vecteur de vaccination. Par exemple, des VLP formées du virus X de la patate (*potato virus X*) contenant un épitope du virus d'influenza sont capables de générer des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques lorsqu'injectées dans une souris et ce sans l'aide d'adjuvant [276]. De plus, la fusion du peptide OVA au virus de la mosaïque de la tomate (TMV) est capable d'activer les cellules dendritiques permettant une protection anti-tumorale dans un modèle de EG.7-OVA et dans un modèle de B16 OVA chez la souris [277].

Au contraire, l'article présenté dans le Chapitre 1 a aussi décrit des différences notables entre les VLP PapMV M1 et MaMV M1. Tout d'abord, à la même concentration de 25 µg/ml, la VLP de MaMV contenant l'épitope M1 était capable de présenter plus efficacement cet épitope à des lymphocytes T spécifiques (Figure 15A). Par contre, à des doses plus élevées la VLP de MaMV contenant l'épitope M1 induisait la mort cellulaire associée à l'activation de la

caspase 8 (Figure 15). Ceci nous a amené à toujours bien contrôler la mortalité dans nos essais avec PapMV pour s'assurer que la dose utilisée était optimale.

## PERSPECTIVES

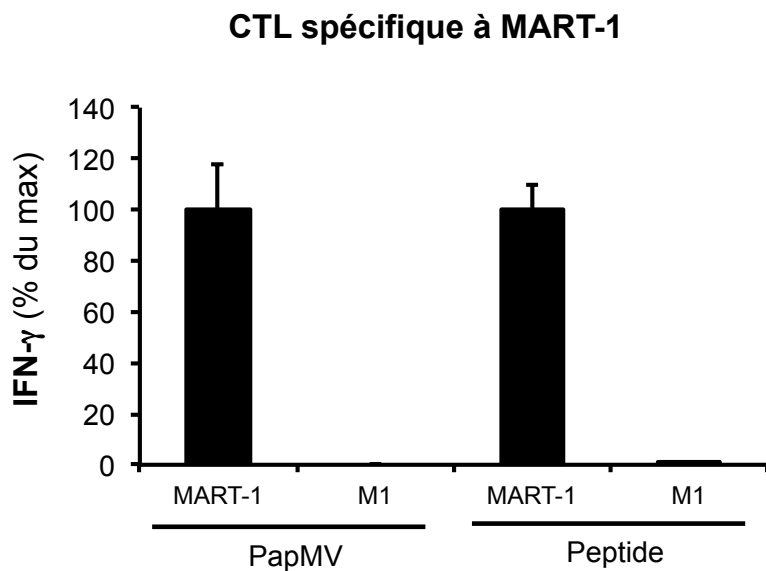
En lumière des résultats montrant l'induction de mortalité par MaMV M1, il sera toujours important de tester toutes les nouvelles constructions de VLP pour s'assurer qu'il n'y ait pas d'induction de mortalité dans les APC. La compagnie Folia Biotech, qui est responsable de la production et de la commercialisation des VLP de PapMV, a développé, avant d'entamer les essais précliniques et cliniques, un mode de production mieux contrôlé. La protéine de surface de PapMV est donc produite en grande quantité dans *E. coli*. Celle-ci est ensuite purifiée et la grande différence est que l'assemblage se fait maintenant avec un ARN simple brin synthétique produit *in vitro* et dont la séquence est connue [184]. Les évaluations précliniques avec cette nouvelle formulation n'ont montré aucun signe de toxicité dans les divers modèles animaux testés. La prochaine étape est de tester l'induction du SI en utilisant PapMV comme adjuvant. Dans la section suivante, je discuterai de l'essai clinique qui est présentement en cours et des suggestions de protocole pour l'avenir.

### *Protocoles de vaccination*

La première étape d'essai clinique pour PapMV est son utilisation comme adjuvant en combinaison avec le vaccin trivalent contre la grippe saisonnière. Il y aura un total de 48 patients recrutés et, en plus de tester la sécurité des VLP de PapMV, l'essai clinique permettra d'observer l'induction d'une réponse immunitaire anti-vaccin chez ces patients comparativement à ceux n'ayant pas reçu de VLP. Ce sera les premiers tests d'induction immunogénique chez l'humain grâce à cette VLP.

Puisque dans mon travail de doctorat et dans des travaux précédents, nous avons observé que PapMV était capable d'induire une présentation antigénique croisée, nous pourrions utiliser cette propriété en vaccination ([171] et Chapitre 1-2). En plus des VLP avec l'épitope de M1 et celui de gp100, nous avons également décrit la présentation antigénique

efficace de VLP contenant l'épitope HLA-A2 de la protéine MART-1 (Figure 31). La prochaine étape pourra être d'utiliser des VLP contenant des épitopes de la protéine M1 d'influenza ou de gp100 et MART-1, antigènes tumoraux du mélanome ou tout autre épitope connu. Ces VLP contenant un épitope spécifique pourront être testées *in vivo* chez l'humain pour observer l'induction d'une immunité cellulaire, autant dans un contexte d'infection virale que d'immunothérapie du cancer. De plus, il est intéressant de constater qu'en immunothérapie tumorale, plusieurs groupes ont montré que des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques étaient capables d'induire la rejection tumorale [278-281]. Il serait donc intéressant de produire des VLP contenant un épitope CD4<sup>+</sup> et tester d'abord *in vitro* si nous pouvons stimuler grâce à cette construction la prolifération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques. L'ajout d'un épitope CD4<sup>+</sup> pourrait même se faire en combinaison avec un épitope CD8<sup>+</sup> grâce aux différents sites d'insertion dans la protéine de surface [187,282]. Ces VLP bi-épitopes pourront permettre l'induction d'une réponse plus vaste et complète pour traiter le cancer ou pour se protéger contre des maladies infectieuses.

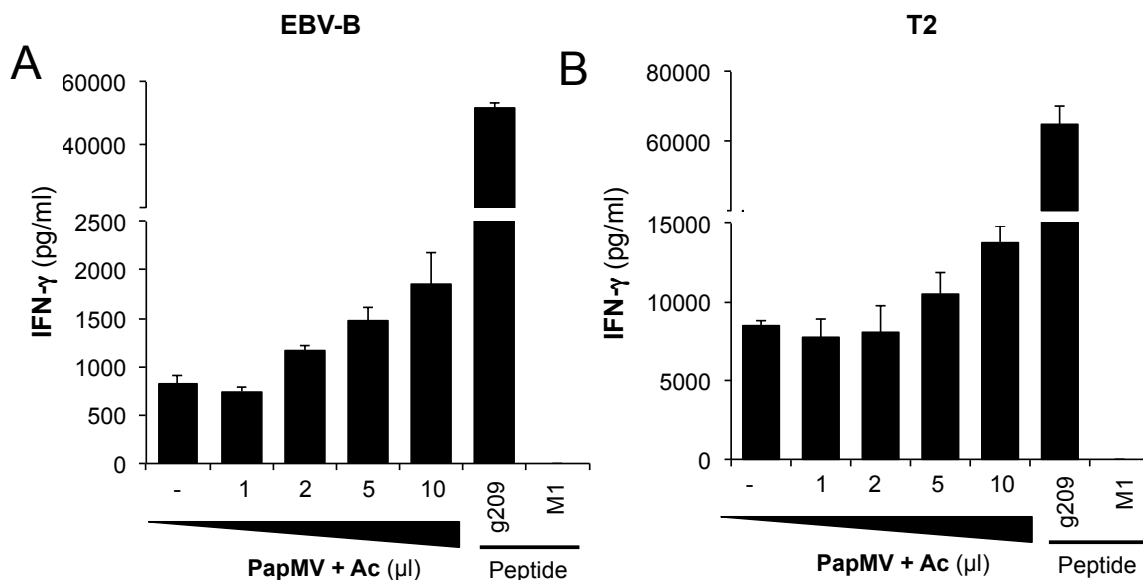


**Figure 31** Présentation croisée par CMH I de l'épitope MART-1

Les VLP de PapMV ou le peptide MART-1 ont été chargés pendant 6 heures sur des EBV-B. Les APC ont été lavées et mises en coculture avec des CTL spécifiques à MART-1 pour la nuit. La reconnaissance a été quantifiée avec la sécrétion d'IFN-γ dans le surnageant.

Finalement, un questionnement qui a été soulevé lors de mes études doctorales est l'induction d'une immunité neutralisante lors de l'injection de PapMV *in vivo*. Ceci se décrit

par la production d'anticorps neutralisants qui empêcheraient une deuxième injection efficace d'une VLP de PapMV. Cette neutralisation a été observée dans le cas de la vaccination par adénovirus, où l'immunité anti-adénovirale préexistante réduisait l'efficacité de vaccination [283]. Par contre, nous pensons que grâce aux propriétés similaires observées avec les VLP de MaMV et l'absence de reconnaissance croisée par les anticorps contre PapMV (Chapitre 1), il serait possible d'utiliser MaMV contenant le même épitope pour effectuer un rappel de vaccination. De plus, nous avons effectué des essais *in vitro* pour tester si des anticorps reconnaissant la VLP empêchaient la présentation croisée (Figure 32). En fait, la présence d'anticorps spécifiques n'inhibe aucunement la présentation croisée par PapMV, mais semble également augmenter légèrement la reconnaissance. Ceci pourrait s'expliquer par une endocytose plus efficace des VLP lorsqu'ils sont recouverts d'anticorps par opsonisation. Il est important de préciser que les anticorps utilisés provenaient de la souris, il donc serait essentiel de confirmer ces résultats avec un sérum humain reconnaissant la protéine de surface de PapMV. En parallèle, chez la souris, les doses de rappel de PapMV gp33 ont un effet additif et favorise une meilleure réponse cellulaire sans perdre de son efficacité après l'induction d'anticorps spécifiques [171].



**Figure 32** Essai de reconnaissance en présence d'anti-PapMV

Les VLP de PapMV ont été incubées avec la quantité inscrite d'anticorps de souris anti-PapMV pendant 15 minutes. Ensuite ces VLP opsonisés ont été mis en contact pendant 6h à 25  $\mu\text{g/ml}$  avec des lymphocytes B immortalisés au virus Epstein-Barr (EBV-B) (A) ou avec des T2 (lignée déficiente en TAP) (B). Les APC ont été lavées et mises en coculture avec des lymphocytes T  $\text{CD8}^+$  spécifiques pour la nuit. La reconnaissance a été quantifiée avec la sécrétion d'IFN- $\gamma$  dans le surnageant. Les résultats sont présentés en pg/ml d'IFN- $\gamma$  et la barre d'erreur représente l'écart-type des triplicatas d'une même expérience. Représentatif de 3 expériences.

### *Voies de présentation croisée vacuolaire*

#### RETOUR SUR LES RÉSULTATS

Dans la deuxième partie de mon doctorat, j'ai eu l'occasion d'étudier plus en profondeur la présentation antigénique médiée par les VLP de PapMV. Grâce aux données que nous avons précédemment obtenues sur l'indépendance à l'activité du protéasome [172], nous avons concentré nos études sur les mécanismes moléculaires ayant été décrits dans la présentation croisée vacuolaire (Figure 6). Tout d'abord, l'utilisation de cellules déficientes en TAP (les T2) a permis de démontrer que la présentation de PapMV pouvait se faire en l'absence de ce transporteur (Figure 16). Ceci suggérait un apprêtement purement endosomal ne requérant pas la translocation de l'antigène dans le cytosol et le transport du peptide dans le ER. Plusieurs autres groupes ont décrit des présentations croisées similaires, indépendantes du

protéasome et de TAP. Spécifiquement, des DC immatures ou stimulées par le TLR9 étaient capables de présenter la protéine OVA indépendamment de TAP autant *in vitro* que *in vivo* [216,217]. De plus, la chaperonne HSP90 favorise une présentation croisée vacuolaire dépendante de l'acidification des endosomes et de la dégradation par la cathepsine S [218]. Finalement, une autre VLP contenant l'épitope p33 du LCMV permet une présentation croisée par CMH I indépendamment du transport par TAP [284].

Par la suite, nous avons constaté que l'inhibition de l'acidification des lysosomes par la chloroquine réduisait la présentation par PapMV suggérant, encore une fois, une dégradation par une voie endosomale. L'inhibition spécifique de l'activité de la cathepsine S altérait également les capacités de présentation croisée par PapMV dans les lymphocytes B activés (Figure 17). La cathepsine S est principalement associée à la dégradation de la chaîne invariante lors de la présentation antigénique par le CMH II [285]. Par contre, cette protéase a déjà été associée à la présentation croisée vacuolaire [211]. Les résultats présentés dans le Chapitre 2 ont donc permis de confirmer la voie de présentation croisée vacuolaire empruntée par les VLP de PapMV. Par contre, plusieurs questions restent sans réponse. Dans la prochaine section, je résumerai en différents points et proposerai des hypothèses pour répondre à ces questionnements.

## PERSPECTIVES

### *Mode d'entrée dans les APC*

Pour être présenté de façon croisée, un antigène doit tout d'abord avoir la capacité d'entrer dans les APC. Nous savons que les VLP de PapMV ont la capacité d'entrer dans les CD40B et de se localiser au niveau des vésicules (Figure 12). De plus, le groupe d'Alain Lamarre a montré leur entrée *in vivo* dans les DC murines ainsi que l'induction de l'activation de ces APC [171]. Malheureusement, nous n'avons pas pu identifier le mécanisme d'entrée.

Les APC que nous utilisons dans le laboratoire sont les CD40B et les EBV-B. Ces cellules sont capables d'endocyter des antigènes par plusieurs mécanismes. Tout d'abord, il est connu que les lymphocytes B activés ont la capacité d'internaliser des antigènes par engagement de leur BCR à la suite de la reconnaissance d'un antigène [286]. Ce mode d'endocytose peut être exclu des hypothèses pour l'entrée de PapMV car nous n'avons pas utilisé des lymphocytes B qui reconnaissaient spécifiquement la protéine de surface de PapMV. Ensuite, les lymphocytes B ont la capacité d'effectuer de la phagocytose et de la macropinocytose. En voulant spécifier le mode d'entrée dans les APC, nous avons tenté d'utiliser des inhibiteurs pharmacologiques (Tableau 3). Par contre, malgré les tentatives d'optimisation, la concentration d'inhibiteur menant à une réduction de l'entrée de PapMV induisait également de la mortalité cellulaire dans nos lymphocytes B.

**Tableau 3** Liste d'inhibiteurs pour l'étude de l'endocytose

| Inhibiteurs                 | Description   | Références |
|-----------------------------|---|------------|
| <b>2-déoxyglucose</b>       | Inhibiteur non-spécifique d'endocytose                                | [287]      |
| <b>Acide polyinosinique</b> | Inhibiteur d'endocytose via les récepteurs <i>scavengers</i>          | [288]      |
| <b>Cytochalasine D*</b>     | Inhibiteur de la phagocytose (remodelage du cytosquelette)            | [289]      |
| <b>Diméthylamiloride*</b>   | Inhibiteur de la pinocytose sans affecter les récepteurs d'endocytose | [290]      |
| <b>Filipine</b>             | Inhibe la formation de cavéoles                                       | [291]      |
| <b>Nocodazole*</b>          | Inhibe dépolymérisation des microtubules et empêche l'endocytose      | [292]      |
| <b>Phénylarsine oxyde*</b>  | Inhibe la voie d'endocytose clathrine-dépendante                      | [293]      |

\* inhibiteurs ayant été testés

Pour identifier le mode d'entrée des VLP dans les APC, il faudrait donc procéder à d'autres expériences. Les inhibiteurs d'entrée n'ont pas permis d'identifier une voie d'entrée en particulier étant donné l'induction de mortalité dans les CD40B. Les cultures primaires

étant possiblement plus sensibles que des lignées cellulaires transformées, nous pourrions donc refaire les mêmes expériences, mais cette fois-ci en utilisant les lymphocytes B immortalisés au virus EBV. Il existe aussi d'autres outils pour tester l'entrée dans les APC. Tout d'abord, certains modes d'entrée nécessitent des protéines spécifiques qui peuvent être inhibées pour permettre l'étude de l'internalisation. Par exemple, il est possible d'utiliser la technologie d'ARNi dirigée contre la clathrine pour empêcher l'internalisation par l'endocytose clathrine-dépendante [294]. De plus, en utilisant des particules fluorescentes dont nous connaissons déjà le mode d'entrée, il serait possible d'observer la colocalisation avec des VLP de PapMV fluorescentes par microscopie confocale. Par exemple, nous savons que les billes de latex de plus de 1 µm de diamètre sont préférentiellement internalisées par la phagocytose tandis que les billes de Percoll de 30 nm de diamètre peuvent facilement entrer par pinocytose [295]. Ces résultats ont été obtenus dans des macrophages. Il faudra donc évaluer les sélections de tailles de billes pour l'entrée dans les lymphocytes B. Ceci nous permettra de définir dans nos APC par quels mécanismes (phagocytose ou macropinocytose) les VLP de PapMV sont internalisées.

#### *Protéases accessoires*

Comme discuté précédemment, nous avons observé dans les résultats présentés dans le Chapitre 2 que l'inhibition de la cathepsine S réduisait la présentation par les VLP de PapMV. Par contre, cette inhibition n'étant pas complète (Figure 17), il serait intéressant d'évaluer l'implication d'autres protéases dans la présentation croisée par les VLP de PapMV. Puisque nous pensons que l'apprêtement antigénique de PapMV se déroule uniquement dans le compartiment endosomal, les protéases impliquées dans la dégradation devraient donc être vacuolaires. Nous devons exclure les protéases cytoplasmiques comme TPPII (tripeptidyl-peptidase II) et les protéases générant des peptides dans le ER comme ERAP (aminopeptidase du ER) [296,297].

Chez la souris, la protéase IRAP a été identifiée comme une protéase endosomale importante dans la présentation croisée par CMH I. De plus, cette protéase semble colocaliser avec Rab14 et les molécules de CMH I dans les cellules dendritiques humaines activées à



l'IFN- $\gamma$  [212]. Il serait intéressant de vérifier si cette protéase participe à l'apprêtement antigénique dans notre modèle de présentation croisée par les VLP de PapMV. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions procéder à des essais de reconnaissance en pré-incubant les APC avec un inhibiteur de IRAP. IRAP étant aussi une protéase impliquée dans le système rénine-angiotensine dans le cerveau, plusieurs inhibiteurs ont été développés (revue dans [298]). De plus, l'utilisation d'ARNi pouvant inhiber l'expression de IRAP confirmera son importance dans la présentation croisée par PapMV.

Finalement, la présentation croisée médiée par les VLP de PapMV est de toute évidence vacuolaire et ce type de présentation requiert un apprêtement endosomal. De plus, plusieurs protéines impliquées dans l'apprêtement antigénique par CMH II ont été précédemment associées à la présentation croisée par CMH I, comme la cathepsine S et la chaîne invariante (CD74) [211,299]. Il est donc possible que d'autres protéases associées à la présentation par CMH II, comme les cathepsines B, D et L, soit impliquées dans la dégradation des VLP [300].

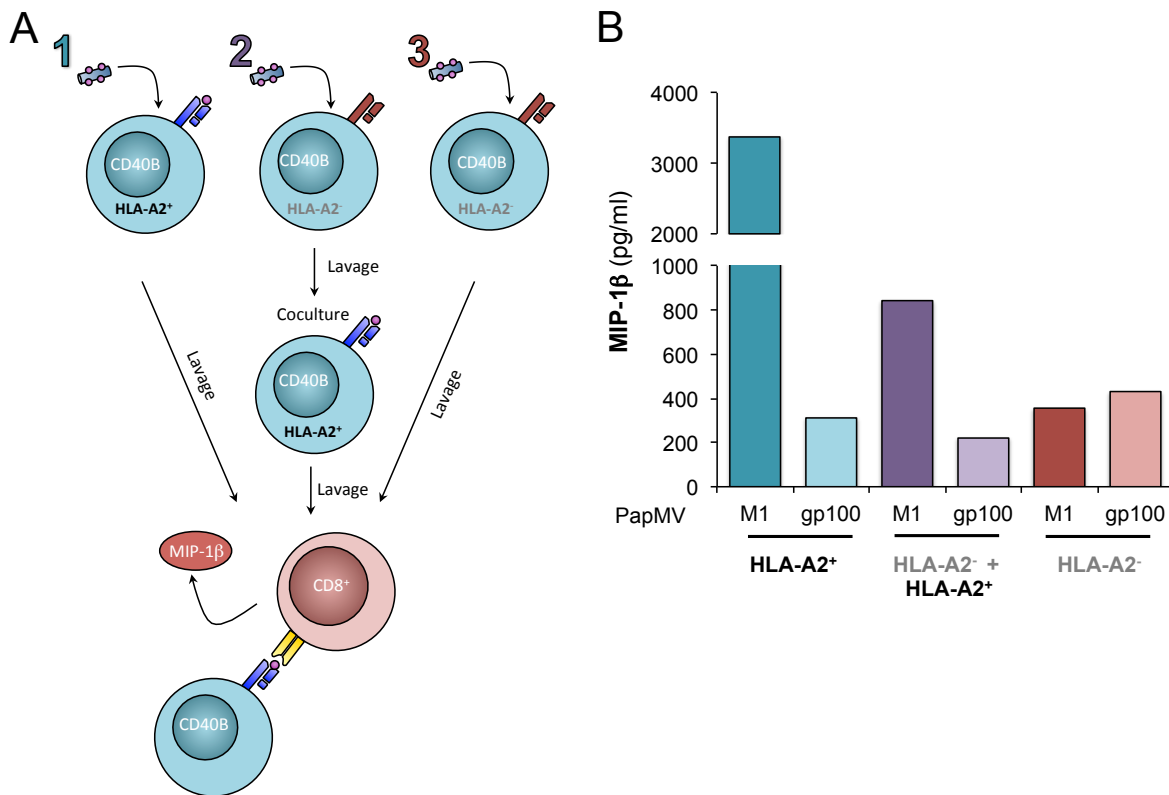
#### *Chargement sur le CMH I*

Pour être reconnu par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, un peptide doit être présenté par le CMH I, pour ce faire, dans la présentation classique, le chargement des peptides produits par le protéasome se fait dans le ER. Par contre, nous savons que la présentation croisée vacuolaire de PapMV ne requiert pas la dégradation par le protéasome [172] et ne nécessite pas le transport dans le ER par TAP (Figure 16). D'autres antigènes ont également la capacité d'être présenté indépendamment du transport dans le ER. Tout d'abord, il est possible que lorsque la dégradation est vacuolaire, les peptides puissent être transportés dans les endosomes de recyclage et être chargés sur les CMH I dans ce compartiment. Les molécules de CMH I sont fréquemment recyclées de la surface et l'échange de peptide dans ces vésicules a précédemment été décrit [301,302]. Par exemple dans les pDC, une forme rapide de présentation croisée par CMH I a été décrite et requiert le chargement sur le CMH I dans les endosomes de recyclage [214]. Ce type d'endosomes est inhibé par la primaquine, un composé chimique se liant aux endosomes et empêchant le recyclage des membranes à la surface [303].

Nous avons évalué cet inhibiteur pour interférer avec la présentation antigénique par les VLP de PapMV. Malheureusement, nous n'avons pu obtenir de concentration satisfaisante n'induisant pas de mortalité ou d'inhibition d'entrée autant dans les CD40B ainsi que les EBV-B. La prochaine expérience à faire pour tester cette hypothèse serait d'utiliser la microscopie à fluorescence pour colocaliser les VLP de PapMV avec le récepteur à la transférine (TfR), Arf6 ou Rab11, trois marqueurs des endosomes de recyclage [304]. Une colocalisation de PapMV avec ces différentes molécules pourrait suggérer un chargement dans les endosomes de recyclage.

La littérature décrit également un deuxième mode de chargement sur le CMH I ne passant pas par le ER. Ce dernier consiste au relargage des peptides à l'extérieur de la cellule et le chargement se fait directement à la surface des cellules, appelé aussi régurgitation [210,216,305]. Nous savons qu'il est possible de déloger le peptide présent dans le CMH I directement à la surface de la cellule puisque c'est ce que nous faisons en chargeant des peptides exogènes. Ce mode de chargement fait donc la même chose, mais en prenant des peptides qui ont été formés dans le compartiment vacuolaire pour ensuite les relâcher et procéder à l'échange de peptides sur les CMH I de surface. Pour tester cette hypothèse, nous avons procédé à un essai de relâchement de peptide qui avait été précédemment décrit dans la littérature [216]. Pour ce faire, nous avons utilisé des CD40B n'exprimant pas HLA-A2, ne pouvant donc pas effectuer eux-mêmes la présentation aux CTL. Ces CD40B HLA-A2<sup>-</sup> ont été chargés avec les VLP de PapMV pour effectuer l'apprêtement antigénique. Ensuite, nous avons lavé ces cellules avant de les mettre en contact avec des CD40B exprimant HLA-A2. Si les CD40B HLA-A2<sup>-</sup> sont capables de relâcher le peptide pour lequel les CTL sont spécifiques, il y aura chargement sur les CD40B HLA-A2<sup>+</sup> par proximité entre les cellules chargées qui relâcheront le peptide. Les résultats présentés à la Figure 33 nous permet d'observer que la présence de CD40B HLA-A2<sup>-</sup> ayant apprêté l'antigène permettait la reconnaissance par les lymphocytes T spécifiques, mais à plus faible niveau que le chargement direct sur les CD40B HLA-A2<sup>+</sup>. Avec ces résultats, nous ne pouvons pas exclure le fait que les CD40B qui ont été chargés au départ relâchaient l'antigène entier et que l'apprêtement et le chargement s'effectuaient dans les CD40B HLA-A2<sup>+</sup>. Pour pallier à cette incertitude, nous avons tenté de fixer les APC HLA-A2<sup>+</sup> avant de les mettre en contact avec les CD40B

chargés. Par contre, la fixation, même à des doses aussi faibles que 0,5 % de paraformaldéhyde, empêche le chargement exogène de peptides sur la molécule HLA-A2. Nous n'avons donc pas pu utiliser la fixation comme contrôle. Par contre, nos résultats décrivent tout de même une forme de présentation pouvant s'effectuer sur une cellule n'ayant pas été chargée par PapMV.



**Figure 33** Essai de reconnaissance avec chargement de CD40B HLA-A2<sup>-</sup> pour relâchement de l'épitope

**A** Schéma de l'essai de relâchement de peptide. Les CD40B HLA-A2<sup>+</sup> (1) ou HLA-A2<sup>-</sup> (3) sont chargés avec les VLP de PapMV. Une partie des CD40B HLA-A2<sup>-</sup> sont ensuite lavés et cocultivés avec des CD40B HLA-A2<sup>+</sup> (2). Tous les CD40B sont ensuite lavés avant d'être mis en culture avec des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques à M1. **B** Résultats de sécrétion de MIP-1β (*macrophage inflammatory protein-1beta*) par les CTL ayant été cocultivés avec les CD40B HLA-A2<sup>+</sup> chargés directement (bleu), indirectement (mauve) ou les CD40B HLA-A2<sup>-</sup> (rouge). PapMV gp100 sert de contrôle négatif dans chacune des conditions.

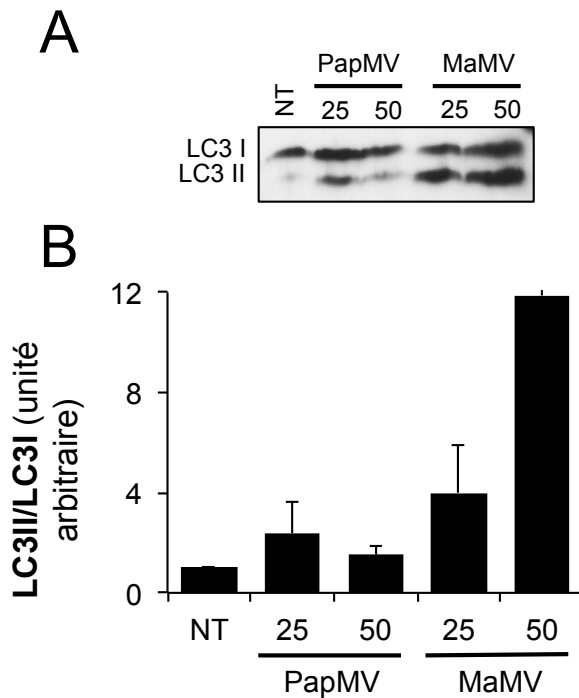
## *Autophagie et présentation croisée par CMH I*

### INDUCTION DE L'AUTOPHAGIE

Pour mieux définir les mécanismes de présentation croisée par CMH I, nous avons posé l'hypothèse que l'incubation avec PapMV induisait l'autophagie dans les APC et que cette autophagie facilitait la présentation antigénique (Chapitre 2). La première étape fut donc d'évaluer si les VLP de PapMV induisaient l'autophagie. Il existe plusieurs outils expérimentaux pour mettre en évidence l'autophagie dans des cellules [227]. Dans nos travaux, nous avons utilisé la formation de vésicules LC3<sup>+</sup> en microscopie à fluorescence et la lipodation de LC3 en immunobuvardage de type western. Les VLP de PapMV sont donc capables d'augmenter la quantité de vésicules LC3<sup>+</sup> dans les EBV-B et ceci se traduit par une augmentation du ratio LC3II/LC3I (Figure 18). Ces résultats nous amènent à nous questionner sur le mécanisme d'induction de l'autophagie dans les APC par les VLP de PapMV. Nous avons émis l'hypothèse dans la discussion du Chapitre 2 que la liaison agoniste de PapMV sur le TLR7 [185] pourrait induire l'autophagie comme il a été observé pour d'autres agonistes de TLR7 [306,307] et des autres TLR [307,308]. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions tenter les expériences d'induction d'autophagie par PapMV dans des cellules déficientes en TLR7 ou en protéines nécessaires à la signalisation par le TLR7.

Dans le Chapitre 1, nous avons montré que MaMV était capable d'être présenté de façon croisée aussi efficacement, sinon plus que PapMV (Figure 15). Par conséquent, nous avons testé l'induction de la lipodation de LC3 par l'incubation de MaMV comparativement avec la VLP de PapMV (Figure 34). Il est possible de constater que la VLP MaMV M1 induit une plus grande quantité de LC3 lipidé (LC3II). Ceci peut expliquer en partie pourquoi la présentation croisée par MaMV M1 semble plus efficace (Figure 15A) à faible dose. Ces observations ne nous permettent pas de savoir si c'est l'autophagie qui est responsable de la mort cellulaire engendrée par MaMV M1 à haute dose dans nos APC, mais nous pouvons poser l'hypothèse qu'il y a probablement un lien entre ces deux phénomènes. L'inhibition de l'autophagie dans des cellules traitées avec MaMV M1 pourrait nous renseigner sur le rôle potentiel de ce processus cellulaire dans la mort cellulaire induite par MaMV M1. Précédemment, il a été observé qu'une trop forte induction d'autophagie peut induire la mort

cellulaire [309,310]. En conséquence, nous pouvons poser l'hypothèse que c'est l'induction de l'autophagie, étant bénéfique pour la présentation antigénique à faible dose, qui à haute dose induit la mort cellulaire à la suite de l'incubation avec MaMV M1. De plus, il a précédemment été décrit que la membrane autophagique peut servir de plateforme pour l'activation de la caspase 8 et ainsi augmenter la mort cellulaire par certains signaux [311]. Plusieurs études ont aussi observé que p62, une protéine impliquée dans le recrutement des protéines ubiquitinées à l'autophagosome, pouvait augmenter l'activation de la mort cellulaire dépendante de la caspase 8. Par contre, l'augmentation du flux autophagique réduit la quantité de p62 qui est dégradé avec le contenu de l'autophagosome [312-314].



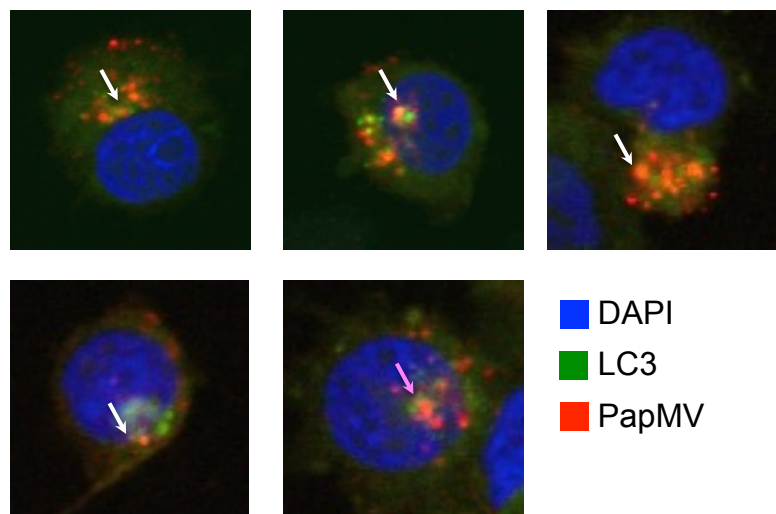
**Figure 34** Induction de l'autophagie par PapMV et MaMV M1

Les EBV-B ont été incubés trois heures en présence de PapMV ou de MaMV M1 à 25 ou 50 µg/ml. Après un lavage, les protéines ont été extraites et migrer sur un gel d'acrylamide pour être ensuite transféré sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF). **A** Les membranes ont été révélées avec un anti-LC3 (Novus) et un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase de raifort (HRP). **B** Densitométrie représentée en ratio entre LC3II et LC3I comparativement aux cellules non traitées (NT). Compilation de deux expériences indépendantes, les barres d'erreurs représentent l'erreur-type de la compilation des deux expériences.

#### LOCALISATION DE PAPMV DANS LES AUTOPHAGOSOMES

Dans les expériences de microscopie à fluorescence avec LC3-GFP (vert), nous utilisons des VLP de PapMV marquées avec le fluorochrome Alexa 647 (rouge). Ceci

permettait d'observer la formation de vésicules contenant PapMV dans les APC (Figure 18). Nos expériences d'induction d'autophagie ont été faites après une incubation de trois heures avec les VLP ou l'inducteur contrôle, la rapamycine. Il est possible de constater qu'il n'y ait pas de colocalisation majeure apparente entre les vésicules contenant les VLP de PapMV et les autophagosomes (LC3-GFP<sup>+</sup>). Par contre, nous n'excluons pas que certaines vésicules autophagiques entre en contact avec les endosomes contenant PapMV (Figure 35). Pour évaluer le lien entre les autophagosomes et les vésicules contenant PapMV, il faudrait refaire l'expérience de microscopie à différents temps pour voir si nous observons une colocalisation à un autre moment qu'après trois heures. De plus, il faudrait stabiliser la fluorescence émise de PapMV Alexa 647, car il se peut que la colocalisation entre les autophagosomes et les vésicules contenant les VLP se fassent après la dégradation de ces derniers.



**Figure 35** Contact entre les vésicules PapMV<sup>+</sup> et les autophagosomes (LC3<sup>+</sup>)

Microscopie confocale d'EBV-B électroporés par microporation avec un plasmide codant pour LC3-GFP et trié en cytométrie en flux avant d'être incubés trois heures avec 10 µg/ml de PapMV marqué à l'Alexa 647. Images représentatives où les vésicules LC3<sup>+</sup> et PapMV<sup>+</sup> sont près l'une de l'autre (flèche blanche) et des vésicules PapMV<sup>+</sup> qui semble être entouré de LC3-GFP (flèche rose).

## RÔLE DE L'AUTOPHAGIE

Même si les résultats de microscopie confocale ne confirment pas de lien direct entre les autophagosomes et les endosomes contenant PapMV, l'altération des voies autophagiques ont permis de moduler la présentation croisée par PapMV lors des essais de reconnaissance (Figure 19-20). Nous avons observé que l'inhibition de l'autophagie par le 3-méthyladénine (3-MA) réduisait significativement la présentation antigénique par les VLP de PapMV. Le 3-MA est un inhibiteur de PI3K de classe III et est reconnu pour inhiber l'induction de l'autophagie [315]. Par contre, le 3-MA, comme plusieurs inhibiteurs, peut avoir des effets non-désirables dans les cellules traitées. Pour contrôler ce phénomène dans nos expériences d'essai de reconnaissance et s'assurer que la diminution de présentation était due à l'inhibition de l'apprêtement antigénique et non de l'entrée, nous avons procédé à un essai d'entrée par cytométrie en flux (Figure 19A). Nous pouvons constater que le prétraitement au 3-MA ne réduisait pas significativement l'entrée dans les APC.

De plus, nous avons évalué si l'induction de l'autophagie pouvait favoriser une meilleure présentation antigénique par PapMV. L'inhibition de la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*) par la rapamycine induit l'autophagie et ce de la levure aux cellules de mammifères [316]. Lorsque nous avons prétraité nos cellules avec la rapamycine, nous n'avons malheureusement pas observé d'augmentation de la présentation croisée par la VLP de PapMV. Nous expliquons ce résultat contraire à notre hypothèse en montrant que la rapamycine réduisait l'expression du CMH I à la surface de nos APC (Figure 21). Nous avons donc utilisé la privation en nutriments comme autre inducteur de l'autophagie. Pour ce faire, nous avons incubé nos cellules dans une solution saline (HBSS) pendant trois heures lors du chargement avec PapMV. L'induction de l'autophagie par cette déprivation a mené à une augmentation de la présentation antigénique par PapMV dans nos APC (Figure 19C-D). Enfin, nous avons réduit l'expression de la protéine ATG5 par ARNsh (*short hairpin*). La protéine ATG5 est essentielle à l'induction de la cascade autophagique. Malgré une inhibition partielle de la protéine ATG5, nous avons obtenu une diminution significative de la présentation croisée comparativement à un ARNsh ayant une séquence aléatoire (Figure 20). Nous concluons donc que l'induction de l'autophagie est nécessaire pour la présentation antigénique croisée par PapMV.

Contrairement à ce qui avait été précédemment décrit par English *et al.*, dans notre étude, la présentation croisée dépendante de l'autophagie est indépendante de la dégradation par le protéasome [240]. L'implication de l'autophagie dans une présentation vacuolaire par CMH I a été observée dans un modèle d'infection au HCMV [241]. Cette présentation nécessitait par contre l'infection active donc l'expression des protéines virales pour permettre la présentation par CMH I. Les résultats présentés dans le Chapitre 2 sont donc la première démonstration du rôle de l'autophagie dans une présentation antigénique croisée vacuolaire par CMH I.

#### MODÈLE PROPOSÉ

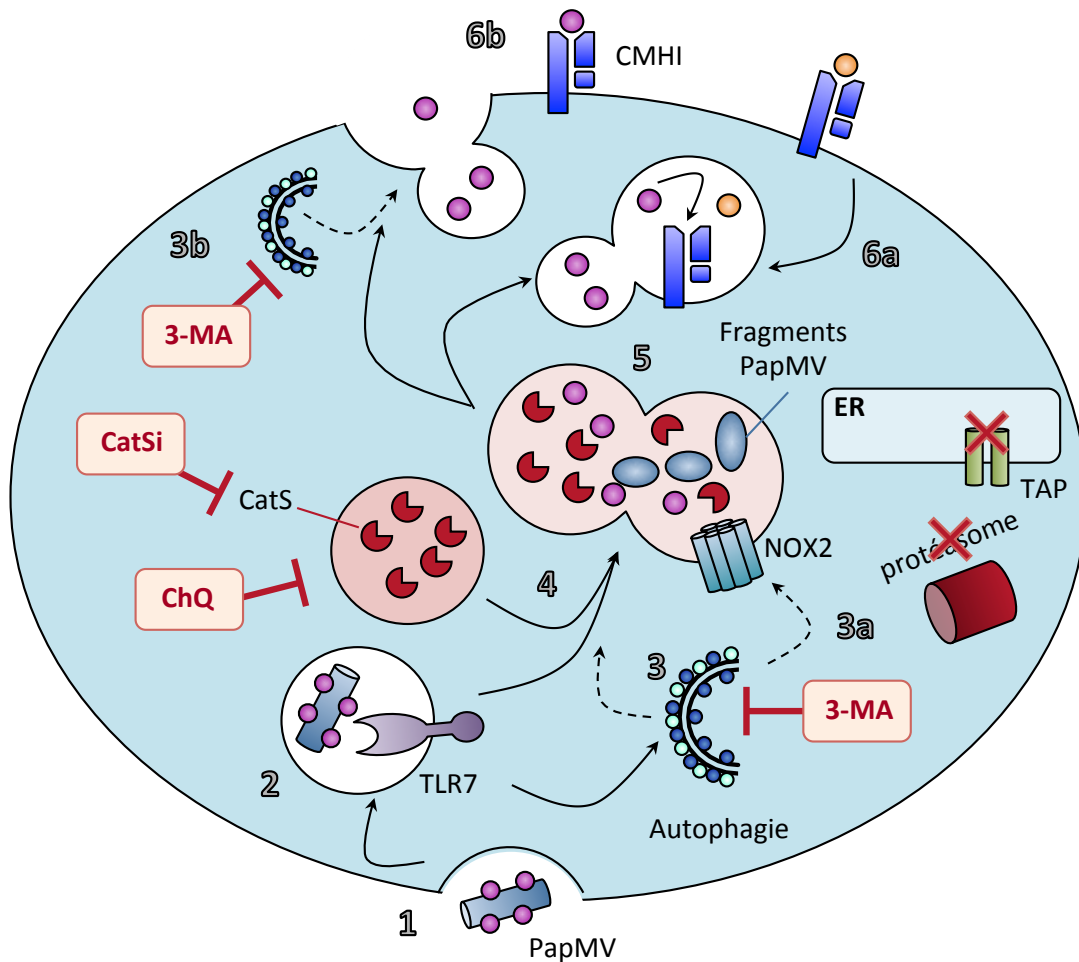
Nos résultats mènent à la conclusion que l'induction de l'autophagie par les VLP de PapMV est nécessaire à la présentation croisée par CMH I. Par contre, le lien direct entre l'autophagie et l'apprêtement antigénique par PapMV n'a pas été clairement défini. Comme discuté précédemment, l'autophagie a été décrit dans la présentation d'antigènes endogènes par CMH I dépendamment ou indépendamment de l'activité du protéasome [240,241]. Dans ces deux exemples, l'autophagie était impliquée dans les cas où la présentation classique par CMH I était bloquée par l'infection virale ou par l'absence de TAP.

Dans les résultats que nous avons obtenus, l'autophagie semble importante dans la présentation croisée d'antigène exogène et ceci peut être expliqué à différents niveaux. Tout d'abord, une forme d'autophagie provenant de la membrane des endosomes a été décrite dans la littérature [317]. Cette autophagie est activé par la stimulation par TLR et permet le transport des antigènes vers le compartiment vacuolaire où la présentation antigénique par CMH II se déroule. Une forme similaire d'autophagie est peut-être induite dans nos APC et permettrait le transport de PapMV dans le compartiment contenant la cathepsine S pour favoriser sa dégradation. Un autre rôle potentiel de l'autophagie dans la présentation croisée par CMH I est le transport de NOX2 (nicotinamide adénine dinucleotide phosphate [NAPDH] oxydase 2) au niveau de la membrane de l'endosome contenant PapMV pour conserver un pH optimal et faciliter la présentation croisée. Tout d'abord, il est reconnu que les APC possèdent des mécanismes permettant de stabiliser les antigènes dans les endosomes pour favoriser une



présentation croisée par CMH I. Cette stabilisation peut être effectuée par le recrutement de NOX2 au niveau de la membrane endosomale [318]. De plus, la localisation de la protéine LC3 près des phagosomes a été associée avec le recrutement de NOX2 et la stabilisation des antigènes pour la présentation par CMH II [319]. Encore une fois, la présentation croisée vacuolaire par CMH I pourrait exploiter plusieurs mécanismes mis en place dans la présentation par CMH II.

L'autophagie pourrait également être impliquée dans le chargement du peptide sur la molécule de CMH I. Tout d'abord, il existe deux modes de chargement possible pour la présentation croisée vacuolaire (Figure 6). Le premier mode de chargement requiert le transport des peptides dans les endosomes de recyclage où les CMH I de la surface sont régulièrement transporter avant d'être ramené à la surface. Il y a des évidences que les endosomes tubulaires de recyclage pourrait participer à la formation des autophagosomes [320]. Dans ce contexte, les CMH I présents dans ces endosomes de recyclage pourrait être transportés dans des autophagosomes qui pourraient participer à la dégradation des VLP de PapMV. La deuxième voie de chargement sur les CMH I décrite en présentation croisée se fait par le relâchement des peptides à l'extérieur de la cellule [216]. Nous proposons que la voie autophagique pourrait être un régulateur de ce relâchement de peptide. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'autophagie a été associée au relâchement d'exosomes par les cellules autophagiques/apoptotiques [321]. De plus, les corps multivésiculaires responsables du relâchement d'exosomes à l'extérieur de la cellule peuvent fusionner avec des autophagosomes en cas de stress autophagique [322]. L'autophagie pourrait donc avoir un rôle dans le transport de l'endosome vers le compartiment contenant la cathepsine S, dans la stabilisation de l'antigène via NOX2 ou dans le chargement du peptide sur les CMH I. Dans la Figure 36, je récapitule les différentes évidences et hypothèses associées à la présentation croisée par les VLP de PapMV.



**Figure 36** Modèle proposé de présentation croisée par les VLP de PapMV

**1** PapMV est internalisé dans l'APC dans un compartiment vacuolaire. **2** L'APC reconnaît le signal de danger de la VLP de PapMV grâce au TLR7. **3** L'activation du TLR7 induit l'autophagie. **3a** Cette autophagie facilite la présentation croisée, soit en amenant NOX2 aux vésicules où la dégradation des VLP s'effectue. **3b** Soit en favorisant le relargage de peptides dans l'environnement immédiat des APC ou par un mécanisme qui reste à être identifié. **4** Les endosomes contenant les VLP de PapMV fusionnent avec le compartiment lysosomal qui contient la cathepsine S. **5** La cathepsine S apprête la VLP pour libérer les peptides nécessaires à la présentation antigénique par CMH I. **6a** Ces peptides sont chargés dans les endosomes de recyclage ou **6b** les peptides sont libérés dans l'environnement immédiat de la cellule pour être chargés sur les CMH I en surface. La présentation par PapMV est indépendante du protéasome et de TAP (**croix rouges**). L'inhibition de la cathepsine S (**CatSi**), de l'acidification des lysosomes (**ChQ**; chloroquine) et de l'autophagie (**3-MA**; 3-méthyladénine) altère la présentation par les VLP de PapMV. Les flèches pointillées illustrent les hypothèses du rôle de l'autophagie dans la présentation croisée par la VLP de PapMV.

## **Inhibition de l'expression de l'IDO**

Pour le troisième objectif de mon projet de doctorat, j'ai concentré mes recherches sur l'enzyme immunosuppressive IDO. Dans la section **Introduction**, nous avons décrit les effets immunorégulateurs de l'IDO sur la fonction des lymphocytes T. Nous savons donc qu'il serait intéressant d'inhiber non seulement l'activité de cette enzyme, mais aussi son expression. Notre hypothèse est basée sur les résultats du groupe de Dr Grohmann qui ont démontré le rôle de l'IDO dans le maintien d'un environnement immunosuppresseur indépendamment de sa fonction catabolique [258]. Il est donc important de réduire l'expression de cette protéine dans l'environnement tumoral. De plus, il a été décrit que la protéine IDO joue un rôle dans le phénotype et l'activité des  $T_{reg}$  [323]. L'administration d'un inhibiteur enzymatique de l'IDO favorise le ralentissement de la croissance tumorale dépendamment de la présence lymphocytaire dans un modèle murin [324]. Par conséquent, l'IDO est une enzyme immunosuppressive cruciale dans l'établissement d'un microenvironnement immunosuppresseur et son inhibition dans l'environnement tumoral favorise la réponse anti-tumorale.

### *Induction d'IDO par l'IFN- $\gamma$*

Dans le Chapitre 3, nous avons présenté tout d'abord des résultats décrivant l'importance de l'IFN- $\gamma$  et de STAT1 dans l'induction de l'expression de l'IDO. En utilisant de l'IFN- $\gamma$  recombinant ou le surnageant de lymphocytes T activés (provenant du sang périphérique ou infiltrant des tumeurs), nous avons observé l'induction de la phosphorylation de STAT1 et la production de l'IDO (Figures 22, 23 et 29). En utilisant l'ARNi pour abroger l'expression de STAT1, nous avons démontré l'importance de cette protéine de signalisation dans l'expression de l'IDO à la suite de la stimulation par l'IFN- $\gamma$  (Figure 22). La capacité de l'IFN- $\gamma$  à stimuler l'expression d'IDO explique la présence de l'IDO dans un grand nombre de cancer où il y a production d'IFN- $\gamma$  par les cellules immunitaires infiltrant la tumeur (Annexe II et [248]).

Dans une tumeur, l'IFN- $\gamma$  peut provenir de différentes sources. Nous avons observé que les lymphocytes T contenus dans les TIL (lymphocytes infiltrant la tumeur) après stimulation pouvaient induire l'expression d'IDO dans des cellules tumorales *in vitro* (Figures 22, 23 et 29). De plus, la majorité des TIL ont un phénotype activé et la capacité de produire de l'IFN- $\gamma$  [325,326]. Ces TIL sont composés majoritairement de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, de lymphocytes B ainsi que de cellules NK [326]. En plus, des lymphocytes T, les cellules NK ont également la propriété de sécréter de l'IFN- $\gamma$ , lorsque stimulés [327,328] et cette production pourrait participer à l'induction de l'expression de l'IDO. Une autre source d'IFN- $\gamma$  susceptible d'induire l'expression de l'IDO est les lymphocytes *natural killer* T (NKT) infiltrant la tumeur. Ces cellules à l'interface entre l'immunité innée et adaptative sont activées via leur TCR semi-invariable par la présentation de lipides dans le complexe CD1d [329]. Il est reconnu que suivant leur activation, les NKT sécrèteront une grande quantité d'IFN- $\gamma$ . En immunothérapie du cancer, certains groupes ciblent ces cellules pour favoriser l'activation des CTL [330,331]. Cette activation mènera aussi à la présence d'IFN- $\gamma$  dans l'environnement tumoral.

Dans nos études, nous nous sommes concentrés sur l'expression d'IDO dans les cellules tumorales humaines, mais il est bien connu que l'IFN- $\gamma$  induit aussi l'expression de l'IDO dans les APC [332]. Cette expression est également dépendante de l'activation de STAT1 [273,274,333]. L'expression de l'IDO dans les APC permet de maintenir une immunosuppression non seulement dans l'environnement tumoral, mais aussi par la migration des APC dans les ganglions lymphatiques drainants la tumeur (TDLN) [334-336]. La présence d'IDO dans les TDLN est associée à un mauvais pronostic pour des patients atteints de cancer du colon [337].

### *Modes d'inhibition de l'IDO*

Plusieurs inhibiteurs de l'IDO ont été développés afin de réduire le plus spécifiquement et avec la plus grande affinité possible l'activité enzymatique de catabolisme du tryptophane. Nous croyons qu'il est également possible de réduire l'immunosuppression par l'IDO en inhibant tout simplement son expression ou l'induction de son expression. Comme il a été

discuté précédemment l'induction de l'expression de l'IDO est dépendante de la signalisation par JAK-STAT1. Cette voie de signalisation est donc une cible thérapeutique pour l'inhibition de l'induction de l'expression de l'IDO.

#### LES INHIBITEURS JAK-STAT

Dans les travaux de cette thèse, nous avons axé notre recherche sur la fludarabine qui avait précédemment été décrite pour inhiber l'activation de STAT1 dans les PBMC [275]. D'autres composés chimiques avaient la capacité de diminuer l'expression de l'IDO en affectant la signalisation par JAK-STAT1 [268-270,273,274,333]. Il était donc logique d'utiliser la fludarabine, agent chimiothérapeutique déjà approuvé pour son utilisation en clinique, pour réduire l'expression de l'IDO dans des cellules dont le rôle de STAT1 avait déjà été décrit. Par contre, les résultats obtenus ont plutôt démontré une inhibition de l'expression de l'IDO indépendamment de STAT1. Nous pensons que les cellules tumorales peuvent répondre différemment à l'ajout de la fludarabine à cause des différents processus de transformation néoplasique. Dans ces cellules, la phosphorylation de STAT1 n'est pas affectée par l'ajout de la fludarabine. Ce même phénomène a été observé dans des PBMC provenant de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (CLL) [338,339].

Mais qu'en est-il des APC qui sont aussi capables d'exprimer l'IDO à la suite d'une stimulation par l'IFN- $\gamma$  ? Est-ce que l'ajout de la fludarabine inhiberait l'induction de l'IDO par son effet négatif sur la phosphorylation de STAT1 ? Pour répondre à ces questions, il serait possible de faire les mêmes expériences d'induction de l'IDO par l'IFN- $\gamma$  en présence ou en absence de la fludarabine dans des APC. Pour ce faire, nous pourrions utiliser des cellules dendritiques dérivées de monocytes ou tout simplement des monocytes isolés du sang périphérique de donneurs normaux ou de patients atteints de cancer. Mon hypothèse serait que la fludarabine réduit l'expression de l'IDO dans les APC par l'inhibition de STAT1 puisque d'autres inhibiteurs de cette voie de signalisation ont la même efficacité dans ce type de cellules [272,274,333].

## ACTIVATION DU PROTÉASOME

Lorsque nous avons constaté que l'inhibition de l'IDO par la fludarabine dans notre modèle de cellules tumorales *in vitro* était indépendante de l'activation de STAT1, nous avons tenté d'élucider le mécanisme d'inhibition. Nos résultats démontrent un rôle important du protéasome dans la diminution de l'expression de l'IDO avec la fludarabine (Figure 27). Ceci suggère que la fludarabine peut inhiber l'IDO dans plusieurs contextes. Par exemple, le traitement à la fludarabine permettrait d'inhiber l'expression de l'IDO dans des cellules tumorales qui l'expriment constitutivement [340] ou tout autres stimuli comme le TGF- $\beta$  [258] ou la liaison du CTLA-4 [341].

La voie d'inhibition de l'IDO par la fludarabine dans les cellules tumorales laisse encore place à des questionnements. Tout d'abord, la fludarabine étant un analogue de purine utilisé en chimiothérapie, il est logique de croire qu'il induit un stress cellulaire et ainsi favorise l'activité du protéasome comme montré par l'essai de protéasome-glo<sup>®</sup>. L'activation du protéasome à la suite d'un stress cellulaire a déjà été décrite dans un contexte de stress oxydatif [342].

## UBIQUITINATION DE L'IDO

La dégradation de l'IDO par le protéasome nous porte à croire que la protéine IDO peut être ubiquitinée lors d'un stress cellulaire. Nous avons tenté de vérifier l'ubiquitination de l'IDO dans notre modèle en présence de fludarabine. Par contre, il est très difficile techniquement d'observer l'ubiquitination de l'IDO car l'anticorps le reconnaissant n'est pas très efficace pour effectuer une immunoprécipitation et de plus, la chaîne lourde de l'immunoglobuline est très près en poids moléculaire de la protéine IDO. Malgré ces difficultés, il a été observé que la présence de sodium butyrate en plus d'inhiber l'IDO par la diminution de la signalisation par JAK-STAT1 induisait une augmentation de l'ubiquitination d'IDO [267]. Cette conclusion était obtenue grâce à des immunobuvardages de type western plus ou moins convaincants. En contrepartie, une stratégie qui pourrait être utilisée pour faciliter l'expérience serait de transfecter dans nos cellules un plasmide codant pour l'IDO contenant un FLAG pouvant ainsi faciliter l'immunoprécipitation. Orabona *et al.* ont observé

la phosphorylation et l'ubiquitination de l'IDO en présence d'IL-6 et de signalisation par le CD28 grâce à cette technique [343].

### IMPLICATION DE SOCS3

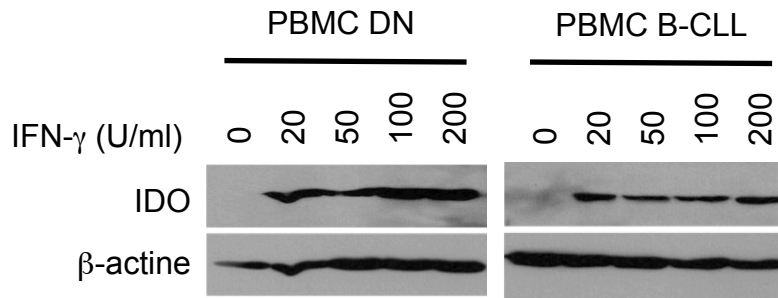
Grâce aux résultats que nous avons présenté dans le Chapitre 3, nous savons maintenant que la fludarabine a un effet post-transcriptionnel sur la stabilité de la protéine IDO et que celle-ci est dégradée par le protéasome. D'autres composés ont déjà été décrits pour induire de la dégradation de l'IDO par le protéasome. Par exemple, le sodium butyrate, en plus d'affecter la signalisation par STAT1, est capable de favoriser la dégradation de l'IDO par le protéasome [267]. De plus, l'oxyde nitrique (NO) en plus de nuire à l'activité enzymatique de l'IDO induit sa dégradation par le protéasome dans des cellules épithéliales humaines (RT4) [344]. Finalement, le groupe de Fallarino a découvert que la protéine IDO murine contenait deux sites ITIM et que ces sites de phosphorylations la rendaient sensible à la dégradation du protéasome dépendante de SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*) [343,345,346]. En tenant compte de ces résultats, il serait donc intéressant de vérifier tout d'abord si la séquence de l'IDO humaine contient ces mêmes sites de phosphorylation. De plus, la dégradation par le protéasome induite par l'incubation avec la fludarabine est elle aussi peut-être reliée à l'action de la protéine SOCS3.

### *Modèles d'étude in vivo*

Dans notre étude, nous avons établi la fludarabine comme étant un agent chimiothérapeutique pouvant diminuer l'IDO dans des modèles de tumeurs humaines (sein, mélanome, rein) *in vitro*. Par contre, il est selon moi nécessaire de tester l'efficacité d'inhibition de l'IDO par la fludarabine dans un modèle murin *in vivo* avant de pouvoir spéculer sur un potentiel rôle chez l'humain. Tout d'abord, puisque la fludarabine est présentement utilisé en clinique pour traiter la leucémie lymphoïde chronique à lymphocytes B (B-CLL), il serait intéressant d'évaluer la fludarabine dans un modèle murin de B-CLL (Figure 37A). Il existe un modèle transgénique de B-CLL spontané chez la souris où

l'antigène grand T de SV40 est introduit à sens inverse dans le gène de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (IgH-T). Ces souris IgH-T développent spontanément à l'âge adulte une accumulation de lymphocytes B monoclonaux caractéristique de la B-CLL [347]. Il serait donc possible d'utiliser ce modèle pour évaluer la fludarabine pour induire la dégradation d'IDO. Tout d'abord, il faudrait tester *ex vivo* si les cellules tumorales de ce modèle expriment constitutivement ou à la suite d'une stimulation à l'IFN- $\gamma$  la protéine IDO. Si c'est le cas, on pourrait traiter les souris IgH-T avec différentes doses de fludarabine avant ou après l'apparition du cancer (Figure 38A). Dans le laboratoire, nous avons observé que des PBMC provenant de patients atteints de B-CLL pouvait exprimer l'IDO lorsqu'activés à l'IFN- $\gamma$  autant que les PBMC provenant de donneurs normaux (Figure 37). Les paramètres à observer seraient la progression de la maladie et la présence de l'IDO dans les cellules tumorales. De plus, il est possible de quantifier l'activité d'IDO en mesurant le tryptophane et la kynurénine dans le plasma par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Si les résultats confirment le rôle de la fludarabine dans la réduction de l'IDO, nous pourrions conclure que le traitement actuel avec la fludarabine chez les patients atteints de B-CLL agit autant sur la prolifération des cellules tumorales que l'inhibition de l'immunosuppression par l'IDO. Malheureusement, il n'est pas clair à quel point l'étude de l'effet de l'IDO est pertinente dans un modèle de B-CLL. Une étude évaluant l'activité de l'IDO dans des PBMC de patients atteints de B-CLL comparé à des donneurs sains a rapporté l'augmentation de la production de kynurénine, mais la protéine l'IDO ou l'IDO2 n'était pas présente dans les cellules tumorales directement [348]. Donc, même si chez la souris nous voyons une augmentation de l'IDO dans les cellules de B-CLL, ce ne sera probablement pas représentatif de la réalité chez les patients atteints de cette leucémie, mais pourra être utile pour l'étude de l'IDO dans d'autres types de cancer.





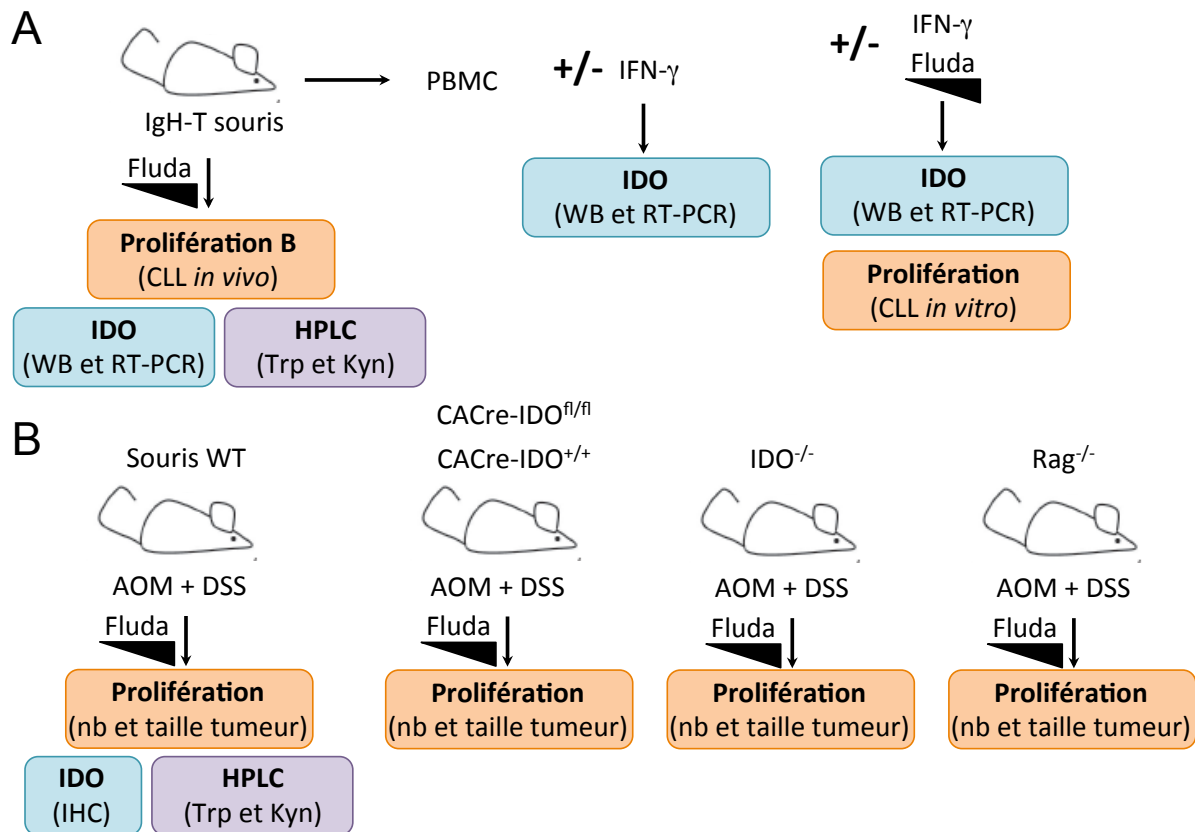
**Figure 37** Induction de l'expression de l'IDO dans les PBMC B-CLL

Des cellules mononuclées du sang périphérique (**PBMC**) ont été isolées à partir de sang d'un donneur normal (**DN**) ou de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique à lymphocytes B (**B-CLL**). Ces cellules ont ensuite été stimulées avec différentes doses d'interféron-gamma (**IFN- $\gamma$** ). Les protéines ont été extraites et migrer sur une gel d'acrylamide 10 % et transférée sur une membrane de PVDF avant d'être révéler avec l'anticorps anti-IDO et anti- $\beta$ -actine comme contrôle de chargement. Expérience représentative de 3 donneurs et 3 patients.

Dans un deuxième temps, le cancer du colon est un cancer pour lequel la présence d'IDO a été corrélée avec un mauvais pronostic [337] et pour lequel il existe de bons modèles spontanés ou d'induction par agents chimiques chez la souris. Tout d'abord, il est facilement possible d'induire la formation d'une colite associée au développement tumoral en utilisant l'azoxyméthane (AOM) et le dextran sodium sulfate (DSS) [349]. Il a précédemment été observé dans ce modèle que l'activité enzymatique de l'IDO favorisait la prolifération tumorale [350]. Il est donc de grand intérêt de réduire la protéine IDO dans ce modèle de cancer. Il serait donc possible d'administrer de la fludarabine à des souris traitées à l'AOM et au DSS pour observer, par immunohistochimie (IHC), si il y a une diminution de la présence de l'IDO dans les tumeurs (Figure 38B). De plus, l'activité globale de l'IDO pourra être testé dans le plasma en quantifiant le tryptophane et la kynurénine par HPLC. Dans ces mêmes expériences, nous pourrions évaluer le développement tumoral en présence de la fludarabine en comptant le nombre et la taille des tumeurs dans l'intestin des souris. Pour savoir si la diminution de la progression tumorale est bien associée à l'inhibition de l'IDO et non seulement à l'effet chimiothérapeutique de la fludarabine, un modèle de knock-out conditionnel avec le système de la recombinaison Cre-loxP pourrait être utilisé. Il existe des

souris dont la recombinaison Cre est sous le promoteur de l'anhydrase carbonique 1 (CACre) qui est spécifiquement exprimée dans le colon [351]. Cette souris pourrait être croisée à une souris ayant les séquences *lox* autour des locus contenant l'IDO1 et l'IDO2. Il serait donc possible d'induire la colite avec développement tumoral dans ces souris transgéniques et de comparer la progression tumorale après traitement à la fludarabine avec des souris exprimant l'IDO dans le colon. Il est également possible que l'expression de l'IDO soit importante dans les cellules immunitaires, donc un knock-out complet de l'IDO pourrait donc être utilisé pour vérifier l'impact de la fludarabine en absence totale de l'IDO [352]. Finalement, puisque l'IDO est une enzyme immunosuppressive, son action se fait par l'inhibition des lymphocytes T. Nous pourrions donc tester l'activité de la fludarabine en l'absence de lymphocytes dans les souris *Rag<sup>-/-</sup>*. Dans ces souris, la diminution de l'IDO dans les cellules tumorales ne devrait pas avoir d'effets sur la croissance étant donné qu'il n'y aura pas de CTL pour lyser les tumeurs.

Évidemment, il existe une panoplie de modèles de tumorigénèse chez la souris autant spontané, qu'avec traitements d'agents chimiques ou par injection péritonéale ou sous-cutanée, l'utilisation de différents protocoles de traitement à la fludarabine pourraient être testés dans ces modèles. Il est certain que je favoriserais des modèles où le rôle de l'IDO a déjà été établi autant chez la souris que dans la maladie humaine correspondante. Plus spécifiquement, nous pourrions utiliser le modèle de mélanome B16 injectés en sous-cutané et voir si le traitement à la fludarabine réduit l'expression de l'IDO dans ces cellules tumorales. L'ajout de 1-MT à des souris portant une tumeur B16 augmentait la réponse anti-tumorale [353]. De plus, ce modèle nous permettrait de tester si la fludarabine améliore la réponse immunitaire à la suite d'un transfert adoptif de lymphocytes T de souris « pmel » qui reconnaissent spécifiquement la tumeur [354,355].



**Figure 38** Schéma expérimental pour l'étude *in vivo* de l'effet de la fludarabine sur l'IDO

**A** Les cellules tumorales de la souris IgH-T sont extraites des PBMC pour effectuer des tests *in vitro* d'induction de l'IDO avec l'IFN-γ et des essais avec une dose-réponse avec la fludarabine. Des tests *in vivo* seront aussi effectués avec une dose-réponse de fludarabine pour tester l'effet sur la prolifération de la B-CLL et sur l'expression de l'IDO et la dégradation du tryptophane par HPLC. **B** Un modèle de cancer du colon inducible par AOM et DSS est utilisé pour tester l'effet de la fludarabine sur la tumorigénèse et l'expression de l'IDO. Pour confirmer le rôle de l'IDO dans cet effet, des souris avec un knock-out conditionnel ou déficientes en IDO seront utilisées pour tester l'effet de la fludarabine en absence de l'IDO. Pour confirmer l'importance des lymphocytes T, une souris Rag<sup>-/-</sup> sera utilisée.

## Combinaisons de thérapies : l'avenir

Dans les travaux de cette thèse, j'ai discuté de deux thérapies très différentes, la vaccination et l'inhibition de l'évasion tumorale par la réduction de l'expression de l'IDO. Grâce à la littérature de plus en plus abondantes qui révèlent des bénéfices à la combinaison de

thérapies, nous proposons d'utiliser autant la vaccination avec PapMV que la fludarabine pour inhiber l'IDO avec d'autres thérapies. Pour ce faire, je discuterai dans cette section des différents types de combinaison qui ont montré leur efficacité dans le traitement du cancer ou de maladies infectieuses.

### *Combinaisons de chimiothérapies*

En premier lieu, il est possible de combiner les différentes chimiothérapies qui sont sur le marché pour traiter le cancer. Ceci permet de cibler plusieurs caractéristiques des cellules tumorales en même temps et d'éviter les mutations qui pourront rendre les tumeurs résistantes aux thérapies. Par exemple, chez les patientes atteintes de cancer du sein métastatique, les risques de développer une résistance à un médicament sont très grands. Par contre, il a été démontré que la combinaison de thérapies visant différents phénomènes biologiques permettaient de retarder l'apparition d'une tumeur résistante aux traitements [356]. De plus, la combinaison de chimiothérapies permet également de réduire les doses des différentes chimiothérapies utilisées pour ainsi réduire les effets secondaires associés à chaque traitement. Finalement, pour traiter les maladies infectieuses, il est parfois également nécessaire de combiner plusieurs drogues. Dans le cas du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) associé à l'infection par le VIH, la trithérapie ou thérapie antirétrovirale est utilisée depuis le début des années 2000 et permet de prolonger de plusieurs années l'espérance de vie [357].

### *Combinaisons de chimiothérapies et d'immunothérapies*

La nouvelle version des caractéristiques (*hallmarks*) du cancer décrites par Hanahan et Weinberg tient compte de la capacité des cellules tumorales à s'évader du SI [358]. Il est possible de cibler la tumeur en réactivant le SI avec différentes immunothérapies. La combinaison de chimiothérapie et d'immunothérapie permet de cibler autant la cellule tumorale que l'environnement immunosuppresseur. Par exemple, l'utilisation d'un inhibiteur métabolique pour bloquer la prolifération des cellules tumorales peut être combinée avec le 1-MT pour inhiber l'activité de l'IDO autant dans la tumeur que les APC. Dans un modèle

murin de cancer gastrique et de cancer de la vessie, une combinaison de ces deux traitements permettait une meilleure réponse anti-tumorale dans des souris immunocompétentes [359]. Il est également possible de combiner l'anti-CTLA4 (ipilimumab) avec une chimiothérapie. Lorsque testé en préclinique dans plusieurs modèles de tumeurs murines, la combinaison de l'ipilimumab avec différents agents chimiothérapeutiques favorisait aussi une meilleure réponse dans le cas où la chimiothérapie n'était pas suffisante [360]. De plus, le groupe Zitvogel-Kroemer a montré qu'il était possible d'utiliser la chimiothérapie pour augmenter l'immunogénicité d'une tumeur [361,362]. La combinaison de ce genre de chimiothérapie avec l'immunothérapie pourrait donc favoriser la réponse anti-tumorale. Spécifiquement pour l'inhibition de l'activité enzymatique de l'IDO, l'indoximob (1-MT) est présentement en clinique pour tester son efficacité en combinaison avec différentes chimiothérapies pour le traitement du cancer du sein, du pancréas, du mélanome ou tumeur du cerveau métastatique [249].

#### *Combinaisons d'immunothérapies*

Les possibilités de combinaison de thérapies sont vastes. Plusieurs groupes ont également combiné deux immunothérapies ayant des activités différentes et pouvant permettre une synergie d'effet sur la tumeur et ainsi permettre une meilleure réponse anti-tumorale. Par exemple, dans le modèle de mélanome agressif B16.SIY chez la souris la combinaison de deux traitements parmi l'anti-CTLA-4, l'anti-PD-L1 et l'inhibition de l'activité enzymatique de l'IDO permet un meilleur contrôle de la prolifération tumorale comparé à un de ces traitements seuls. La combinaison permet aussi une meilleure activité des lymphocytes T anti-tumoraux dans les TDLN et dans la tumeur elle-même [363]. Il existe également une infinité d'autres études prouvant le bénéfice de la combinaison de thérapie. Par exemple, la combinaison de l'anti-CTLA-4 et de l'anti-PD-L1 a commencé à donner des résultats encourageant dans le traitement de mélanome métastatique suggérant ainsi que la combinaison d'immunothérapie peut favoriser le contrôle de la croissance tumorale tout en n'augmentant pas les effets secondaires non désirés [245]. Selon ce que nous entendons dans les congrès, je

crois aussi que les essais cliniques se feront de plus en plus en combinant différentes thérapies et pas seulement de façon successive, mais aussi en simultané.

### *Vaccination et autre immunothérapies*

Dans la littérature, plusieurs études ont tenté de combiner différentes formes de vaccination avec des immunothérapies, dont l'inhibition de l'activité enzymatique de l'IDO. Tout d'abord, il a été observé que la présence de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques à HBsAg était augmentée à la suite de la combinaison du vaccin avec l'inhibiteur de l'activité enzymatique de l'IDO dans un modèle murin [364]. Dans un contexte de cancer, l'utilisation d'un vaccin formé d'une fusion entre DC et tumeur permet d'induire une réponse immunitaire cellulaire. Lorsqu'utilisé chez la souris pour traité le carcinome du poumon de Lewis, la combinaison avec le 1-MT permettait un meilleur contrôle du développement tumoral et l'induction d'une plus grande quantité de CTL anti-tumoraux [365]. De plus, l'indoximob (1-MT) est présentement en essai clinique en combinaison avec le sipuleucel-T, un vaccin cellulaire, pour le traitement du cancer de la prostate [249].

### *Contribution potentielle à l'avancement des connaissances*

Dans mes travaux de doctorat, j'ai travaillé spécifiquement sur une nanoparticules vaccinale et sur l'inhibition de l'expression de l'IDO par la fludarabine. Ces deux types de traitement feront peut-être un jour parti de la boîte à outils disponibles aux cliniciens pour traiter le cancer. Dans le cas de la VLP de PapMV, ils pourront aussi être utile afin de prévenir des maladies infectieuses nécessitant l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire. Les recherches présentées dans cette thèse ont tout d'abord permis de mieux identifier les mécanismes de présentation antigénique croisée pouvant stimuler les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Nous suggérons que cette induction de CTL par la vaccination à partir des VLP de PapMV pourrait être combinée avec différents traitements immunomodulateurs pour favoriser une meilleure réponse dépendante des lymphocytes T cytotoxiques. Ceci pourra se faire autant dans les maladies infectieuses nécessitant une réponse cellulaire pour être contrôlées comme

l'infection à des rétrovirus [366]. De plus, en immunothérapie du cancer où les CTL ont montré leur efficacité à contrôler la croissance tumorale [367], l'utilisation des VLP de PapMV contenant un épitope tumoral pourront être utilisés.

Dans la deuxième partie des travaux présentée dans cette thèse, nous avons abordé un nouveau mécanisme d'inhibition de l'IDO, c'est-à-dire par la réduction de son expression via l'induction de sa dégradation par le protéasome. Nous pourrions suggérer d'utiliser un inhibiteur de l'expression de l'IDO en combinaison avec l'indoximob (1-MT) pour inhiber l'activité immunosuppressive de l'IDO sur plusieurs fronts ou de combiner la fludarabine avec d'autres immunothérapies comme les anticorps contrôlant les points de contrôle immunologiques. Si les résultats sont positifs, il serait encourageant de tester également des inhibiteurs de l'expression de l'IDO comme la fludarabine en combinaison avec différentes chimiothérapies déjà établies.

Finalement, puisque ces deux mécanismes agissent sur deux plans différents pour favoriser une réponse immunitaire cellulaire, il serait aussi intéressant de penser à combiner la vaccination avec les VLP de PapMV pour l'activation d'une réponse spécifique à un antigène tumoral et l'inhibition de l'IDO par la fludarabine qui en réduisant la dégradation du tryptophane favorise aussi une meilleure réponse immunitaire cellulaire.

## Conclusion

En conclusion, nous avons présenté dans cette thèse deux stratégies visant à améliorer l'immunité cellulaire. Nous avons d'abord étudié une plateforme vaccinale composée de la protéine de surface d'un virus de plante pouvant être modifié pour exprimer un épitope précis et ainsi activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques. De plus, nous avons étudié le mécanisme d'inhibition de la molécule immunosuppressive, IDO, indépendamment de sa fonction enzymatique et de la signalisation par STAT1.

Plus précisément, les travaux de cette thèse nous ont permis d'approfondir les connaissances sur la présentation antigénique médiée par les VLP formés des protéines de surface de PapMV et de MaMV. Dans le premier chapitre, nous présentons des travaux qui ont permis de confirmer que les VLP de MaMV et de PapMV possèdent les mêmes capacités d'endocytose, de présentation croisée et de stimulation des lymphocytes T spécifiques mais elles divergent dans leur capacité à induire la mort cellulaire à la suite de l'activation de la caspase 8.

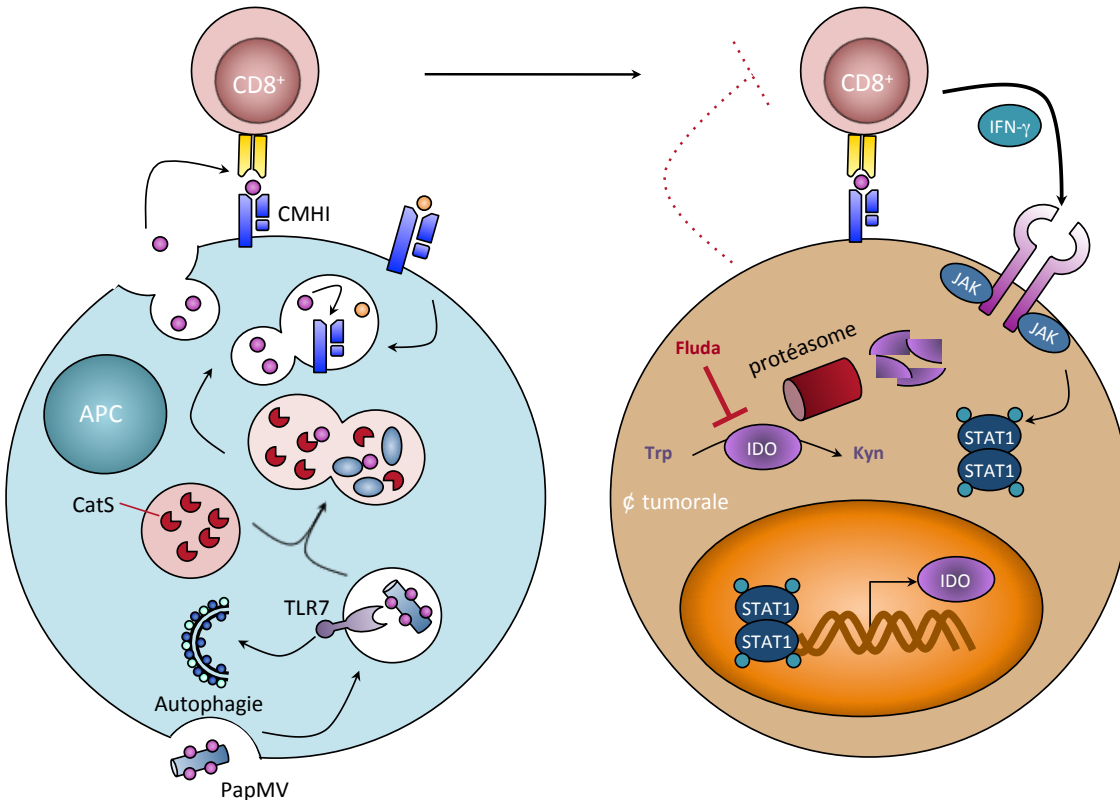
Au Chapitre 2, nous avons élucidé le mécanisme de présentation croisée par CMH I emprunté par les VLP de PapMV. Nous avons découvert une nouvelle voie de présentation croisée vacuolaire dépendante de l'activité de la cathepsine S et de l'induction de l'autophagie. C'est la première description d'une voie de présentation croisée indépendante du transporteur TAP nécessitant la voie autophagique pour permettre l'apprêtement antigénique et le chargement du peptide sur le CMH I.

Finalement, nous avons voulu inhiber la voie STAT1 pour abroger l'expression de l'IDO dans les cellules tumorales par l'activation par l'IFN- $\gamma$ . Étonnamment, en utilisant la fludarabine, un agent chimiothérapeutique, qui avait précédemment été décrite pour inhiber la phosphorylation de STAT1, nous avons observé une diminution de l'expression de l'IDO par sa dégradation par le protéasome. La fludarabine est donc capable d'inhiber l'expression de l'IDO de façon STAT1-indépendante dans les différents modèles tumoraux utilisés.

Ces résultats nous confirment qu'il existe de multiples façons afin de stimuler le système immunitaire et contrôler son autorégulation. Nos travaux apportent une preuve supplémentaire dans le potentiel thérapeutique de la nanoparticule vaccinale PapMV et



proposent un potentiel rôle de la fludarabine pour inhiber l'expression de l'IDO (Figure 39). Ces deux stratégies seront utiles pour améliorer les combinaisons de thérapies visant à stimuler le système immunitaire. Dans le cas de l'immunothérapie du cancer, il nous apparaît essentiel d'attaquer la tumeur sur plusieurs fronts. Cette stratégie pourra également s'étendre à la prévention de maladies infectieuses qui retournent les mécanismes d'autorégulation du SI pour s'évader de la réponse immunitaire



**Figure 39** Schéma de mise en contexte de la conclusion globale de la thèse

Tout d'abord, nous avons observé que les VLP de PapMV était présenté sur le CMH I de façon croisée par une voie de présentation antigénique vacuolaire dépendante de l'autophagie. Cette présentation pourra activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques à l'antigène inséré dans PapMV. Une fois activé, les lymphocytes T reconnaitront cet antigène à la surface d'une cellule tumorale. La sécrétion d'IFN- $\gamma$  (interféron-gamma) induira l'expression d'IDO. Cette immunosuppression pourra être bloquée par l'ajout de fludarabine qui permettra de diminuer l'expression d'IDO par l'activation de sa dégradation par le protéasome. **CMH I** : complexe majeur d'histocompatibilité, **CatS** : cathepsine S, **APC** : *antigen presenting cell*, **TLR7** : *toll-like receptor 7*, **JAK** : Janus kinase, **STAT1** : *signal transducers and activators of transcription 1*, **Fluda** : fludarabine, **Trp** : tryptophane, **Kyn** : kynurénine.

## Bibliographie

1. Joffre O, Nolte MA, Sporri R, Reis e Sousa C (2009) Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 227: 234-247.
2. Nakayama T, Singer A, Hsi ED, Samelson LE (1989) Intrathymic signalling in immature CD4+CD8+ thymocytes results in tyrosine phosphorylation of the T-cell receptor zeta chain. *Nature* 341: 651-654.
3. Wange RL, Samelson LE (1996) Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity* 5: 197-205.
4. Paz PE, Wang S, Clarke H, Lu X, Stokoe D, et al. (2001) Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells. *Biochem J* 356: 461-471.
5. Herndon TM, Shan XC, Tsokos GC, Wange RL (2001) ZAP-70 and SLP-76 regulate protein kinase C-theta and NF-kappa B activation in response to engagement of CD3 and CD28. *J Immunol* 166: 5654-5664.
6. Damle NK, Doyle LV, Grosmaire LS, Ledbetter JA (1988) Differential regulatory signals delivered by antibody binding to the CD28 (Tp44) molecule during the activation of human T lymphocytes. *J Immunol* 140: 1753-1761.
7. Jenkins MK, Chen CA, Jung G, Mueller DL, Schwartz RH (1990) Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody. *J Immunol* 144: 16-22.
8. Yokosuka T, Kobayashi W, Sakata-Sogawa K, Takamatsu M, Hashimoto-Tane A, et al. (2008) Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation. *Immunity* 29: 589-601.
9. Skanland SS, Moltu K, Berge T, Aandahl EM, Tasken K (2014) T-cell co-stimulation through the CD2 and CD28 co-receptors induces distinct signaling responses. *Biochem J*.
10. Sharpe AH (2009) Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev* 229: 5-11.
11. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, et al. (1999) Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 162: 3256-3262.
12. Shu U, Kuniwa M, Wu CY, Maliszewski C, Vezzio N, et al. (1995) Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol* 25: 1125-1128.
13. Seeds RE, Gordon S, Miller JL (2009) Characterisation of myeloid receptor expression and interferon alpha/beta production in murine plasmacytoid dendritic cells by flow cytometry. *J Immunol Methods* 350: 106-117.
14. Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA (1974) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J Exp Med* 139: 1431-1445.
15. Boltjes A, van Wijk F (2014) Human Dendritic Cell Functional Specialization in Steady-State and Inflammation. *Front Immunol* 5: 131.
16. Selmi C, Mackay IR, Gershwin ME (2007) The immunological milieu of the liver. *Semin Liver Dis* 27: 129-139.

17. Hussell T, Bell TJ (2014) Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol* 14: 81-93.
18. Batista FD, Neuberger MS (1998) Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate. *Immunity* 8: 751-759.
19. Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P (2003) CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res* 63: 2836-2843.
20. Kondo E, Gryschok L, Klein-Gonzalez N, Rademacher S, Weihrauch MR, et al. (2009) CD40-activated B cells can be generated in high number and purity in cancer patients: analysis of immunogenicity and homing potential. *Clin Exp Immunol* 155: 249-256.
21. Wennhold K, Shimabukuro-Vornhagen A, Theurich S, von Bergwelt-Baildon M (2013) CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: the final sprint toward clinical application. *Expert Rev Vaccines* 12: 631-637.
22. Gires O, Zimber-Strobl U, Gonnella R, Ueffing M, Marschall G, et al. (1997) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J* 16: 6131-6140.
23. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, et al. (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27: 68-73.
24. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330-336.
25. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061.
26. Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ (2007) All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* 204: 1765-1774.
27. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, et al. (2007) A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204: 1757-1764.
28. Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, et al. (2007) Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317: 256-260.
29. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, et al. (2007) Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3<sup>+</sup> T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 204: 1775-1785.
30. Antony PA, Paulos CM, Ahmadzadeh M, Akpinarli A, Palmer DC, et al. (2006) Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo. *J Immunol* 176: 5255-5266.
31. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY (2005) A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6: 1142-1151.
32. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S (2005) Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 201: 723-735.
33. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F (1999) An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 190: 995-1004.

34. Shevach EM (2009) Mechanisms of foxp3<sup>+</sup> T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30: 636-645.
35. von Boehmer H (2005) Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6: 338-344.
36. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, et al. (2007) The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450: 566-569.
37. Murray PJ, Wynn TA (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11: 723-737.
38. Galdiero MR, Garlanda C, Jaillon S, Marone G, Mantovani A (2013) Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *J Cell Physiol* 228: 1404-1412.
39. Lievens LA, Bezemer K, Aerts JG, Hegmans JP (2013) Tumor-associated macrophages in thoracic malignancies. *Lung Cancer* 80: 256-262.
40. Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, et al. (2011) CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 475: 222-225.
41. Tang X, Mo C, Wang Y, Wei D, Xiao H (2013) Anti-tumour strategies aiming to target tumour-associated macrophages. *Immunology* 138: 93-104.
42. Avdic S, Cao JZ, McSharry BP, Clancy LE, Brown R, et al. (2013) Human cytomegalovirus interleukin-10 polarizes monocytes toward a deactivated M2c phenotype to repress host immune responses. *J Virol* 87: 10273-10282.
43. Bility MT, Cheng L, Zhang Z, Luan Y, Li F, et al. (2014) Hepatitis B virus infection and immunopathogenesis in a humanized mouse model: induction of human-specific liver fibrosis and m2-like macrophages. *PLoS Pathog* 10: e1004032.
44. Stoermer KA, Burrack A, Oko L, Montgomery SA, Borst LB, et al. (2012) Genetic ablation of arginase 1 in macrophages and neutrophils enhances clearance of an arthritogenic alphavirus. *J Immunol* 189: 4047-4059.
45. Wang J, Li F, Sun R, Gao X, Wei H, et al. (2013) Bacterial colonization dampens influenza-mediated acute lung injury via induction of M2 alveolar macrophages. *Nat Commun* 4: 2106.
46. Richter M, Kamran M, Jodouin CA (1990) Surface receptors and immune activity of purified human circulating mononuclear cells. V. Circulating null cells and a factor secreted by the null cells inhibit the synthesis of receptors for Fc mu by T cells in culture. *Eur J Immunol* 20: 803-807.
47. Sykes M, Eisenthal A, Sachs DH (1988) Mechanism of protection from graft-vs-host disease in murine mixed allogeneic chimeras. I. Development of a null cell population suppressive of cell-mediated lympholysis responses and derived from the syngeneic bone marrow component. *J Immunol* 140: 2903-2911.
48. Talmadge JE, Gabrilovich DI (2013) History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer* 13: 739-752.
49. Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn JI, et al. (2010) HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med* 207: 2439-2453.
50. Finke J, Ko J, Rini B, Rayman P, Ireland J, et al. (2011) MDSC as a mechanism of tumor escape from sunitinib mediated anti-angiogenic therapy. *Int Immunopharmacol* 11: 856-861.

51. Guede L, Jensen-Taubman S, Bourboulia D, Kwityn CJ, Wei B, et al. (2012) TIMP-2 targets tumor-associated myeloid suppressor cells with effects in cancer immune dysfunction and angiogenesis. *J Immunother* 35: 502-512.
52. Simpson KD, Cross JV (2013) MIF: metastasis/MDSC-inducing factor? *Oncoimmunology* 2: e23337.
53. Simpson KD, Templeton DJ, Cross JV (2012) Macrophage migration inhibitory factor promotes tumor growth and metastasis by inducing myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Immunol* 189: 5533-5540.
54. Yu J, Du W, Yan F, Wang Y, Li H, et al. (2013) Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol* 190: 3783-3797.
55. Goh C, Narayanan S, Hahn YS (2013) Myeloid-derived suppressor cells: the dark knight or the joker in viral infections? *Immunol Rev* 255: 210-221.
56. Heim CE, Vidlak D, Scherr TD, Kozel JA, Holzapfel M, et al. (2014) Myeloid-Derived Suppressor Cells Contribute to Staphylococcus aureus Orthopedic Biofilm Infection. *J Immunol*.
57. Obregon-Henao A, Henao-Tamayo M, Orme IM, Ordway DJ (2013) Gr1(int)CD11b+ myeloid-derived suppressor cells in Mycobacterium tuberculosis infection. *PLoS One* 8: e80669.
58. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, et al. (2013) Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med* 19: 739-746.
59. Huard B, Mastrangeli R, Prigent P, Bruniquel D, Donini S, et al. (1997) Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5744-5749.
60. Hannier S, Tournier M, Bismuth G, Triebel F (1998) CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. *J Immunol* 161: 4058-4065.
61. Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, et al. (2008) Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 180: 5916-5926.
62. Okamura T, Fujio K, Shibuya M, Sumitomo S, Shoda H, et al. (2009) CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 13974-13979.
63. Brignone C, Escudier B, Grygar C, Marcu M, Triebel F (2009) A phase I pharmacokinetic and biological correlative study of IMP321, a novel MHC class II agonist, in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 15: 6225-6231.
64. Brignone C, Gutierrez M, Mefti F, Brain E, Jarcau R, et al. (2010) First-line chemoimmunotherapy in metastatic breast carcinoma: combination of paclitaxel and IMP321 (LAG-3Ig) enhances immune responses and antitumor activity. *J Transl Med* 8: 71.
65. El Mir S, Triebel F (2000) A soluble lymphocyte activation gene-3 molecule used as a vaccine adjuvant elicits greater humoral and cellular immune responses to both particulate and soluble antigens. *J Immunol* 164: 5583-5589.

66. Fougeray S, Brignone C, Triebel F (2006) A soluble LAG-3 protein as an immunopotentiator for therapeutic vaccines: Preclinical evaluation of IMP321. *Vaccine* 24: 5426-5433.
67. Freeman GJ, Wherry EJ, Ahmed R, Sharpe AH (2006) Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med* 203: 2223-2227.
68. Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, Kawaichi M, Honjo T (1994) Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics* 23: 704-706.
69. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, et al. (2000) Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192: 1027-1034.
70. Mamalis A, Garcha M, Jagdeo J (2014) Targeting the PD-1 pathway: a promising future for the treatment of melanoma. *Arch Dermatol Res*.
71. McDermott DF, Atkins MB (2013) PD-1 as a potential target in cancer therapy. *Cancer Med* 2: 662-673.
72. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, et al. (2012) Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366: 2443-2454.
73. Riella LV, Paterson AM, Sharpe AH, Chandraker A (2012) Role of the PD-1 pathway in the immune response. *Am J Transplant* 12: 2575-2587.
74. Gao W, Demirci G, Strom TB, Li XC (2003) Stimulating PD-1-negative signals concurrent with blocking CD154 co-stimulation induces long-term islet allograft survival. *Transplantation* 76: 994-999.
75. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, et al. (1991) CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 174: 561-569.
76. Lindsten T, Lee KP, Harris ES, Petryniak B, Craighead N, et al. (1993) Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J Immunol* 151: 3489-3499.
77. Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogawa K, Zeng H, et al. (2010) Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity* 33: 326-339.
78. Marengere LE, Waterhouse P, Duncan GS, Mittrucker HW, Feng GS, et al. (1996) Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science* 272: 1170-1173.
79. Wing K, Yamaguchi T, Sakaguchi S (2011) Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation. *Trends Immunol* 32: 428-433.
80. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, et al. (1994) CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1: 405-413.
81. Read S, Malmstrom V, Powrie F (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192: 295-302.
82. Grosso JF, Jure-Kunkel MN (2013) CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immun* 13: 5.
83. Keilholz U (2008) CTLA-4: negative regulator of the immune response and a target for cancer therapy. *J Immunother* 31: 431-439.
84. Royal RE, Levy C, Turner K, Mathur A, Hughes M, et al. (2010) Phase 2 trial of single agent Ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Immunother* 33: 828-833.

85. Sangro B, Gomez-Martin C, de la Mata M, Inarrairaegui M, Garralda E, et al. (2013) A clinical trial of CTLA-4 blockade with tremelimumab in patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C. *J Hepatol* 59: 81-88.
86. Singh N, Madan RA, Gulley JL (2013) Ipilimumab in prostate cancer. *Expert Opin Biol Ther* 13: 303-313.
87. Slovin SF, Higoano CS, Hamid O, Tejwani S, Harzstark A, et al. (2013) Ipilimumab alone or in combination with radiotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer: results from an open-label, multicenter phase I/II study. *Ann Oncol* 24: 1813-1821.
88. Wolchok JD, Hodi FS, Weber JS, Allison JP, Urban WJ, et al. (2013) Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Ann N Y Acad Sci* 1291: 1-13.
89. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, et al. (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363: 711-723.
90. Kronlage M, Song J, Sorokin L, Isfort K, Schwerdtle T, et al. (2010) Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. *Sci Signal* 3: ra55.
91. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, et al. (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440: 228-232.
92. Junger WG (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* 11: 201-212.
93. Hill LM, Gavala ML, Lenertz LY, Bertics PJ (2010) Extracellular ATP may contribute to tissue repair by rapidly stimulating purinergic receptor X7-dependent vascular endothelial growth factor release from primary human monocytes. *J Immunol* 185: 3028-3034.
94. Stagg J, Smyth MJ (2010) Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* 29: 5346-5358.
95. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF (2006) Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2: 351-360.
96. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, et al. (2007) Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 445: 771-775.
97. Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, et al. (2010) Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J Biol Chem* 285: 7176-7186.
98. Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ (2012) CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol* 33: 231-237.
99. Ghiringhelli F, Bruchard M, Chalmin F, Rebe C (2012) Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immuneescape. *J Biomed Biotechnol* 2012: 473712.
100. Roberts V, Stagg J, Dwyer KM (2014) The Role of Ectonucleotidases CD39 and CD73 and Adenosine Signaling in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol* 5: 64.
101. Kung JT, Brooks SB, Jakway JP, Leonard LL, Talmage DW (1977) Suppression of in vitro cytotoxic response by macrophages due to induced arginase. *J Exp Med* 146: 665-672.
102. Hecker M, Nematollahi H, Hey C, Busse R, Racke K (1995) Inhibition of arginase by NG-hydroxy-L-arginine in alveolar macrophages: implications for the utilization of L-arginine for nitric oxide synthesis. *FEBS Lett* 359: 251-254.

103. Anthony RM, Urban JF, Jr., Alem F, Hamed HA, Rozo CT, et al. (2006) Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med* 12: 955-960.
104. Witte MB, Barbul A (2003) Arginine physiology and its implication for wound healing. *Wound Repair Regen* 11: 419-423.
105. Bron L, Jandus C, Andrejevic-Blant S, Speiser DE, Monnier P, et al. (2013) Prognostic value of arginase-II expression and regulatory T-cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 132: E85-93.
106. Mao H, Gao W, Lu G, Fang F, Teng L (2013) Clinicopathological and prognostic implications of arginase expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Lab* 59: 37-43.
107. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, et al. (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281: 1191-1193.
108. Takikawa O (2005) Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 12-19.
109. Taylor MW, Feng GS (1991) Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J* 5: 2516-2522.
110. Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, et al. (2005) GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* 22: 633-642.
111. Beutelspacher SC, Pillai R, Watson MP, Tan PH, Tsang J, et al. (2006) Function of indoleamine 2,3-dioxygenase in corneal allograft rejection and prolongation of allograft survival by over-expression. *Eur J Immunol* 36: 690-700.
112. Li Y, Tredget EE, Ghaffari A, Lin X, Kilani RT, et al. (2006) Local expression of indoleamine 2,3-dioxygenase protects engraftment of xenogeneic skin substitute. *J Invest Dermatol* 126: 128-136.
113. Steckel NK, Kuhn U, Beelen DW, Elmaagacli AH (2003) Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation and in pregnant women: association with the induction of allogeneic immune tolerance? *Scand J Immunol* 57: 185-191.
114. Boasso A, Herbeuval JP, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, et al. (2007) HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 109: 3351-3359.
115. Grant RS, Naif H, Thuruthyil SJ, Nasr N, Littlejohn T, et al. (2000) Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in primary human macrophages by HIV-1. *Redox Rep* 5: 105-107.
116. Couzin-Frankel J (2013) Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* 342: 1432-1433.
117. Burnet M (1957) Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1: 779-786.
118. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3: 991-998.
119. Hakansson A, Gustafsson B, Krysanter L, Hakansson L (1996) Tumour-infiltrating lymphocytes in metastatic malignant melanoma and response to interferon alpha treatment. *Br J Cancer* 74: 670-676.



120. Hortobagyi GN (2001) Overview of treatment results with trastuzumab (Herceptin) in metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 28: 43-47.
121. Teplinsky E, Muggia F (2014) Targeting HER2 in ovarian and uterine cancers: Challenges and future directions. *Gynecol Oncol*.
122. Leach DR, Krummel MF, Allison JP (1996) Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271: 1734-1736.
123. Butt AQ, Mills KH (2014) Immunosuppressive networks and checkpoints controlling antitumor immunity and their blockade in the development of cancer immunotherapeutics and vaccines. *Oncogene* 33: 4623-4631.
124. Aranda F, Vacchelli E, Obrist F, Eggermont A, Galon J, et al. (2014) Trial Watch: Adoptive cell transfer for anticancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 3: e28344.
125. Payette PJ, Davis HL (2001) History of vaccines and positioning of current trends. *Curr Drug Targets Infect Disord* 1: 241-247.
126. de Quadros CA (2002) History and prospects for viral disease eradication. *Med Microbiol Immunol* 191: 75-81.
127. Ada GL (1988) What to expect of a good vaccine and how to achieve it. *Vaccine* 6: 77-79.
128. Pantaleo G, Levy Y (2013) Vaccine and immunotherapeutic interventions. *Curr Opin HIV AIDS* 8: 236-242.
129. Buonaguro L, Petrizzo A, Tornesello ML, Buonaguro FM (2011) Translating tumor antigens into cancer vaccines. *Clin Vaccine Immunol* 18: 23-34.
130. Burchill MA, Tamburini BA, Pennock ND, White JT, Kurche JS, et al. (2013) T cell vaccinology: exploring the known unknowns. *Vaccine* 31: 297-305.
131. Bedke J, Stenzl A (2013) IMA901: a peptide vaccine in renal cell carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs* 22: 1329-1336.
132. Engler OB, Dai WJ, Sette A, Hunziker IP, Reichen J, et al. (2001) Peptide vaccines against hepatitis B virus: from animal model to human studies. *Mol Immunol* 38: 457-465.
133. Valmori D, Fonteneau JF, Valitutti S, Gervois N, Dunbar R, et al. (1999) Optimal activation of tumor-reactive T cells by selected antigenic peptide analogues. *Int Immunol* 11: 1971-1980.
134. Salerno EP, Shea SM, Olson WC, Petroni GR, Smolkin ME, et al. (2013) Activation, dysfunction and retention of T cells in vaccine sites after injection of incomplete Freund's adjuvant, with or without peptide. *Cancer Immunol Immunother* 62: 1149-1159.
135. Hokey DA, Weiner DB (2006) DNA vaccines for HIV: challenges and opportunities. *Springer Semin Immunopathol* 28: 267-279.
136. Hooper JW, Josleyn M, Ballantyne J, Brocato R (2013) A novel Sin Nombre virus DNA vaccine and its inclusion in a candidate pan-hantavirus vaccine against hantavirus pulmonary syndrome (HPS) and hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). *Vaccine* 31: 4314-4321.
137. Kanazawa T, Takashima Y, Okada H (2012) Vaginal DNA vaccination against infectious diseases transmitted through the vagina. *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 2340-2353.
138. Kim TW, Lee JH, He L, Boyd DA, Hardwick JM, et al. (2005) Modification of professional antigen-presenting cells with small interfering RNA in vivo to enhance cancer vaccine potency. *Cancer Res* 65: 309-316.

139. Arrighi JF, Pion M, Wiznerowicz M, Geijtenbeek TB, Garcia E, et al. (2004) Lentivirus-mediated RNA interference of DC-SIGN expression inhibits human immunodeficiency virus transmission from dendritic cells to T cells. *J Virol* 78: 10848-10855.
140. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, et al. (2003) RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9: 347-351.
141. Kreiter S, Selmi A, Diken M, Koslowski M, Britten CM, et al. (2010) Intranodal vaccination with naked antigen-encoding RNA elicits potent prophylactic and therapeutic antitumoral immunity. *Cancer Res* 70: 9031-9040.
142. Kuhn AN, Diken M, Kreiter S, Selmi A, Kowalska J, et al. (2010) Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo. *Gene Ther* 17: 961-971.
143. Weide B, Carralot JP, Reese A, Scheel B, Eigentler TK, et al. (2008) Results of the first phase I/II clinical vaccination trial with direct injection of mRNA. *J Immunother* 31: 180-188.
144. Weide B, Pascolo S, Scheel B, Derhovannessian E, Pflugfelder A, et al. (2009) Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients. *J Immunother* 32: 498-507.
145. Andrieu JM, Lu W (2007) A dendritic cell-based vaccine for treating HIV infection: background and preliminary results. *J Intern Med* 261: 123-131.
146. Palucka K, Banchereau J (2013) Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity* 39: 38-48.
147. Dawson NA, Roesch EE (2014) Sipuleucel-T and immunotherapy in the treatment of prostate cancer. *Expert Opin Biol Ther* 14: 709-719.
148. Higano CS, Corman JM, Smith DC, Centeno AS, Steidle CP, et al. (2008) Phase 1/2 dose-escalation study of a GM-CSF-secreting, allogeneic, cellular immunotherapy for metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer* 113: 975-984.
149. Ward JE, McNeel DG (2007) GVAX: an allogeneic, whole-cell, GM-CSF-secreting cellular immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Expert Opin Biol Ther* 7: 1893-1902.
150. Rosenberg SA, Dudley ME (2009) Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol* 21: 233-240.
151. Hinrichs CS, Rosenberg SA (2014) Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunol Rev* 257: 56-71.
152. Smith DM, Simon JK, Baker JR, Jr. (2013) Applications of nanotechnology for immunology. *Nat Rev Immunol* 13: 592-605.
153. Chackerian B (2007) Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 6: 381-390.
154. Wang JW, Roden RB (2013) Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies. *Expert Rev Vaccines* 12: 129-141.
155. Buonaguro L, Tagliamonte M, Tornesello ML, Buonaguro FM (2011) Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases and cancer. *Expert Rev Vaccines* 10: 1569-1583.
156. Kang SM, Kim MC, Compans RW (2012) Virus-like particles as universal influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* 11: 995-1007.
157. Zheng M, Luo J, Chen Z (2014) Development of universal influenza vaccines based on influenza virus M and NP genes. *Infection* 42: 251-262.

158. Kawano M, Morikawa K, Suda T, Ohno N, Matsushita S, et al. (2014) Chimeric SV40 virus-like particles induce specific cytotoxicity and protective immunity against influenza A virus without the need of adjuvants. *Virology* 448: 159-167.
159. Cheong WS, Reisinger J, Turner SJ, Boyd R, Netter HJ (2009) Chimeric virus-like particles for the delivery of an inserted conserved influenza A-specific CTL epitope. *Antiviral Res* 81: 113-122.
160. Moffat JM, Cheong WS, Villadangos JA, Mintern JD, Netter HJ (2013) Hepatitis B virus-like particles access major histocompatibility class I and II antigen presentation pathways in primary dendritic cells. *Vaccine* 31: 2310-2316.
161. Peacey M, Wilson S, Perret R, Ronchese F, Ward VK, et al. (2008) Virus-like particles from rabbit hemorrhagic disease virus can induce an anti-tumor response. *Vaccine* 26: 5334-5337.
162. Goldinger SM, Dummer R, Baumgaertner P, Mihic-Probst D, Schwarz K, et al. (2012) Nano-particle vaccination combined with TLR-7 and -9 ligands triggers memory and effector CD8(+) T-cell responses in melanoma patients. *Eur J Immunol* 42: 3049-3061.
163. Sallberg M, Frelin L, Weiland O (2009) DNA vaccine therapy for chronic hepatitis C virus (HCV) infection: immune control of a moving target. *Expert Opin Biol Ther* 9: 805-815.
164. Ullah S, Shah MA, Riaz N (2012) Recent Advances in Development of DNA Vaccines Against Hepatitis C virus. *Indian J Virol* 23: 253-260.
165. Van Braeckel E, Desombere I, Clement F, Vandekerckhove L, Verhofstede C, et al. (2013) Polyfunctional CD4(+) T cell responses in HIV-1-infected viral controllers compared with those in healthy recipients of an adjuvanted polyprotein HIV-1 vaccine. *Vaccine* 31: 3739-3746.
166. Shirai M, Pendleton CD, Ahlers J, Takeshita T, Newman M, et al. (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.
167. Yamada A, Sasada T, Noguchi M, Itoh K (2013) Next-generation peptide vaccines for advanced cancer. *Cancer Sci* 104: 15-21.
168. Koff RS (2002) Immunogenicity of hepatitis B vaccines: implications of immune memory. *Vaccine* 20: 3695-3701.
169. Babin C, Majeau N, Leclerc D (2013) Engineering of papaya mosaic virus (PapMV) nanoparticles with a CTL epitope derived from influenza NP. *J Nanobiotechnology* 11: 10.
170. Denis J, Majeau N, Acosta-Ramirez E, Savard C, Bedard MC, et al. (2007) Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: evidence for the critical function of multimerization. *Virology* 363: 59-68.
171. Lacasse P, Denis J, Lapointe R, Leclerc D, Lamarre A (2008) Novel plant virus-based vaccine induces protective cytotoxic T-lymphocyte-mediated antiviral immunity through dendritic cell maturation. *J Virol* 82: 785-794.
172. Leclerc D, Beauseigle D, Denis J, Morin H, Pare C, et al. (2007) Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells. *J Virol* 81: 1319-1326.
173. Hoffman M (1991) Hepatitis A vaccine shows promise. *Science* 254: 1581-1582.

174. Klietmann W, Klietmann B, Cox J, Charbonnier C (1988) Effectiveness and tolerance of pre- and postexposure treatment with purified inactivated rabies vaccine prepared on Vero cell line. *Vaccine* 6: 39-43.
175. Drucker J, Soula G, Diallo O, Fabre P (1986) Evaluation of a new combined inactivated DPT-polio vaccine. *Dev Biol Stand* 65: 145-151.
176. Demicheli V, Rivetti A, Debalini MG, Di Pietrantonj C (2012) Vaccines for measles, mumps and rubella in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2: CD004407.
177. Talbot EA, Perkins MD, Silva SF, Frothingham R (1997) Disseminated bacille Calmette-Guerin disease after vaccination: case report and review. *Clin Infect Dis* 24: 1139-1146.
178. Chen Q, Lai H (2013) Plant-derived virus-like particles as vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 9: 26-49.
179. Lico C, Schoubben A, Baschieri S, Blasi P, Santi L (2013) Nanoparticles in biomedicine: new insights from plant viruses. *Curr Med Chem* 20: 3471-3487.
180. McCormick AA, Palmer KE (2008) Genetically engineered Tobacco mosaic virus as nanoparticle vaccines. *Expert Rev Vaccines* 7: 33-41.
181. Savard C, Guerin A, Drouin K, Bolduc M, Laliberte-Gagne ME, et al. (2011) Improvement of the trivalent inactivated flu vaccine using PapMV nanoparticles. *PLoS One* 6: e21522.
182. Morin H, Tremblay MH, Plante E, Pare C, Majeau N, et al. (2007) High avidity binding of engineered papaya mosaic virus virus-like particles to resting spores of *Plasmodiophora brassicae*. *J Biotechnol* 128: 423-434.
183. Savard C, Laliberte-Gagne ME, Babin C, Bolduc M, Guerin A, et al. (2012) Improvement of the PapMV nanoparticle adjuvant property through an increased of its avidity for the antigen [influenza NP]. *Vaccine* 30: 2535-2542.
184. Mathieu C, Rioux G, Dumas MC, Leclerc D (2013) Induction of innate immunity in lungs with virus-like nanoparticles leads to protection against influenza and *Streptococcus pneumoniae* challenge. *Nanomedicine* 9: 839-848.
185. Lebel ME, Daudelin JF, Chartrand K, Tarrab E, Kalinke U, et al. (2014) Nanoparticle adjuvant sensing by TLR7 enhances CD8+ T cell-mediated protection from *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 192: 1071-1078.
186. Acosta-Ramirez E, Perez-Flores R, Majeau N, Pastelin-Palacios R, Gil-Cruz C, et al. (2008) Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of papaya mosaic virus. *Immunology* 124: 186-197.
187. Rioux G, Babin C, Majeau N, Leclerc D (2012) Engineering of papaya mosaic virus (PapMV) nanoparticles through fusion of the HA11 peptide to several putative surface-exposed sites. *PLoS One* 7: e31925.
188. Cote F, Pare C, Majeau N, Bolduc M, Leblanc E, et al. (2008) Nucleotide sequence and phylogenetic analysis of a new potexvirus: Malva mosaic virus. *Infect Genet Evol* 8: 83-93.
189. Leclerc D, Rivest M, Babin C, Lopez-Macias C, Savard P (2013) A novel M2e based flu vaccine formulation for dogs. *PLoS One* 8: e77084.
190. Cresswell P (2005) Antigen processing and presentation. *Immunol Rev* 207: 5-7.
191. Cresswell P, Ackerman AL, Giodini A, Peaper DR, Wearsch PA (2005) Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev* 207: 145-157.

192. Bevan MJ (1976) Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 143: 1283-1288.
193. Cerovic V, Houston SA, Westlund J, Utriainen L, Davison ES, et al. (2014) Lymph-borne CD8alpha dendritic cells are uniquely able to cross-prime CD8 T cells with antigen acquired from intestinal epithelial cells. *Mucosal Immunol*.
194. Ashok D, Schuster S, Ronet C, Rosa M, Mack V, et al. (2014) Cross-presenting dendritic cells are required for control of *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol* 44: 1422-1432.
195. Li L, Kim S, Herndon JM, Goedegebuure P, Belt BA, et al. (2012) Cross-dressed CD8alpha+/CD103+ dendritic cells prime CD8+ T cells following vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 12716-12721.
196. Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, et al. (2009) Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol* 10: 488-495.
197. Marino E, Tan B, Binge L, Mackay CR, Grey ST (2012) B-cell cross-presentation of autologous antigen precipitates diabetes. *Diabetes* 61: 2893-2905.
198. de Wit J, Souwer Y, Jorritsma T, Klaasse Bos H, ten Brinke A, et al. (2010) Antigen-specific B cells reactivate an effective cytotoxic T cell response against phagocytosed *Salmonella* through cross-presentation. *PLoS One* 5: e13016.
199. Ritchie DS, Yang J, Hermans IF, Ronchese F (2004) B-Lymphocytes activated by CD40 ligand induce an antigen-specific anti-tumour immune response by direct and indirect activation of CD8(+) T-cells. *Scand J Immunol* 60: 543-551.
200. Shen H, Ackerman AL, Cody V, Giodini A, Hinson ER, et al. (2006) Enhanced and prolonged cross-presentation following endosomal escape of exogenous antigens encapsulated in biodegradable nanoparticles. *Immunology* 117: 78-88.
201. Desjardins M (2003) ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol* 3: 280-291.
202. Gagnon E, Duclos S, Rondeau C, Chevet E, Cameron PH, et al. (2002) Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110: 119-131.
203. Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, et al. (2003) Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425: 402-406.
204. Singh R, Cresswell P (2010) Defective cross-presentation of viral antigens in GILT-free mice. *Science* 328: 1394-1398.
205. Ackerman AL, Giodini A, Cresswell P (2006) A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 25: 607-617.
206. Imai J, Hasegawa H, Maruya M, Koyasu S, Yahara I (2005) Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells. *Int Immunol* 17: 45-53.
207. Koopmann JO, Albring J, Huter E, Bulbuc N, Spee P, et al. (2000) Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity* 13: 117-127.

208. Fiegl D, Kagebein D, Liebler-Tenorio EM, Weisser T, Sens M, et al. (2013) Amphisomal route of MHC class I cross-presentation in bacteria-infected dendritic cells. *J Immunol* 190: 2791-2806.
209. Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, et al. (2003) ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425: 397-402.
210. Song R, Harding CV (1996) Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J Immunol* 156: 4182-4190.
211. Shen L, Sigal LJ, Boes M, Rock KL (2004) Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 21: 155-165.
212. Saveanu L, Carroll O, Weimershaus M, Guermonprez P, Firat E, et al. (2009) IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science* 325: 213-217.
213. van Endert P (2011) Post-proteasomal and proteasome-independent generation of MHC class I ligands. *Cell Mol Life Sci* 68: 1553-1567.
214. Di Pucchio T, Chatterjee B, Smed-Sorensen A, Clayton S, Palazzo A, et al. (2008) Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat Immunol* 9: 551-557.
215. Basha G, Lizee G, Reinicke AT, Seipp RP, Omilusik KD, et al. (2008) MHC class I endosomal and lysosomal trafficking coincides with exogenous antigen loading in dendritic cells. *PLoS One* 3: e3247.
216. Chen L, Jondal M (2004) Alternative processing for MHC class I presentation by immature and CpG-activated dendritic cells. *Eur J Immunol* 34: 952-960.
217. Chen L, Jondal M (2009) TLR9 activation increases TAP-independent vesicular MHC class I processing in vivo. *Scand J Immunol* 70: 431-438.
218. Kurotaki T, Tamura Y, Ueda G, Oura J, Kutomi G, et al. (2007) Efficient cross-presentation by heat shock protein 90-peptide complex-loaded dendritic cells via an endosomal pathway. *J Immunol* 179: 1803-1813.
219. Bertholet S, Goldszmid R, Morrot A, Debrabant A, Afrin F, et al. (2006) Leishmania antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. *J Immunol* 177: 3525-3533.
220. Johnstone C, Ramos M, Garcia-Barreno B, Lopez D, Melero JA, et al. (2012) Exogenous, TAP-independent lysosomal presentation of a respiratory syncytial virus CTL epitope. *Immunol Cell Biol* 90: 978-982.
221. Tooze SA, Jefferies HB, Kalie E, Longatti A, McAlpine FE, et al. (2010) Trafficking and signaling in mammalian autophagy. *IUBMB Life* 62: 503-508.
222. Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, et al. (2009) Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol* 11: 468-476.
223. Klionsky DJ, Schulman BA (2014) Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nat Struct Mol Biol* 21: 336-345.
224. Pyo JO, Nah J, Jung YK (2012) Molecules and their functions in autophagy. *Exp Mol Med* 44: 73-80.

225. Ganley IG (2013) Autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Essays Biochem* 55: 65-78.
226. Lucocq J, Walker D (1997) Evidence for fusion between multilamellar endosomes and autophagosomes in HeLa cells. *Eur J Cell Biol* 72: 307-313.
227. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, et al. (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8: 445-544.
228. Deretic V (2009) Multiple regulatory and effector roles of autophagy in immunity. *Curr Opin Immunol* 21: 53-62.
229. Schmid D, Munz C (2007) Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* 27: 11-21.
230. Nedjic J, Aichinger M, Mizushima N, Klein L (2009) Macroautophagy, endogenous MHC II loading and T cell selection: the benefits of breaking the rules. *Curr Opin Immunol* 21: 92-97.
231. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15: 1101-1111.
232. Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J, Mizushima N, Klein L (2008) Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* 455: 396-400.
233. Dongre AR, Kovats S, deRoos P, McCormack AL, Nakagawa T, et al. (2001) In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. *Eur J Immunol* 31: 1485-1494.
234. Brazil MI, Weiss S, 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.
235. Dorfel D, Appel S, Grunebach F, Weck MM, Muller MR, et al. (2005) Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro-transcribed MUC1 RNA. *Blood* 105: 3199-3205.
236. Nimmerjahn F, Milosevic S, Behrends U, Jaffee EM, Pardoll DM, et al. (2003) Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol* 33: 1250-1259.
237. Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, et al. (2005) Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 307: 593-596.
238. Li Y, Wang LX, Yang G, Hao F, Urba WJ, et al. (2008) Efficient cross-presentation depends on autophagy in tumor cells. *Cancer Res* 68: 6889-6895.
239. Uhl M, Kepp O, Jusforgues-Saklani H, Vicencio JM, Kroemer G, et al. (2009) Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Cell Death Differ* 16: 991-1005.
240. English L, Chemali M, Duron J, Rondeau C, Laplante A, et al. (2009) Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol* 10: 480-487.
241. Tey SK, Khanna R (2012) Autophagy mediates transporter associated with antigen processing-independent presentation of viral epitopes through MHC class I pathway. *Blood* 120: 994-1004.

242. Evel-Kabler K, Chen SY (2006) Inhibition of antigen-presentation attenuators to augment vaccines. *Curr Opin Mol Ther* 8: 24-30.
243. McDermott D, Haanen J, Chen TT, Lorigan P, O'Day S, et al. (2013) Efficacy and safety of ipilimumab in metastatic melanoma patients surviving more than 2 years following treatment in a phase III trial (MDX010-20). *Ann Oncol* 24: 2694-2698.
244. Westin JR, Chu F, Zhang M, Fayad LE, Kwak LW, et al. (2014) Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 15: 69-77.
245. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, et al. (2013) Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 369: 122-133.
246. Wolchok JD, Weber JS, Maio M, Neyns B, Harmankaya K, et al. (2013) Four-year survival rates for patients with metastatic melanoma who received ipilimumab in phase II clinical trials. *Ann Oncol* 24: 2174-2180.
247. Kyi C, Postow MA (2014) Checkpoint blocking antibodies in cancer immunotherapy. *FEBS Lett* 588: 368-376.
248. Godin-Ethier J, Hanafi LA, Piccirillo CA, Lapointe R (2011) Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives. *Clin Cancer Res* 17: 6985-6991.
249. U.S. NIH (2014) Indoximod clinical trials, <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=indoximod&Search=Search>
250. John S, Thangapandian S, Sakkiah S, Lee KW (2010) Identification of potent virtual leads to design novel indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors: pharmacophore modeling and molecular docking studies. *Eur J Med Chem* 45: 4004-4012.
251. Nakashima H, Uto Y, Nakata E, Nagasawa H, Ikkyu K, et al. (2008) Synthesis and biological activity of 1-methyl-tryptophan-tirapazamine hybrids as hypoxia-targeting indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 16: 8661-8669.
252. Du R, Xia L, Ning X, Liu L, Sun W, et al. (2014) Hypoxia-induced Bmi1 promotes renal tubular epithelial cell-mesenchymal transition and renal fibrosis via PI3K/Akt signal. *Mol Biol Cell* 25: 2650-2659.
253. Matsuno K, Takai K, Isaka Y, Unno Y, Sato M, et al. (2010) S-benzylisothiurea derivatives as small-molecule inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 5126-5129.
254. Nakano S, Takai K, Isaka Y, Takahashi S, Unno Y, et al. (2012) Identification of novel kynurenine production-inhibiting benzenesulfonamide derivatives in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 419: 556-561.
255. Yamamoto R, Yamamoto Y, Imai S, Fukutomi R, Ozawa Y, et al. (2014) Effects of various phytochemicals on indoleamine 2,3-dioxygenase 1 activity: galanal is a novel, competitive inhibitor of the enzyme. *PLoS One* 9: e88789.
256. Fung SP, Wang H, Tomek P, Squire CJ, Flanagan JU, et al. (2013) Discovery and characterisation of hydrazines as inhibitors of the immune suppressive enzyme, indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1). *Bioorg Med Chem* 21: 7595-7603.
257. Fallarino F, Grohmann U, Puccetti P (2012) Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function. *Eur J Immunol* 42: 1932-1937.
258. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, et al. (2011) Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol* 12: 870-878.



259. Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, Sutanto-Ward E, Prendergast GC (2005) Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* 11: 312-319.
260. Burke F, Knowles RG, East N, Balkwill FR (1995) The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the anti-tumour activity of human interferon-gamma in vivo. *Int J Cancer* 60: 115-122.
261. Takikawa O, Habara-Ohkubo A, Yoshida R (1990) IFN-gamma is the inducer of indoleamine 2,3-dioxygenase in allografted tumor cells undergoing rejection. *J Immunol* 145: 1246-1250.
262. Takikawa O, Habara-Ohkubo A, Yoshida R (1991) Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor cells transplanted into allogeneic mouse: interferon-gamma is the inducer. *Adv Exp Med Biol* 294: 437-444.
263. Shirey KA, Jung JY, Maeder GS, Carlin JM (2006) Upregulation of IFN-gamma receptor expression by proinflammatory cytokines influences IDO activation in epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res* 26: 53-62.
264. Gambin A, Charzynska A, Ellert-Miklaszewska A, Rybinski M (2013) Computational models of the JAK1/2-STAT1 signaling. *JAKSTAT* 2: e24672.
265. Du MX, Sotero-Esteve WD, Taylor MW (2000) Analysis of transcription factors regulating induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by IFN-gamma. *J Interferon Cytokine Res* 20: 133-142.
266. He YW, Wang HS, Zeng J, Fang X, Chen HY, et al. (2013) Sodium butyrate inhibits interferon-gamma induced indoleamine 2,3-dioxygenase expression via STAT1 in nasopharyngeal carcinoma cells. *Life Sci* 93: 509-515.
267. Jiang GM, He YW, Fang R, Zhang G, Zeng J, et al. (2010) Sodium butyrate down-regulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase at the transcriptional and post-transcriptional levels. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 1840-1846.
268. Zhang P, Jiang G, Gao J, Li L, Du J, et al. (2013) SAHA down-regulates the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase via inhibition of the JAK/STAT1 signaling pathway in gallbladder carcinoma cells. *Oncol Rep* 29: 269-275.
269. Jeong YI, Jung ID, Lee JS, Lee CM, Lee JD, et al. (2007) (-)-Epigallocatechin gallate suppresses indoleamine 2,3-dioxygenase expression in murine dendritic cells: evidences for the COX-2 and STAT1 as potential targets. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 1004-1009.
270. Cheng CW, Shieh PC, Lin YC, Chen YJ, Lin YH, et al. (2010) Indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunomodulatory protein, is suppressed by (-)-epigallocatechin-3-gallate via blocking of gamma-interferon-induced JAK-PKC-delta-STAT1 signaling in human oral cancer cells. *J Agric Food Chem* 58: 887-894.
271. Ogawa K, Hara T, Shimizu M, Nagano J, Ohno T, et al. (2012) (-)-Epigallocatechin gallate inhibits the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human colorectal cancer cells. *Oncol Lett* 4: 546-550.
272. Noh KT, Chae SH, Chun SH, Jung ID, Kang HK, et al. (2013) Resveratrol suppresses tumor progression via the regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 431: 348-353.
273. Lee HJ, Jeong YI, Lee TH, Jung ID, Lee JS, et al. (2007) Rosmarinic acid inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in murine dendritic cells. *Biochem Pharmacol* 73: 1412-1421.

274. Jeong YI, Kim SW, Jung ID, Lee JS, Chang JH, et al. (2009) Curcumin suppresses the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by blocking the Janus-activated kinase-protein kinase Cdelta-STAT1 signaling pathway in interferon-gamma-stimulated murine dendritic cells. *J Biol Chem* 284: 3700-3708.
275. Frank DA, Mahajan S, Ritz J (1999) Fludarabine-induced immunosuppression is associated with inhibition of STAT1 signaling. *Nat Med* 5: 444-447.
276. Lico C, Mancini C, Italiani P, Betti C, Boraschi D, et al. (2009) Plant-produced potato virus X chimeric particles displaying an influenza virus-derived peptide activate specific CD8+ T cells in mice. *Vaccine* 27: 5069-5076.
277. McCormick AA, Corbo TA, Wykoff-Clary S, Nguyen LV, Smith ML, et al. (2006) TMV-peptide fusion vaccines induce cell-mediated immune responses and tumor protection in two murine models. *Vaccine* 24: 6414-6423.
278. Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, Lu YC, et al. (2014) Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science* 344: 641-645.
279. Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, et al. (2010) Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med* 207: 637-650.
280. Corthay A, Skovseth DK, Lundin KU, Rosjo E, Omholt H, et al. (2005) Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity* 22: 371-383.
281. Mumberg D, Monach PA, Wanderling S, Philip M, Toledano AY, et al. (1999) CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8633-8638.
282. Rioux G, Majeau N, Leclerc D (2012) Mapping the surface-exposed regions of papaya mosaic virus nanoparticles. *FEBS J* 279: 2004-2011.
283. Sprangers MC, Lakhai W, Koudstaal W, Verhoeven M, Koel BF, et al. (2003) Quantifying adenovirus-neutralizing antibodies by luciferase transgene detection: addressing preexisting immunity to vaccine and gene therapy vectors. *J Clin Microbiol* 41: 5046-5052.
284. Ruedl C, Storni T, Lechner F, Bachi T, Bachmann MF (2002) Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP. *Eur J Immunol* 32: 818-825.
285. Riese RJ, Wolf PR, Bromme D, Natkin LR, Villadangos JA, et al. (1996) Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4: 357-366.
286. Casten LA, Pierce SK (1988) Receptor-mediated B cell antigen processing. Increased antigenicity of a globular protein covalently coupled to antibodies specific for B cell surface structures. *J Immunol* 140: 404-410.
287. Boxer LA, Baehner RL, Davis J (1977) The effect of 2-deoxyglucose on guinea pig polymorphonuclear leukocyte phagocytosis. *J Cell Physiol* 91: 89-102.
288. Lindstedt KA, Kokkonen JO, Kovanen PT (1992) Soluble heparin proteoglycans released from stimulated mast cells induce uptake of low density lipoproteins by macrophages via scavenger receptor-mediated phagocytosis. *J Lipid Res* 33: 65-75.
289. Mimura N, Asano A (1976) Synergistic effect of colchicine and cytochalasin D on phagocytosis by peritoneal macrophages. *Nature* 261: 319-321.

290. Tanaka Y, Taneichi M, Kasai M, Kakiuchi T, Uchida T (2010) Liposome-coupled antigens are internalized by antigen-presenting cells via pinocytosis and cross-presented to CD8 T cells. *PLoS One* 5: e15225.
291. Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 127: 1217-1232.
292. Kuhn M (1998) The microtubule depolymerizing drugs nocodazole and colchicine inhibit the uptake of *Listeria monocytogenes* by P388D1 macrophages. *FEMS Microbiol Lett* 160: 87-90.
293. Yumoto R, Nishikawa H, Okamoto M, Katayama H, Nagai J, et al. (2006) Clathrin-mediated endocytosis of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line RLE-6TN. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L946-955.
294. Srivastava L, Tundup S, Choi BS, Norberg T, Harn D (2014) Immunomodulatory glycan lacto-N-fucopentaose III requires clathrin-mediated endocytosis to induce alternative activation of antigen-presenting cells. *Infect Immun* 82: 1891-1903.
295. Pratten MK, Lloyd JB (1986) Pinocytosis and phagocytosis: the effect of size of a particulate substrate on its mode of capture by rat peritoneal macrophages cultured in vitro. *Biochim Biophys Acta* 881: 307-313.
296. Evnouchidou I, Weimershaus M, Saveanu L, van Endert P (2014) ERAP1-ERAP2 Dimerization Increases Peptide-Trimming Efficiency. *J Immunol*.
297. Siedentop KH, Schobel H (1991) Stapedectomy modified by the application of fibrin tissue adhesive. *Am J Otol* 12: 443-445.
298. Andersson H, Hallberg M (2012) Discovery of inhibitors of insulin-regulated aminopeptidase as cognitive enhancers. *Int J Hypertens* 2012: 789671.
299. Basha G, Omilusik K, Chavez-Steenbock A, Reinicke AT, Lack N, et al. (2012) A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway. *Nat Immunol* 13: 237-245.
300. Villadangos JA, Bryant RA, Deussing J, Driessen C, Lennon-Dumenil AM, et al. (1999) Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* 172: 109-120.
301. Gromme M, Uytdehaag FG, Janssen H, Calafat J, van Binnendijk RS, et al. (1999) Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10326-10331.
302. Abdel Motal UM, Zhou X, Joki A, Siddiqi AR, Srinivasa BR, et al. (1993) Major histocompatibility complex class I-binding peptides are recycled to the cell surface after internalization. *Eur J Immunol* 23: 3224-3229.
303. van Weert AW, Geuze HJ, Groothuis B, Stoorvogel W (2000) Primaquine interferes with membrane recycling from endosomes to the plasma membrane through a direct interaction with endosomes which does not involve neutralisation of endosomal pH nor osmotic swelling of endosomes. *Eur J Cell Biol* 79: 394-399.
304. Kobayashi H, Fukuda M (2013) Arf6, Rab11 and transferrin receptor define distinct populations of recycling endosomes. *Commun Integr Biol* 6: e25036.
305. Harding CV, Song R (1994) Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol* 153: 4925-4933.
306. De Meyer I, Martinet W, Schrijvers DM, Timmermans JP, Bult H, et al. (2012) Toll-like receptor 7 stimulation by imiquimod induces macrophage autophagy and inflammation in atherosclerotic plaques. *Basic Res Cardiol* 107: 269.

307. Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V (2008) Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J* 27: 1110-1121.
308. Shin DM, Yuk JM, Lee HM, Lee SH, Son JW, et al. (2010) Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling. *Cell Microbiol* 12: 1648-1665.
309. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, et al. (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6: 1221-1228.
310. Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, et al. (2004) Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 304: 1500-1502.
311. Young MM, Takahashi Y, Khan O, Park S, Hori T, et al. (2012) Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J Biol Chem* 287: 12455-12468.
312. Zeng RX, Zhang YB, Fan Y, Wu GL (2014) p62/SQSTM1 is involved in caspase-8 associated cell death induced by proteasome inhibitor MG132 in U87MG cells. *Cell Biol Int*.
313. Huang S, Okamoto K, Yu C, Sinicrope FA (2013) p62/sequestosome-1 up-regulation promotes ABT-263-induced caspase-8 aggregation/activation on the autophagosome. *J Biol Chem* 288: 33654-33666.
314. Zhang YB, Gong JL, Xing TY, Zheng SP, Ding W (2013) Autophagy protein p62/SQSTM1 is involved in HAMLET-induced cell death by modulating apoptosis in U87MG cells. *Cell Death Dis* 4: e550.
315. Seglen PO, Gordon PB (1982) 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 1889-1892.
316. Noda T, Ohsumi Y (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 273: 3963-3966.
317. Kondylis V, van Nispen Tot Pannerden HE, van Dijk S, Ten Broeke T, Wubbolts R, et al. (2013) Endosome-mediated autophagy: an unconventional MIIC-driven autophagic pathway operational in dendritic cells. *Autophagy* 9: 861-880.
318. Mantegazza AR, Savina A, Vermeulen M, Perez L, Geffner J, et al. (2008) NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood* 112: 4712-4722.
319. Romao S, Gasser N, Becker AC, Guhl B, Bajagic M, et al. (2013) Autophagy proteins stabilize pathogen-containing phagosomes for prolonged MHC II antigen processing. *J Cell Biol* 203: 757-766.
320. Longatti A, Lamb CA, Razi M, Yoshimura S, Barr FA, et al. (2012) TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *J Cell Biol* 197: 659-675.
321. Pallet N, Sirois I, Bell C, Hanafi LA, Hamelin K, et al. (2013) A comprehensive characterization of membrane vesicles released by autophagic human endothelial cells. *Proteomics* 13: 1108-1120.
322. Fader CM, Colombo MI (2006) Multivesicular bodies and autophagy in erythrocyte maturation. *Autophagy* 2: 122-125.

323. Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou DY, Singh N, et al. (2007) Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117: 2570-2582.
324. Liu X, Shin N, Koblisch HK, Yang G, Wang Q, et al. (2010) Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. *Blood* 115: 3520-3530.
325. Santin AD, Ravaggi A, Bellone S, Pecorelli S, Cannon M, et al. (2001) Tumor-infiltrating lymphocytes contain higher numbers of type 1 cytokine expressors and DR+ T cells compared with lymphocytes from tumor draining lymph nodes and peripheral blood in patients with cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 81: 424-432.
326. Godin-Ethier J, Pelletier S, Hanafi LA, Gannon PO, Forget MA, et al. (2009) Human activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumors through Th1/Th2 balance. *J Immunol* 183: 7752-7760.
327. Saito T, Pardoll DM, Fowlkes BJ, Ohno H (1990) A murine thymocyte clone expressing gamma delta T cell receptor mediates natural killer-like cytolytic function and TH1-like lymphokine production. *Cell Immunol* 131: 284-301.
328. Chong AS, Ybarrondo B, Grimes WJ, Hersh EM, Scuderi P (1990) Phenotypic analyses of lymphokine-activated killer cells that release interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Immunol Immunother* 31: 255-259.
329. Nishimura T, Kitamura H, Iwakabe K, Yahata T, Ohta A, et al. (2000) The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 12: 987-994.
330. Mattarollo SR, West AC, Steegh K, Duret H, Paget C, et al. (2012) NKT cell adjuvant-based tumor vaccine for treatment of myc oncogene-driven mouse B-cell lymphoma. *Blood* 120: 3019-3029.
331. Inafuku M, Li C, Kanda Y, Kawamura T, Takeda K, et al. (2012) Beta-glucosylceramide administration (i.p.) activates natural killer T cells in vivo and prevents tumor metastasis in mice. *Lipids* 47: 581-591.
332. Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, et al. (2000) Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 164: 3596-3599.
333. Kim SI, Jeong YI, Jung ID, Lee JS, Lee CM, et al. (2007) p-Coumaric acid inhibits indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in murine dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 7: 805-815.
334. Sharma MD, Hou DY, Liu Y, Koni PA, Metz R, et al. (2009) Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood* 113: 6102-6111.
335. Muller AJ, Sharma MD, Chandler PR, Duhadaway JB, Everhart ME, et al. (2008) Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17073-17078.
336. Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, et al. (2004) Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 114: 280-290.

337. Gao YF, Peng RQ, Li J, Ding Y, Zhang X, et al. (2009) The paradoxical patterns of expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in colon cancer. *J Transl Med* 7: 71.
338. Gamberale R, Fernandez-Calotti P, Sanchez-Avalos J, Alberto MF, Geffner J, et al. (2006) The effect of fludarabine on interferon-gamma production by lymphoid cells from healthy donors and patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 91: 574-576.
339. Martinez-Lostao L, Briones J, Forne I, Martinez-Gallo M, Ferrer B, et al. (2005) Role of the STAT1 pathway in apoptosis induced by fludarabine and JAK kinase inhibitors in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 46: 435-442.
340. Litzenburger UM, Opitz CA, Sahm F, Rauschenbach KJ, Trump S, et al. (2014) Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget* 5: 1038-1051.
341. Onodera T, Jang MH, Guo Z, Yamasaki M, Hirata T, et al. (2009) Constitutive expression of IDO by dendritic cells of mesenteric lymph nodes: functional involvement of the CTLA-4/B7 and CCL22/CCR4 interactions. *J Immunol* 183: 5608-5614.
342. Aiken CT, Kaake RM, Wang X, Huang L (2011) Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Mol Cell Proteomics* 10: R110 006924.
343. Orabona C, Pallotta MT, Volpi C, Fallarino F, Vacca C, et al. (2008) SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20828-20833.
344. Hucke C, MacKenzie CR, Adjogble KD, Takikawa O, Daubener W (2004) Nitric oxide-mediated regulation of gamma interferon-induced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun* 72: 2723-2730.
345. Orabona C, Belladonna ML, Vacca C, Bianchi R, Fallarino F, et al. (2005) Cutting edge: silencing suppressor of cytokine signaling 3 expression in dendritic cells turns CD28-Ig from immune adjuvant to suppressant. *J Immunol* 174: 6582-6586.
346. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Grohmann U, Puccetti P, et al. (2010) Proteasomal Degradation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in CD8 Dendritic Cells is Mediated by Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3). *Int J Tryptophan Res* 3: 91-97.
347. ter Brugge PJ, Ta VB, de Bruijn MJ, Keijzers G, Maas A, et al. (2009) A mouse model for chronic lymphocytic leukemia based on expression of the SV40 large T antigen. *Blood* 114: 119-127.
348. Lindstrom V, Aittoniemi J, Jylhava J, Eklund C, Hurme M, et al. (2012) Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and expression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 12: 363-365.
349. Thaker AI, Shaker A, Rao MS, Ciorba MA (2012) Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). *J Vis Exp*.
350. Thaker AI, Rao MS, Bishnupuri KS, Kerr TA, Foster L, et al. (2013) IDO1 metabolites activate beta-catenin signaling to promote cancer cell proliferation and colon tumorigenesis in mice. *Gastroenterology* 145: 416-425 e411-414.
351. Byun AJ, Hung KE, Fleet JC, Bronson RT, Mason JB, et al. (2014) Colon-specific tumorigenesis in mice driven by Cre-mediated inactivation of Apc and activation of mutant Kras. *Cancer Lett* 347: 191-195.

352. Baban B, Chandler P, McCool D, Marshall B, Munn DH, et al. (2004) Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. *J Reprod Immunol* 61: 67-77.
353. Hou DY, Muller AJ, Sharma MD, DuHadaway J, Banerjee T, et al. (2007) Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res* 67: 792-801.
354. Overwijk WW, Theoret MR, Finkelstein SE, Surman DR, de Jong LA, et al. (2003) Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells. *J Exp Med* 198: 569-580.
355. Plecas B, Ugresic N, Hristic M, Popovic A, Jovovic D (1989) The response of rat adrenal medulla to oxytocin. *Arch Int Physiol Biochim* 97: 303-308.
356. Yardley DA (2013) Drug resistance and the role of combination chemotherapy in improving patient outcomes. *Int J Breast Cancer* 2013: 137414.
357. April MD, Wood R, Berkowitz BK, Paltiel AD, Anglaret X, et al. (2014) The survival benefits of antiretroviral therapy in South Africa. *J Infect Dis* 209: 491-499.
358. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
359. Yang HJ, Yen MC, Lin CC, Lin CM, Chen YL, et al. (2010) A combination of the metabolic enzyme inhibitor APO866 and the immune adjuvant L-1-methyl tryptophan induces additive antitumor activity. *Exp Biol Med (Maywood)* 235: 869-876.
360. Jure-Kunkel M, Masters G, Girit E, Dito G, Lee F, et al. (2013) Synergy between chemotherapeutic agents and CTLA-4 blockade in preclinical tumor models. *Cancer Immunol Immunother* 62: 1533-1545.
361. Ma Y, Adjemian S, Mattarollo SR, Yamazaki T, Aymeric L, et al. (2013) Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity* 38: 729-741.
362. Ullrich E, Bonmort M, Mignot G, Chaput N, Taieb J, et al. (2007) Therapy-induced tumor immunosurveillance involves IFN-producing killer dendritic cells. *Cancer Res* 67: 851-853.
363. Spranger S, Koblish HK, Horton B, Scherle PA, Newton R, et al. (2014) Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8(+) T cells directly within the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer* 2: 3.
364. Ito H, Ando T, Ando K, Ishikawa T, Saito K, et al. (2014) Induction of HBsAg-specific cytotoxic T lymphocytes can be up-regulated by the inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase activity. *Immunology*.
365. Ou X, Cai S, Liu P, Zeng J, He Y, et al. (2008) Enhancement of dendritic cell-tumor fusion vaccine potency by indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase inhibitor, 1-MT. *J Cancer Res Clin Oncol* 134: 525-533.
366. Bangham CR (2009) CTL quality and the control of human retroviral infections. *Eur J Immunol* 39: 1700-1712.
367. Maher J, Davies ET (2004) Targeting cytotoxic T lymphocytes for cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 91: 817-821.

# **Annexe I : Manuscrit de revue du rôle de l'IDO dans les tumeurs**

Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives

*Clinical Cancer Research, 2011 Nov 15;17(22):6985-91*

*L.-A. Hanafi et J. Godin-Ethier sont responsables de la majorité de la réalisation des travaux de recherche. L.-A. Hanafi est principalement responsable de la rédaction de cet article. C.A. Piccirillo a fourni un apport de réflexion intellectuelle. R. Lapointe a supervisé l'ensemble de l'étude.*



## Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Human Cancers: Clinical and Immunologic Perspectives

Jessica Godin-Ethier<sup>1</sup>, Laïla-Aïcha Hanafi<sup>1</sup>, Ciriaco A. Piccirillo<sup>2</sup>, and Réjean Lapointe<sup>1</sup>

### Abstract

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is a tryptophan-catabolizing enzyme with immune-regulating activities in many contexts, such as fetal protection, allograft protection, and cancer progression. Clinical trials are currently evaluating IDO inhibition with 1-methyltryptophan in cancer immunotherapy. However, the exact role of tryptophan catabolism by IDO in human cancers remains poorly understood. Here, we review several studies that correlate IDO expression in human cancer samples and tumor-draining lymph nodes, with relevant clinical or immunologic parameters. IDO expression in various histologic cancer types seems to decrease tumor infiltration of immune cells and to increase the proportion of regulatory T lymphocytes in the infiltrate. The impact of IDO on different immune cell infiltration leads to the conclusion that IDO negatively regulates the recruitment of antitumor immune cells. In addition, increased IDO expression correlates with diverse tumor progression parameters and shorter patient survival. In summary, in the vast majority of the reported studies, IDO expression is correlated with a less favorable prognosis. As we may see results from the first clinical trials with 1-methyltryptophan in years to come, this review brings together IDO studies from human studies and aims to help appreciate outcomes from current and future trials. Consequently, IDO inhibition seems a promising approach for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*; 17(22); 6985–91. ©2011 AACR.

### Introduction

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is the key metabolic enzyme implicated in tryptophan catabolism. Its immunomodulating function was first described by Munn and colleagues in a study highlighting the crucial role played by IDO in fetal protection from maternal T lymphocytes during pregnancy (1). Since its discovery, IDO has been studied in many immunologic contexts. For instance, IDO can suppress T-cell-mediated graft rejection in a pancreatic islet allograft model (2). IDO effects on immune suppression are due to decreased tryptophan availability and the generation of tryptophan metabolites, culminating in multipronged negative effects on T lymphocytes in proximity to IDO-expressing cells, notably on proliferation, function,

and survival. More specifically, tryptophan degradation by IDO directly affects T-cell proliferation via the activation of the GCN2 kinase pathway (3). Some tryptophan metabolites also have the potential to induce apoptosis in lymphocytes (4). Moreover, low tryptophan concentration combined with the presence of kynurenin, a downstream metabolite, decreases the expression of the T-cell receptor  $\zeta$  chain, resulting in reversible T-cell anergy (5). Finally, IDO activity seems to favor a regulatory phenotype in CD4<sup>+</sup> T cells (6–8).

Functional IDO also emerges in tumors, making it a good candidate for cancer therapy (9). Its expression seems to contribute to the negative immune regulation arising in the tumor microenvironment. IDO seems to act as one of the multiple immunoregulatory mechanisms modulated by the tumor to evade immune surveillance, in addition to the downregulation of MHC class I, the expression of other immunosuppressive molecules, and the recruitment of regulatory immune cells. Blockade of IDO activity by 1-methyltryptophan (1-MT) results in decreased tumor proliferation dependent on specific T-lymphocyte response (10). Furthermore, IDO expression has been described in 25 different human cancer types (10). In addition, expression by tumor-draining lymph node (TDLN) dendritic cells is a second mode of action by which IDO can favor cancer progression (11). Expression of IDO in the tumor microenvironment negatively affects the immune response within the tumor and, by extension, in the TDLN. On the other hand, tryptophan catabolism by IDO can act as a negative modulator of tumor growth. One group has reported an

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Hôpital Notre-Dame, Université de Montréal and Institut du Cancer de Montréal; <sup>2</sup>Center for the Study of Host Resistance, Montreal General Hospital, McGill University, Montréal, Québec, Canada

**Note:** J. Godin-Ethier and L.A. Hanafi contributed equally to this article.

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1331

©2011 American Association for Cancer Research.

### Translational Relevance

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibitors, such as 1-methyltryptophan, were recently identified as a priority in translational research by the Immune Response Modifier Pathway Prioritization Working Group from the NIH. Although the causal link between IDO and tumor growth is confirmed in many mouse models, the exact role of IDO in human tumors needs further confirmation. In this review, we correlate IDO expression with different prognosis factors and immunologic consequences in multiple human cancers. The aim of this review is to help better appreciate multiple clinical trials that are currently evaluating 1-methyltryptophan benefits in different solid and hematopoietic cancers. Furthermore, studies presented in this review tend to link IDO expression with different negative prognosis markers. Modulation of IDO functions is, accordingly, a future target for large-scale cancer treatment.

inhibitory effect of IFN- $\gamma$  on cancer cell proliferation mediated by tryptophan deprivation via IDO enzymatic activity (12). In a different context, Muller and colleagues observed the regression of established tumors when 1-MT was administered to T-cell-competent mice in combination with chemotherapy (13).

IDO's role and mechanism of action on immune evasion and tumor growth are still poorly understood in human cancer. Many studies have examined a possible correlation between IDO expression and diverse clinical or immunologic parameters. This review discusses the potential implication of IDO in tumor progression by analyzing its expression in human cancer samples correlated with different immunologic and clinical parameters.

### Development

The link between clinical parameters and IDO expression in tumors has been investigated in many cancer types. This research has revealed an association between IDO expression and a change in the density of different immune cell populations infiltrating tumors and an effect on cancer progression and on patient survival (Fig. 1; Table 1).

#### Tumor-infiltrating immune cell decrease

Different immune cell populations found at the tumor site or in TDLNs can be affected by the presence of IDO in their environment. In patients with colorectal cancer, high expression of IDO has been associated with lower CD3<sup>+</sup> T-lymphocyte infiltration in tumor specimens (14). Similarly, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were found in reduced numbers in ovarian cancer tissue in which high IDO expression was detected (15). Also, CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocyte as well as CD57<sup>+</sup> natural killer cell infiltration was diminished in endometrial cancers with elevated IDO levels (16). Because of the importance of immune infiltration for antitumor response, this reduction of some beneficial immune populations suggests that IDO expression in human tumors can facilitate immune evasion.

Surprisingly, association between the presence of IDO and CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte infiltration has never been evaluated, despite the defined negative effect of IDO on this cellular population and, especially, on the Th1 subtype (17). Only 1 study has reported a significant CD8<sup>+</sup> T-lymphocyte decrease without any difference in total CD3<sup>+</sup> T-lymphocyte population (15). These results suggest that the proportion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes is either unchanged or increased. However, because of the absence of a marker specific to CD4 in this study, the abundance of the CD4<sup>+</sup> population could not be directly quantified. These observations could, however, lead to the hypothesis that the differentiation from naïve T lymphocyte to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells

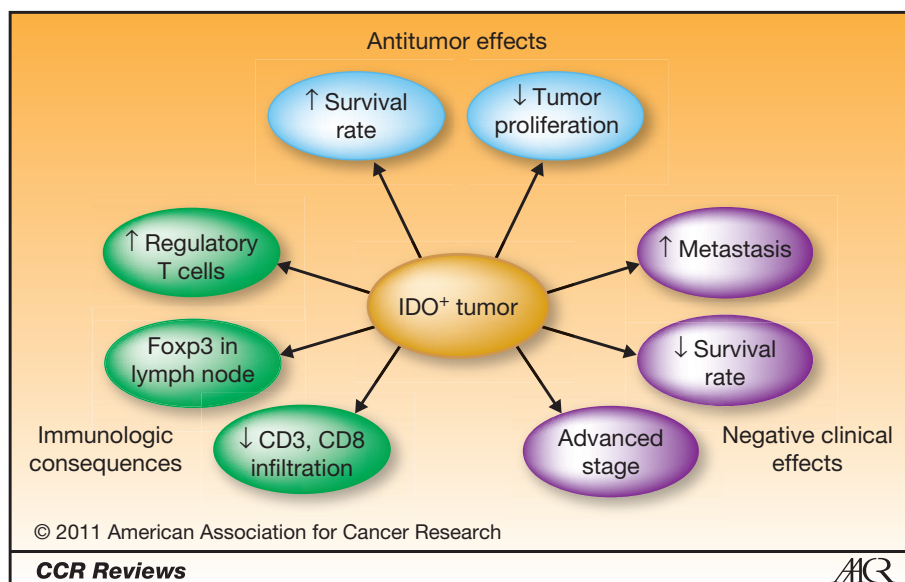


Figure 1. Schematic of the different clinical parameters associated with tumors expressing IDO. The different aspects are divided based on their impact on the immune system, tumor progression, or tumor regression.

© 2011 American Association for Cancer Research

CCR Reviews



**Table 1.** Correlation of clinical parameters with IDO expression in different cancer types

| Cancer type           | Detection methods  | IDO correlates with: <sup>a</sup>   | Reference |
|-----------------------|--|---|-----------|
| Colorectal            | IHC (high expression 56/143 patients)  | ↑ Hepatic metastasis<br>↓ CD3 infiltration  | 14        |
|                       | Serum tryptophan (66 patients)   | ↑ Hepatic metastasis  | 39        |
|                       | IHC in tumor (high expression in 9/71 patients) and dLN (high density in 21/60 patients) | ↓ 5-year survival rate  | 33        |
| Uterine cervical      | IHC (100% of microinvasive or invasive cancer)   | Invasion by tumors  | 29        |
| Endometrial           | IHC (high expression in 37/80 patients) and Western blot (4/7)                           | Advanced stage<br><br>LN metastasis<br>↓ Global and progression-free survival     | 26        |
| Hepatocellular        | IHC (high expression in 32/65 tissues)   | ↓ CD3, CD8, CD57 infiltration<br>↓ Progression-free survival                      | 16        |
|                       | RT-PCR (12/21 patients) and IHC (for IDO <sup>+</sup> in mRNA)                           | ↑ Progression-free survival   | 36        |
|                       | IHC (overexpression in 49/138 tissues)   | ↑ IFN- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$<br>Metastasis<br>↓ Global survival | 25        |
| Leukemia (AML)        | RT-PCR (40/76 patients) and ICC (40/76 patients)   | ↑ CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> frequency                 | 20        |
| Breast                | IHC (SLN of 47 patients)   | LN metastasis with Foxp3 coexpression   | 24        |
| Melanoma              | IHC (SLN of 40 patients)   | ↓ Long-term survival  | 31        |
|                       | IHC and RT-PCR (15 patients)   | Advanced stage  | 28        |
| Ovarian               | IHC (high expression in 34/60 patients)  | Advanced stage<br>↓ CD8 infiltration<br>↓ Global and disease-free survival        | 15        |
|                       | Microarray and IHC (expression in 17/24 serous type patients)                            | Paclitaxel resistance   | 34        |
|                       | IHC (expression in 67/122 patients)  | ↓ Global survival   | 35        |
| Pancreatic            | IHC (3%–50% expression in 17/17 tumors)  | ↓ Global survival<br>T <sub>reg</sub> in metastatic LN                            | 22        |
| Lung (non–small cell) | IHC (25 patients with IDO in eosinophils)  | ↓ Survival  | 32        |
| Renal                 | Quantitative RT-PCR (55 primary tumor + 52 metastasis)                                   | ↓ Tumor proliferation   | 37        |
|                       |  | Western blot and IHC (expression in microvessels)                                 |           |
| Nasopharyngeal        | IHC (9 patients + immortalized cell line)  | Advanced histologic stage   | 27        |

Abbreviations: AML, acute myelogenous leukemia; dLN, draining lymph node; ICC, immunocytochemistry; IHC, immunohistochemistry; IL, interleukin; LN, lymph node; RT-PCR, reverse-transcription PCR; SLN, skin lymph node.

<sup>a</sup>Up arrow indicates increase, and down arrow indicates decrease.

(T<sub>reg</sub>), which is known to be favored by an IDO-rich environment (8), can be responsible for this apparent increase in CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> populations. In addition, IDO activity seems to inhibit natural killer, CD8<sup>+</sup> T-, and Th1 CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation without affecting the Th2 population (18), and it could even favor a Th2 polarization (19). These observations could be another explanation for the lack of CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte decrease in IDO-expressing tumor.

### Regulatory T-cell infiltration increase

As mentioned earlier, T<sub>reg</sub> and IDO have been shown to have closely related immunosuppressive features. Thus, an

association between IDO expression by tumor cells and T<sub>reg</sub> frequency has been a matter of interest in different studies. Specifically, higher T<sub>reg</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> frequency has been observed in patients with acute myeloid leukemia when tumor cells express IDO (20, 21). Moreover, patients with pancreatic adenocarcinoma were more densely infiltrated by T<sub>reg</sub> in metastatic lymph nodes compared with nonmetastatic lymph nodes (22). Also, in all the cases, those metastatic lymph nodes were expressing IDO at different levels. The authors proposed that IDO expression in lymph nodes from patients with pancreatic adenocarcinoma could lead to the recruitment of regulatory T

lymphocytes. However, it is not clear whether IDO allows the specific recruitment of  $T_{reg}$  or the conversion from naïve  $CD4^+$  T lymphocytes, because this phenomenon can occur, at least *in vitro* (23). On the other hand, increase in  $T_{reg}$  proportion could be attributed to an inhibition of  $Foxp3^+$   $T_{reg}$  reprogramming in Th1 by IDO, as shown by Sharma and colleagues (8). Following CpG vaccination, IDO was expressed in mice. Conversely, the expression of IDO may be a consequence of  $T_{reg}$  infiltration in metastatic lymph nodes. Finally, simultaneous expression of IDO and  $Foxp3$  in TDLNs has been measured in many patients with breast cancer, and this has been correlated with the presence of metastases in those TDLNs (24). From all these studies, we can conclude that IDO favors  $T_{reg}$  in tumors by recruitment or by enhancing conversion of naïve T lymphocytes in  $T_{reg}$ .

### Link with cancer progression

Many factors associated with tumor progression have been positively correlated with high expression of IDO in cancer cells. On the one hand, frequency of hepatic metastasis has been found to be significantly increased in patients with colorectal cancer presenting high IDO expression in their tumor (14). Strong IDO expression in hepatocellular tumors has also been associated with the presence of distant metastases (25). In addition, metastases in TDLNs have been found preferentially in patients with endometrial tumors expressing IDO at a high level (26). For patients with this tumor type or for patients with ovarian carcinoma and nasopharyngeal carcinoma, high levels of IDO have been detected in advanced stages of the disease (15, 26, 27). Polak and colleagues investigated many immunosuppressive molecules in cutaneous melanoma, and IDO expression in positive or negative skin lymph nodes seems to increase with melanoma progression (28). Also, invasive and microinvasive forms of uterine cancer are correlated with high expression of IDO (29). Finally, IDO expression has been found in all microinvasive and invasive uterine cervical cancer, whereas noninvasive tumors presented a much lower expression (30). However, the mechanistic link between cancer progression and IDO expression cannot be explained by these correlative observations. Further studies are needed to better understand whether IDO expression is mechanistically responsible for tumor progression or whether tumors evolve to express IDO during their development to maintain an immune-suppressive environment in response to antitumor T cells.

### Association with patient survival

In the majority of the studies that have focused on IDO expression in human cancer, patients with high expression of IDO had decreased global and progression-free survival. Notably, this correlation has been reported for patients with endometrial cancer. In 2 studies, IDO expression evaluated by immunohistochemistry (IHC) and enzymatic activity has been inversely correlated with progression-free survival (16, 26, 31). Also, IDO measurement by IHC in hepatocellular carcinoma samples from 138 patients has established that low IDO expression correlates with an improved

overall survival (25). For patients with invasive cervical cancer treated with radical hysterectomy, it has been observed that focal and diffuse IDO expression in cancer tissue correlates with decreased overall and progression-free survival, whereas patients with no IDO expression in their tumor had a better survival (30). In non-small-cell lung carcinoma, eosinophils were also positive for IDO and correlated with lower patient survival (32). In a Chinese cohort of patients with colon cancer, IDO and Bin1 were analyzed in tumor tissues and TDLNs with or without metastasis. A relatively low percentage of tumors was found to express IDO (12%). However, 21 out of 60 TDLNs analyzed had a high density of IDO<sup>+</sup> cells, and these have been associated with a decreased 5-year survival rate (33). Finally, it has been observed that patients with ovarian carcinoma presenting high IDO expression, as evaluated by IHC (15) or global gene expression profiles (34, 35), have a shorter postsurgery life expectancy.

Only 2 studies have reported results contradictory to those discussed above. First, increased relapse-free survival has been correlated with the presence of IDO mRNA in hepatocellular carcinomas (36). However, protein expression was not investigated in this study. On the other hand, Kaplan–Meier curves could not show a significant difference between low and high IDO expression in patients with renal carcinoma. Interestingly, this study was the only one to report IDO expression almost exclusive to newly formed microvessels in the tumor. This IDO expression has been inversely correlated with Ki67<sup>+</sup> tumor cells, a proliferation marker. From these observations, it has been assumed that endothelial cells expressing IDO were responsible for the decreased tumor cell proliferation (37). These results suggest that IDO can have a noxious effect on tumor growth when an inefficient antitumor immune response is taking place in a host.

Association between IDO expression by tumors and the presence of metastases or various clinical parameters strongly suggests that IDO contributes to tumor progression. Moreover, IDO expression has been identified as an independent prognostic marker in many cancer types. Thus, this immunosuppressive molecule could possibly be used as a classifying marker to identify patients with higher relapse susceptibility or a less favorable prognosis. In addition, IDO expression could even serve as a marker capable of identifying patients for whom adjuvant therapies would be more beneficial, thus preventing unnecessary administration in a proportion of patients. In the era of personalized care, TDLNs or tumor tissue biopsies could be done prior to IDO inhibitor administration to select patients expressing IDO in their tumors who would better respond to the treatment.

### Discussion

Globally, studies reviewed herein tend to associate IDO expression by human tumors with a less favorable prognosis for patients. In the majority of these studies, IDO expression in tumor tissues was evaluated by IHC. However, until now no attention has been paid to the recently

identified IDO2 isoform. Furthermore, IDO enzymatic activity in cancer has rarely been investigated. Interestingly, researchers in an ovarian epithelial cancer study have reported IDO expression in 43% of analyzed tissues (83/192), and this finding was shown to be correlated with a lower tryptophan-to-kynurenin ratio in the tumor environment (38). Similar results were obtained in a study from Huang and colleagues in which they observed that lower serum tryptophan in patients with colorectal carcinoma was correlated with reduced quality of life (39). Also, the tryptophan serum level and the tryptophan-to-kynurenin ratio have been found to be significantly lower in patients with ovarian carcinoma compared with healthy women. This level correlated with different serum immune activation markers (40). Together, these results point out that the IDO expressed in tumor tissue can be enzymatically active, but no mechanistic link has been established as a causative factor. Further studies must be conducted to completely elucidate the relationship between IDO expression and tumor growth in humans.

As previously mentioned, the studies presented above have associated IDO with a less favorable clinical outcome. However, mechanistic studies aimed at establishing how IDO can affect tumor progression are still rare. Yoshida and colleagues have shown an *in vivo* role of IDO in tumor progression, using a xenograft model of human ovarian tumor cells transfected with IDO (41). Also, Muller and colleagues have proposed that the downregulation of *Bin1*, a tumor suppressor gene, promotes IDO expression in tumors via STAT1/NF- $\kappa$ B-dependent mechanisms (13). Furthermore, IDO production resulting from these molecular events has been found to mediate the immune escape of tumor cells lacking *Bin1*. The latter finding is interesting given that the expression of *Bin1* is frequently altered in human breast, prostate, brain, colon, skin, and lung cancers (reviewed in ref. 42). However, IDO and *Bin1* expression in colon cancer tissue was stained by IHC and failed to show any correlation (33).

Considering the prevailing expression of IDO in a large proportion of tumors, this enzyme could be an interesting target in cancer immunotherapy. Moreover, the induction of this immuno-regulating molecule has been reported as a result of immune system manipulation aimed at inducing an antitumor response. On the basis of the findings in the studies discussed above, this IDO induction in response to immune system stimulation could hamper the generation of an effective antitumor response. We can speculate that the efficiency of anticancer vaccines could be improved when the vaccines are administered in combination with an IDO-inhibiting agent. This hypothesis has been corroborated in a mouse model. In fact, Ou and colleagues have observed that the administration of a vaccine made of dendritic cells fused with pulmonary carcinoma cells induced IDO expression in TDLNs and splenocytes (43). Considering that CpG oligonucleotides are known to elicit IDO expression in dendritic (44) and B cells (45), it is not surprising that a vaccine containing CpG elements induces IDO in various immune cells. CpG elements incorporated

in DNA vaccines could stimulate IDO expression in the spleen and lymph nodes (46). Apart from small-molecule inhibitors, other ways of targeting IDO in a clinical setting have been proposed. Sørensen and colleagues have patented the use of IDO-specific cytotoxic T cells for cancer treatment (47). These specific clones combined with viral antigen immunity have been shown to enhance the specific immune response (48). Although promising, this alternative option presents some potential disadvantages, such as the potential recognition of antigen-presenting cells expressing IDO. Also, there is no evidence that IDO-specific CTLs have the potential to recognize and kill tumor cells *in vivo*. Together, these findings suggest that the inhibition of IDO enzymatic activity could improve attempts to generate an efficient antitumor immune response.

IDO enzymatic activity can be inhibited by small molecules analogous to tryptophan. The most studied inhibitor to date is the 1-MT. Both isomers (D-1-MT and L-1-MT) have been used for their IDO inhibition capacity. Depending on the experimental context, one or the other is more efficient in inhibiting tryptophan catabolism or immunomodulatory properties of IDO. In mice, the administration of 1-MT as a single therapeutic agent was sufficient to delay the apparition of tumors (10, 49) but could not lead to the complete rejection of established tumors (13). However, chemotherapeutic drugs have shown superior efficacy to inhibit tumor progression when administered in combination with 1-MT (13), suggesting that IDO inhibitors combined with other agents could be more beneficial than their administration as a single agent.

Information obtained from murine studies has led to the initiation of clinical studies aimed at investigating the antitumor efficacy of D-1-MT in patients with cancer at the end of 2007. Currently, National Cancer Institute clinical trials are aimed at evaluating safety, pharmacodynamics, and clinical responses in patients with breast, non-small-cell lung, and other refractory solid cancers (50). However, the use of this isomer is still controversial in humans because of its relative specificity to the IDO2 isoform. Even if some effects have been shown in mouse models, D-1-MT has been found to preferentially target the IDO2 isoform that could be inactive in proportions reaching 50% of the population, because of 2 polymorphisms affecting its enzymatic activity (51). Recent studies established that L-1-MT would be preferable to inhibit IDO activity in both dendritic cells and human cancer cells. These studies also showed that both IDO and IDO2 were expressed in monocyte-derived dendritic cells, but only IDO could participate in tryptophan degradation and only L-1-MT could abolish this activity (52). Moreover, *in vitro* studies with T lymphocytes from blood, ascites, or tumor tissue of patients with ovarian epithelial cancer showed that their proliferation could be inhibited by ovarian IDO-expressing cancer cells. Only L-1-MT or a mix of D and L-1-MT, but not D-1-MT, was able to restore T-cell proliferation (38). Currently, further investigations are needed to confirm the potential use of IDO inhibitors in a clinical context to treat cancer. However, with the results of the

studies reviewed here, IDO seems to be a potential target to enhance antitumor response in patients with cancer. Although 1-MT may bring interesting effects, the ideal inhibitor for clinical use may have yet to be discovered.

## Conclusions

All of the observations described earlier seem to implicate IDO as a key regulator of tumor immune evasion. Almost all of the correlation analyses show an association between IDO and characteristics generally related to poor prognosis.

## References

- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998;281:1191–3.
- Alexander AM, Crawford M, Bertera S, Rudert WA, Takikawa O, Robbins PD, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. *Diabetes* 2002;51:356–65.
- Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* 2005;22:633–42.
- Ogata S, Takeuchi M, Fujita H, Shibata K, Okumura K, Taguchi H. Apoptosis induced by nicotinamide-related compounds and quinolinic acid in HL-60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:327–32.
- Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 2006;176:6752–61.
- Montagnoli C, Fallarino F, Gaziano R, Bozza S, Bellocchio S, Zelante T, et al. Immunity and tolerance to *Aspergillus* involve functionally distinct regulatory T cells and tryptophan catabolism. *J Immunol* 2006;176:1712–23.
- Curti A, Pandolfi S, Valzasina B, Aluigi M, Isidori A, Ferri E, et al. Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25<sup>-</sup> into CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Blood* 2007;109:2871–7.
- Sharma MD, Hou DY, Baban B, Koni PA, He Y, Chandler PR, et al. Reprogrammed foxp3(+) regulatory T cells provide essential help to support cross-presentation and CD8(+) T cell priming in naive mice. *Immunity* 2010;33:942–54.
- Löb S, Königsrainer A, Rammensee HG, Opelz G, Terness P. Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? *Nat Rev Cancer* 2009;9:445–52.
- Uytendove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003;9:1269–74.
- Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, Antonia SJ, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 2004;114:280–90.
- Ozaki Y, Edelstein MP, Duch DS. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:1242–6.
- Muller AJ, DuHadaway JB, Donovan PS, Sutanto-Ward E, Prendergast GC. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* 2005;11:312–9.
- Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, Schneeberger S, Obrist P, Winkler C, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res* 2006;12:1144–51.
- Inaba T, Ino K, Kajiyama H, Yamamoto E, Shibata K, Nawa A, et al. Role of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase in the progression of ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2009;115:185–92.
- Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Yoshida N, Terauchi M, Nawa A, et al. Inverse correlation between tumoral expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. *Clin Cancer Res* 2008;14:2310–7.
- Odemuyiwa SO, Ghahary A, Li Y, Puttagunta L, Lee JE, Musat-Marcu S, et al. Cutting edge: human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Immunol* 2004;173:5909–13.
- Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med* 2002;196:459–68.
- Xu H, Oriss TB, Fei M, Henry AC, Melgert BN, Chen L, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase in lung dendritic cells promotes Th2 responses and allergic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:6690–5.
- Curti A, TrabANELLI S, Onofri C, Aluigi M, Salvestrini V, Ocadlikova D, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase leukemic dendritic cells impair leukemia-specific immune response by inducing potent T regulatory cells. *Haematologia* 2010;95:2022–30.
- Curti A, Aluigi M, Pandolfi S, Ferri E, Isidori A, Salvestrini V, et al. Acute myeloid leukemia cells constitutively express the immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia* 2007;21:353–5.
- Witkiewicz AK, Costantino CL, Metz R, Muller AJ, Prendergast GC, Yeo CJ, et al. Genotyping and expression analysis of IDO2 in human pancreatic cancer: a novel, active target. *J Am Coll Surg* 2009;208:781–7, discussion 787–9.
- Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, et al. Tryptophan catabolism generates autoimmune-preventive regulatory T cells. *Transpl Immunol* 2006;17:58–60.
- Mansfield AS, Heikkila PS, Vaara AT, von Smitten KA, Vakkila JM, Leidenius MH. Simultaneous Foxp3 and IDO expression is associated with sentinel lymph node metastases in breast cancer. *BMC Cancer* 2009;9:231–40.
- Pan K, Wang H, Chen MS, Zhang HK, Weng DS, Zhou J, et al. Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:1247–53.
- Ino K, Yoshida N, Kajiyama H, Shibata K, Yamamoto E, Kidokoro K, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. *Br J Cancer* 2006;95:1555–61.
- Liu P, Xie BL, Cai SH, He YW, Zhang G, Yi YM, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in nasopharyngeal carcinoma impairs the cytolytic function of peripheral blood lymphocytes. *BMC Cancer* 2009;9:416–28.
- Polak ME, Borthwick NJ, Gabriel FG, Johnson P, Higgins B, Hurren J, et al. Mechanisms of local immunosuppression in cutaneous melanoma. *Br J Cancer* 2007;96:1879–87.
- Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. *Cancer Sci* 2007;98:874–81.

## Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Received May 25, 2011; revised August 9, 2011; accepted August 19, 2011; published OnlineFirst November 8, 2011.

30. Inaba T, Ino K, Kajiyama H, Shibata K, Yamamoto E, Kondo S, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts impaired survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy. *Gynecol Oncol* 2010;117:423-8.
31. Brody JR, Costantino CL, Berger AC, Sato T, Lisanti MP, Yeo CJ, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. *Cell Cycle* 2009;8:1930-4.
32. Astigiano S, Morandi B, Costa R, Mastracci L, D'Agostino A, Ratto GB, et al. Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune escape in human non-small cell lung cancer. *Neoplasia* 2005;7:390-6.
33. Gao YF, Peng RQ, Li J, Ding Y, Zhang X, Wu XJ, et al. The paradoxical patterns of expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in colon cancer. *J Transl Med* 2009;7:71-8.
34. Okamoto A, Nikaido T, Ochiai K, Takakura S, Saito M, Aoki Y, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005;6030-9.
35. Takao M, Okamoto A, Nikaido T, Urashima M, Takakura S, Saito M, et al. Increased synthesis of indoleamine-2,3-dioxygenase protein is positively associated with impaired survival in patients with serous-type, but not with other types of, ovarian cancer. *Oncol Rep* 2007;17:1333-9.
36. Ishio T, Goto S, Tahara K, Tone S, Kawano K, Kitano S. Immunoactive role of indoleamine 2,3-dioxygenase in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:319-26.
37. Riesenberger R, Weiler C, Spring O, Eder M, Buchner A, Popp T, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor endothelial cells correlates with long-term survival of patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:6993-7002.
38. Qian F, Vilella J, Wallace PK, Mhawech-Fauceglia P, Tario JD Jr, Andrews C, et al. Efficacy of levo-1-methyl tryptophan and dextro-1-methyl tryptophan in reversing indoleamine-2,3-dioxygenase-mediated arrest of T-cell proliferation in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2009;69:5498-504.
39. Huang A, Fuchs D, Widner B, Glover C, Henderson DC, Allen-Mersh TG. Serum tryptophan decrease correlates with immune activation and impaired quality of life in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002;86:1691-6.
40. Sperner-Unterwieser B, Neurauter G, Klieber M, Kurz K, Meraner V, Zeimet A, et al. Enhanced tryptophan degradation in patients with ovarian carcinoma correlates with several serum soluble immune activation markers. *Immunobiology* 2010;216:296-301.
41. Yoshida N, Ino K, Ishida Y, Kajiyama H, Yamamoto E, Shibata K, et al. Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human endometrial carcinoma cells induces rapid tumor growth in a mouse xenograft model. *Clin Cancer Res* 2008;14:7251-9.
42. Prendergast GC, Muller AJ, Ramalingam A, Chang MY. BAR the door: cancer suppression by amphiphysin-like genes. *Biochim Biophys Acta* 2009;1795:25-36.
43. Ou X, Cai S, Liu P, Zeng J, He Y, Wu X, et al. Enhancement of dendritic cell-tumor fusion vaccine potency by indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase inhibitor, 1-MT. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:525-33.
44. Mellor AL, Baban B, Chandler PR, Manlapat A, Kahler DJ, Munn DH. Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling. *J Immunol* 2005;175:5601-5.
45. Johnson BA 3rd, Kahler DJ, Baban B, Chandler PR, Kang B, Shimoda M, et al. B-lymphoid cells with attributes of dendritic cells regulate T cells via indoleamine 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:10644-8.
46. Zeng J, Cai S, Yi Y, He Y, Wang Z, Jiang G, et al. Prevention of spontaneous tumor development in a ret transgenic mouse model by ret peptide vaccination with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitor 1-methyl tryptophan. *Cancer Res* 2009;69:3963-70.
47. Sørensen RB, Berge-Hansen L, Junker N, Hansen CA, Hadrup SR, Schumacher TN, et al. The immune system strikes back: cellular immune responses against indoleamine 2,3-dioxygenase. *PLoS ONE* 2009;4:e6910.
48. Sørensen RB, Hadrup SR, Svane IM, Hjørtsù MC, Thor Straten P, Andersen MH. Indoleamine 2,3-dioxygenase specific, cytotoxic T cells as immune regulators. *Blood* 2011;117:2200-10.
49. Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, Dessureault S, Cantor A, Extermann M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int J Cancer* 2002;101:151-5.
50. National Cancer Institute NCI (2011) IDO inhibitor for relapsed and refractory solid tumors. [Clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) information [cited 2011 May 15]. Available from: <http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/view?cdrid=655213&version=HealthProfessional&protocolsearchid=9615145>.
51. Metz R, Duhadaway JB, Kamasani U, Laury-Kleintop L, Muller AJ, Prendergast GC. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitor compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Res* 2007;67:7082-7.
52. Lob S, Konigsrainer A, Schafer R, Rammensee H-G, Opelz G, Terness P. Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan abrogates the IDO activity of human dendritic cells. *Blood* 2008;111:2152-4.

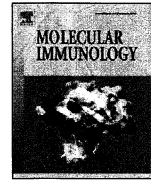
## **Annexe II : Manuscrit complémentaire étudiant l'expression d'IDO dans les lymphocytes B humains**

IDO expression by human B lymphocytes in response to lymphocyte stimuli and TLR engagement is biologically inactive

*Molecular Immunology, 2011 Oct;49(1-2):253-9*

*J. Godin-Ethier (Figures 1, 2B et 4 du manuscrit) et L.-A. Hanafi (Figures 2A, 3 et 5 du manuscrit) sont responsables de la majorité de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article. J.-B. Duvignaud et D. Leclerc ont apporté une contribution technique (Figure 5 du manuscrit). R. Lapointe a supervisé l'ensemble de l'étude.*





## IDO expression by human B lymphocytes in response to T lymphocyte stimuli and TLR engagement is biologically inactive

Jessica Godin-Ethier<sup>a</sup>, Laïla-Aïcha Hanafi<sup>a</sup>, Jean-Baptiste Duvignaud<sup>b,c</sup>, Denis Leclerc<sup>b</sup>, Réjean Lapointe<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) – Hôpital Notre-Dame, Department of Medicine, Université de Montréal, Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>b</sup> Centre de Recherche en Infectiologie, Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL), Université Laval, Québec, Québec, Canada

<sup>c</sup> PROTEO, Université Laval, Québec, Québec, Canada

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 July 2011

Received in revised form 24 August 2011

Accepted 25 August 2011

Available online 19 September 2011

#### Keywords:

Immunosuppression  
Amino acid metabolism  
Enzyme  
IFN- $\gamma$   
CD40L

### ABSTRACT

The immune system must be under tight control to avoid undesired responses. The enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) can exert necessary regulating effects by catabolizing tryptophan, leading to the suppression of immune responses in different settings, such as pregnancy and tumor growth. IDO's immuno-suppressive actions are mediated by tryptophan starvation and the accumulation of toxic tryptophan metabolites, resulting in T cell anergy, inhibition of clonal expansion or apoptosis. IDO activity in human macrophages and dendritic cells has been observed after interaction with T lymphocytes, and is triggered by interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) as well as CD40-ligand (CD40L). However, it is unclear whether IDO activity is present in B lymphocytes, which have been identified as having suppressive properties involved in anti-tumor immunity inhibition. In this study, we investigated whether IDO expression is induced in human B cells after exposure to T lymphocyte stimuli and TLR ligands. We report IDO1 and IDO2 mRNA up-regulation by exogenous stimulation with CD40L and IFN- $\gamma$ . IDO is also upregulated by imiquimod, a TLR 7/8 agonist. In addition, IDO protein is detected after treatment with these exogenous factors or with supernatant from activated CD4<sup>+</sup> T cells. We, however, report weak or absent enzymatic activity from these IDO-expressing cells, as assessed by tryptophan consumption. We conclude that IDO may not be a counter-regulatory mechanism utilized by B lymphocytes to down-regulate immune responses, although its expression is inducible.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Counter-regulatory mechanisms are necessary in the immune system to avoid inappropriate or excessive responses (reviewed in Kyewski and Klein, 2006) and promote contraction phases.

**Abbreviations:** 1MT, 1-methyl-tryptophan; Ab, antibody; APC, antigen-presenting cells; CD40L, CD40-ligand; CTLA4-Ig, cytotoxic T lymphocyte antigen-4-immunoglobulin; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; DC, dendritic cells; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; HBSS, Hank's balanced salt solution; HPLC, high-performance liquid chromatography; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; IFN- $\gamma$ , interferon-gamma; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; mRNA, messenger ribonucleic acid; MHC, major histocompatibility complex; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate buffered saline; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; TCR, T cell receptor; Tregs, regulatory T lymphocytes.

By limiting the intensity and extent of immune responses, these inhibitory mechanisms prevent further damage to the host. Such functions can be fulfilled by the tryptophan-catabolizing enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). Degradation of the essential amino acid tryptophan by IDO, depleting tryptophan from the intracellular pool or local microenvironment, was first described as a defense mechanism against intracellular pathogens (Pfefferkorn, 1984; Taylor and Feng, 1991). Its role was thereafter extended to fetal protection against maternal T cells, when Munn et al. (1998) demonstrated that administration of the IDO inhibitor 1-methyl-tryptophan (1MT) to pregnant mice led to fetal rejection. This pivotal study ascribed a new immunosuppressive function to the enzyme, and prompted an intense search for its contribution in tumor escape (Friberg et al., 2002; Uyttenhove et al., 2003). In fact, enzymatically active IDO and the recently identified IDO2 proteins (Ball et al., 2007; Metz et al., 2007) lead to tryptophan starvation and downstream metabolite accumulation. This culminates in multiple effects on immune cells, such as T lymphocyte proliferative arrest (Munn et al., 1999; Frumento et al., 2002; Terness et al., 2002), anergy (Munn et al., 2004a), apoptosis (Fallarino et al.,

2002a), conversion of naive CD4<sup>+</sup> T cells to regulatory T cells (Tregs) (Fallarino et al., 2006), and activation of mature CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs (Sharma et al., 2007).

Active IDO is induced in human macrophages and monocyte-derived dendritic cells (DC) upon interaction with T lymphocytes, and this induction is dependent not only on interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) production, but also on CD40-ligand (CD40L) up-regulation on these T cells (Munn et al., 1999; Hwu et al., 2000). Moreover, a subtype of IDO<sup>+</sup> plasmacytoid DC, co-expressing a B-lineage marker, can be found in tumor-draining lymph nodes of tumor-bearing mice or patients, creating a suppressive environment and culminating in a profound anergic state of anti-tumor T lymphocytes (Munn et al., 2004a).

In the course of an effective humoral response, B lymphocytes interact closely with T lymphocytes, and signals are exchanged through cell-cell contacts involving major histocompatibility complex/T cell receptor (MHC/TCR) and CD40/CD40L interactions, and cytokines such as IFN- $\gamma$  are released. Based on what is known about IDO induction in macrophages and DC, this counter-regulatory mechanism also possibly arises in B lymphocytes after T lymphocyte encounter. B cell-deficient mice have been shown to mount a more effective anti-tumor response in comparison to wild type mice, suggesting that B cells hamper anti-tumor immunity (Inoue et al., 2006; Shah et al., 2005). Such suppressive activity has been associated with interleukin (IL)-10 production by B cells after CD40 ligation, leading to decreased IFN- $\gamma$  production by T lymphocytes, at least *in vitro* (Inoue et al., 2006). However, it is not clear whether B lymphocyte inhibitory effects depend on the same mechanism of action, to prevent anti-tumor responses effectiveness *in vivo* (Rosenblatt et al., 2007). Some other mechanism orchestrated by B cells might participate in the inhibition of anti-tumor responses *in vivo*.

A recent study demonstrated the existence of a murine PDCA-expressing B lymphocyte subpopulation, in which IFN- $\alpha$  and IDO1/IDO2 are induced at the mRNA level upon stimulation with cytotoxic T lymphocyte antigen-4-immunoglobulin (CTLA4-Ig). However, neither protein expression nor enzymatic activity was evaluated (Vinay et al., 2010). Also, a B-lymphoid population with DC attributes (CD19<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>) was able to induce Treg activation by IDO expression upon CpG oligonucleotide stimulation (Johnson et al., 2010). In the present work, we investigated whether IDO expression could be up-regulated in human B lymphocytes in response to T cell signals. In addition, we sought to determine whether this induction would beget a functional enzyme capable of metabolizing tryptophan. We found that IDO was produced by human B cells at the mRNA and protein levels after stimulation with IFN- $\gamma$ , CD40L and imiquimod (TLR 7/8 ligand), but in an inactive form, indicated by the lack of tryptophan consumption and kynurenine accumulation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Healthy donors and cells

Heparinized blood obtained by leukapheresis from healthy donors was centrifuged on lymphocyte separation medium (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada) to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Donors were recruited by the Division of Hematology and Immunodeficiency Service of Royal Victoria Hospital. The study was approved by the local ethics committee, and informed consent was obtained from each donor.

All cell lines were procured from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). U937 and KTCL cells were cultured respectively in RPMI 1640 and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM

L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and 10  $\mu$ g/ml gentamicin (all from Wisent).

B lymphocytes were purified from PBMC by negative selection, with an EasySep human B cell enrichment kit (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada), according to the manufacturer's instructions. Briefly, PBMC were incubated with 10  $\mu$ l/10<sup>7</sup> total cells of antibody cocktail containing a combination of monoclonal antibodies (Abs) against human CD2, CD3, CD14, CD16, CD36, CD43, CD56 and glycophorin A. Magnetic nanoparticles were added at 10  $\mu$ l/10<sup>7</sup> total cells for 10 min at room temperature, before the test tube was placed into the magnet for 5 min. Isolated B cell purity reached >95%.

Monocyte-derived DC were generated from PBMC of healthy donors (Leclerc et al., 2007), followed by 24 h of stimulation with 500 ng/ml soluble trimeric CD40L (Immunex Corporation, Seattle, WA) and/or 10<sup>3</sup> U/ml IFN- $\gamma$  (Pierce Endogen, Rockford, IL) and/or 5  $\mu$ g/ml lipopolysaccharide (LPS, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO).

### 2.2. Reagents

L-Tryptophan and kynurenine were prepared as a 20-mM stock solution in water. These reagents were all obtained from Sigma–Aldrich.

B lymphocytes were stimulated with 500 ng/ml soluble trimeric CD40L (Immunex Corporation), 250 U/ml recombinant human IL-4 (Peprotech, Rocky Hill, NJ), 10<sup>3</sup> U/ml IFN- $\gamma$ , 5  $\mu$ g/ml LPS, 5  $\mu$ g/ml Poly I:C, 4  $\mu$ g/ml CpG ODN2006 or 5  $\mu$ g/ml imiquimod (all from Invivogen, San Diego, CA) in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 7.5% heat-inactivated human serum (from normal donors), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 10  $\mu$ g/ml gentamicin.

### 2.3. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA from cell lines, lymphocytes and DC was extracted with RNeasy<sup>TM</sup> mini or micro kits (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. For classical and quantitative RT-PCR analyses, cDNA was first synthesized from mRNA (500 ng) with oligo-dt and random hexamers (both from Applied Biosystems, Carlsbad, CA), using an Omniscript reverse transcriptase kit (Qiagen). The sequences of PCR primers spanning distinct exons were: IDO (5': CGCTGTTGAAATAGCTTCTTGC; 3': CTC-CCAGAACCTTCATACACC, amplicon 167-bp), IDO2 (5': CGTCATAG-CAAGGAAAGTGCTGAC; 3': CCCTCAGGGAAGGTGCTGAG, amplicon 106-bp), and 18S ribosomal subunit (5': ATCAACTTTCGATG-GTAGTCCG; 3': TCCTTGGATGTGGTAGCCG, amplicon 111-bp), as described previously (Morse et al., 2005). Classical RT-PCR amplification was undertaken with HotStartTaq DNA polymerase (Qiagen). The cycling conditions were 15 min at 95 °C, 22 (18S), 30 (IDO1), or 32 (IDO2) cycles of 45 s at 94 °C, 45 s at 55 °C, 1 min at 72 °C, with a final extension of 10 min at 72 °C, in a T3 Thermocycler<sup>TM</sup> (Biometra, Goettingen, Germany). Amplification was detected by ethidium bromide staining after electrophoresis migration in agarose gel (1.5 or 2%, with equipment from Bio-Rad, Hercules, CA).

Quantitative real-time RT-PCR amplifications were performed with a Rotorgene 3000 thermal cycler (Corbett Life Science, Sydney, Australia) and revealed with Quantitect<sup>TM</sup> SYBR Green PCR (Qiagen). Real-time quantitative RT-PCR was carried out in reactions containing 0.5  $\mu$ M of each IDO, IDO2 or 18S primers, 10  $\mu$ l of 2 $\times$  SYBR Green mix (Qiagen), 4  $\mu$ l of cDNA (1/20 dilution), and water. The cycling conditions were 10 min at 95 °C, then 35 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 60 °C, 30 s at 72 °C for 18S, and 40 cycles of 30 s at 94 °C, 60 s at 55 °C, 30 s at 72 °C for IDO, and a final melting curve from 72 to 95 °C. Fluorescence was measured at the end of each extension step. The gain was adjusted automatically on the first tube at

the end of the first cycle (channel FAM/Sybr, 470-nm source, 510-nm detector, readings between 2FI and 5FI). The absence of primer dimers and the specificity of the PCR products were documented by melting curve analysis and electrophoresis migration in 2% agarose gel stained with ethidium bromide. IDO expression was quantified relative to the housekeeping gene 18S, according to Pfaffl's method (Pfaffl, 2001).

#### 2.4. Western blotting

Protein extracts were prepared from the above-mentioned pelleted cells, measured, resolved by 10% SDS-PAGE, and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immun-Blot™, Bio-Rad) (Turcotte et al., 2007). The membranes were incubated with sheep polyclonal anti-human IDO antibody 1/100 (Hycult Biotechnology, Uden, The Netherlands) or mouse  $\beta$ -actin-specific antibody (1/10,000, Chemicon, Temecula, CA) for 1 h, washed and re-incubated for 1 h with secondary peroxidase-conjugated Abs (1:20,000 rabbit anti-sheep or 1:40,000 goat anti-mouse, both from Chemicon), before detection (Turcotte et al., 2007).

#### 2.5. Immunofluorescence microscopy

B lymphocytes were isolated from healthy donor PBMC, as outlined above. IDO expression was induced in B cells and control U937 cells respectively by IFN- $\gamma$ /CD40L and IFN- $\gamma$ /LPS stimulation. After 24 h, the cells were harvested, washed and re-suspended in RPMI/50% FBS for cytopspin. For each condition,  $5 \times 10^5$  cells were cytopspun on glass slides for 4 min at  $27 \times g$  for B cells, or at  $40 \times g$  for control U937 cells, in a Statspin Cytofuge 2 (IRIS International Inc., Chatsworth, CA). The cells were then fixed and permeabilized in methanol/50% acetone, dried, and rehydrated in phosphate buffered saline (PBS). Slides were blocked in PBS/5% FBS for 1 h. Dual-color immunofluorescence stainings were performed in a humidified chamber by sequential 1-h incubations with each Ab. For IDO staining, a polyclonal sheep anti-human IDO (1/200, Hycult Biotechnology) primary Ab was followed by a rabbit anti-sheep Ab coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC, 1/500, Millipore, Temecula, CA). CD20 expression was revealed by a mouse anti-human CD20 primary Ab (1/200, Dako, Carpinteria, CA) and Rhodamine-conjugated donkey anti-mouse Ab (1/500, Bio/Can Scientific, Mississauga, Ontario, Canada). The slides were washed with PBS after each staining, rinsed in distilled water, dried and mounted with ProLong® Gold antifade reagent with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probes, Invitrogen), allowing nuclei visualization, followed by overnight drying at 4°C. They were observed under a Nikon Eclipse E600 fluorescence microscope equipped with a CoolSNAP HQ² camera (Photometrics, Tucson, AZ), using a 40 $\times$  objective. Images were processed by NIS Element AR 3.0 software (Nikon Instruments, Inc., Melville, NY).

#### 2.6. IDO activity assay

To assess IDO activity, B lymphocytes were plated at  $5 \times 10^5$  cells/well in 96-well plates and stimulated with 1000 U/ml IFN- $\gamma$  and 500 ng/ml CD40L or TLR ligands as above described. Approximately 24 h after activation, B cells and control cells were washed and re-suspended in Hank's balanced salt solution (HBSS) containing 50  $\mu$ M L-tryptophan. They were then incubated for an additional 4 h, followed by harvesting of the supernatant and removal of cell debris by centrifugation. Tryptophan and kynurenine quantification was undertaken by high-performance liquid chromatography (HPLC) on a Hewlett Packard HP1050 equipped with a DAD detector (Agilent), and analyzed with ChemStation software. For each quantification, 25  $\mu$ l of sample was injected into an analytic Vydac 218TP C18 column and eluted with KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

buffer (0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.15 mM EDTA, pH 5.0) containing 5% methanol HPLC grade at a flow rate of 1.0 ml/min. The spectrophotometer was set at 254 nm to measure both kynurenine and tryptophan elution. Retention time was determined previously with standard solutions of kynurenine (6.6 min) and tryptophan (11.2 min). IDO activity was expressed as the micromolar concentration of kynurenine in samples, converted from tryptophan by IDO.

### 3. Results

#### 3.1. IDO mRNA expression in B lymphocytes in response to exogenous cytokines

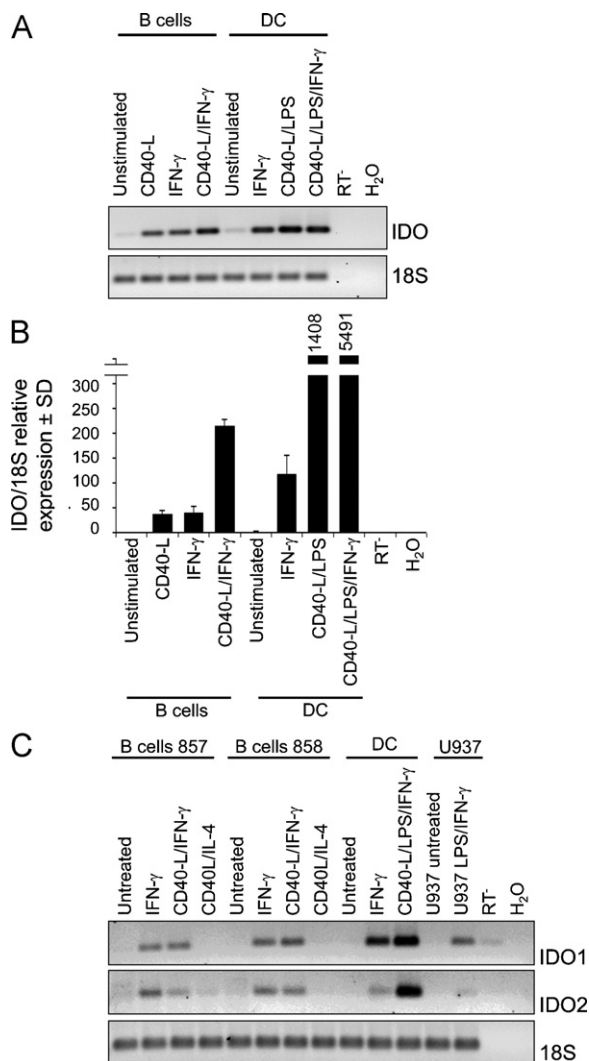
To determine whether stimuli from activated T cells could up-regulate IDO expression in B lymphocytes, we treated isolated human B cells with either soluble trimeric CD40L or IFN- $\gamma$  or both. We evaluated IDO expression in B lymphocytes from multiple donors, and observed that single or combined treatment induced IDO, as detected by standard RT-PCR (Fig. 1A). Quantitative PCR allowed us to determine that IDO mRNA was expressed at comparable levels in CD40L- and IFN- $\gamma$ -activated B cells (Fig. 1B). Combination of both factors increased the expression level by more than 5-fold in comparison to single treatment.

An IDO-like protein termed IDO2 was recently identified as a tryptophan-catabolizing enzyme, but its biological role is still not well defined. We thus investigated whether IDO2 was also induced in response to the previous stimuli. IDO2 mRNA expression by activated B lymphocytes was evaluated by standard RT-PCR, and compared to IDO1 (Fig. 1C). IDO2 was found in control DC stimulated with CD40L/LPS/IFN- $\gamma$ . However, it was barely detectable in IFN- $\gamma$ -treated DC and LPS/IFN- $\gamma$ -treated U937 cells in contrast to IDO1 expression. In B lymphocytes, IDO2 mRNA was induced by the same stimulations as for IDO1.

#### 3.2. Up-regulation of IDO protein expression in B lymphocytes

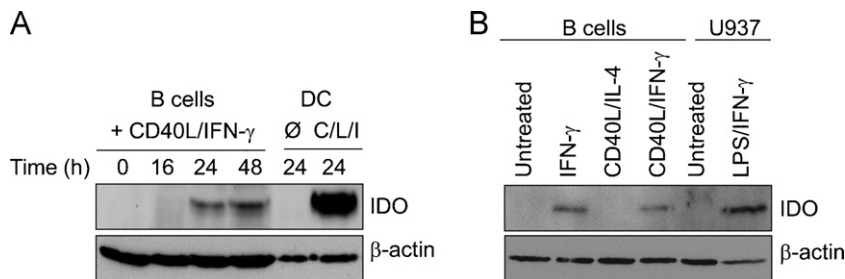
We then sought to determine whether IDO protein expression in B cells was consistent with the transcriptional induction observed. Considering that the strongest IDO mRNA expression was seen after stimulation with both CD40L and IFN- $\gamma$ , this combination was adopted to activate isolated B lymphocytes under different incubation times. Western blotting revealed that IDO protein was expressed in human B lymphocytes in response to CD40L and IFN- $\gamma$ . Maximal protein expression was apparent between 24 and 48 h, depending on the donor (Fig. 2A). This time point was thus retained to further investigate IDO protein induction by other stimuli. Fig. 2B illustrates that IDO protein was up-regulated by IFN- $\gamma$  alone or in combination with CD40L, whereas CD40L with IL-4 had no inducing effect on IDO expression. To study IDO expression in B cells in a more physiological context, supernatants from anti-CD3-pre-activated or isotype-matched control-stimulated CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were added to B lymphocytes for 24 h. IDO protein was detected on exposure to CD4<sup>+</sup>-activated T cell supernatant, whereas no expression was induced by control supernatant (Supplemental Fig. 1). However, IDO protein induction was weaker in response to this activated T cell supernatant compared to stimulation with exogenous CD40L/IFN- $\gamma$ , indicating that soluble factors produced by activated T cells were not optimal, and the signal provided by CD40L must be important.

To simulate IDO induction during an infection, we added stimulation with TLR ligands to B lymphocytes with or without the CD40L/IFN- $\gamma$ . LPS, Poly I:C, oligonucleotides CpG and imiquimod for TLR4, 3, 9 and 7/8 activation were performed respectively. LPS and Poly I:C had no effect on neither RNA or protein expression of IDO

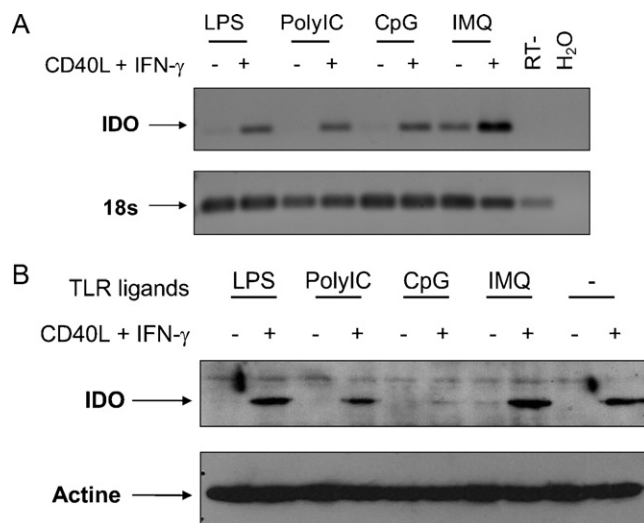


**Fig. 1.** IDO mRNA induction in human B lymphocytes by T cell stimuli. B cells were isolated from healthy donor PBMC and treated with either IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) or CD40L (500 ng/ml), alone or in combination, for 24 h. RNA was extracted, cDNA was prepared, and IDO and 18S gene expression was analyzed by (A) standard or (B) quantitative PCR. (B) Quantification was relative to untreated control B lymphocytes, and IDO expression was normalized with 18S RNA, according to Pfaffl's method (Pfaffl, 2001). (C) IDO1 and IDO2 expression was assessed by standard PCR for 2 healthy donors.

alone or in combination with CD40L and IFN- $\gamma$  (Fig. 3). TLR9 stimulation reduced the protein expression in CD40L/IFN- $\gamma$  activated human B lymphocytes, without affecting the mRNA level. Finally, IDO mRNA and protein expression were observed with imiquimod stimulation alone and in combination with CD40L and IFN- $\gamma$ .



**Fig. 2.** IDO protein expression in B lymphocytes. (A) Isolated B lymphocytes and monocyte-derived DC were treated with CD40L + IFN- $\gamma$  for the indicated incubation times or (B) either left untreated or treated with IFN- $\gamma$  alone, IFN- $\gamma$  + CD40L or IL-4 + CD40L, for 24 h. U937 cells served as controls. (A and B) Cells were harvested, proteins were extracted, and IDO and  $\beta$ -actin expression levels were measured by Western blotting.

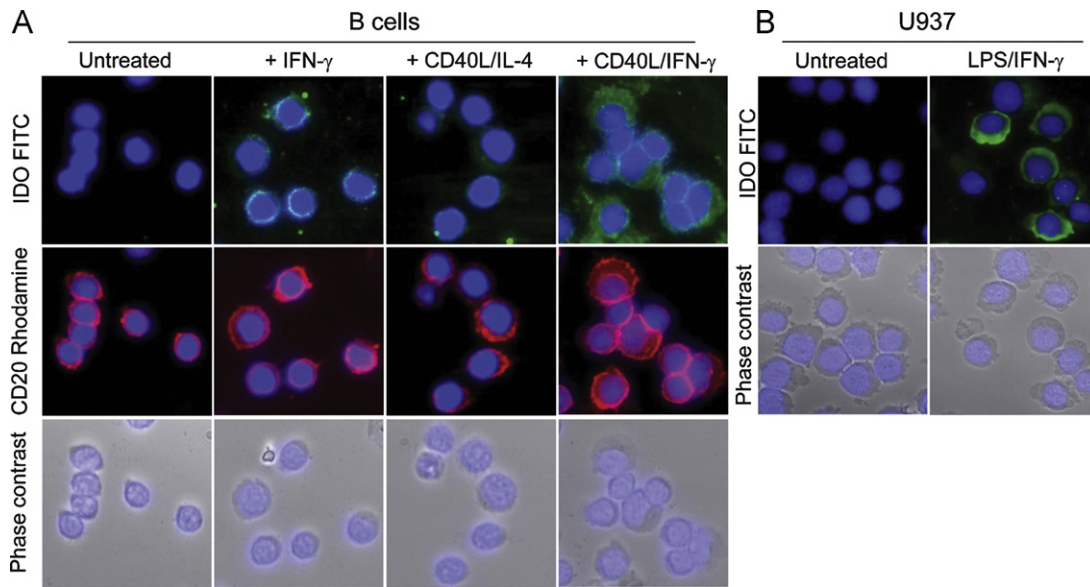


**Fig. 3.** IDO mRNA transcription and protein expression in human B lymphocytes exposed to TLR ligands. Isolated B lymphocytes were treated with TLR ligands with or without CD40L and IFN- $\gamma$  for 24 h. (A) RNA was extracted, cDNA was prepared and IDO gene and 18S RNA expression was analyzed by standard PCR. (B) Proteins were extracted and IDO and  $\beta$ -actin expression levels were measured by Western blotting.

To exclude the possibility that detected IDO resulted from contaminating cells after B lymphocyte magnetic selection, we proceeded to double immunofluorescence staining to confirm that IDO originated from B cells. Intracellular IDO and the surface marker CD20, specific to B lymphocytes, were stained with primary Abs and revealed with fluorescence-conjugated secondary Abs. As depicted in Fig. 4A (upper left panel), no IDO signal was apparent in untreated CD20<sup>+</sup> B cells, whereas weak expression was observed in IFN- $\gamma$  and CD40L + IL-4-stimulated B lymphocytes (Fig. 4, upper middle panels). However, elevated IDO staining was detected in CD20-expressing cells treated with a combination of CD40L and IFN- $\gamma$  (Fig. 4A, right panel). These findings reflect the results obtained by quantitative PCR, and confirm that IDO expression, measured by Western blotting, did not originate from non-B cells.

### 3.3. IDO produced by B cells is functionally inactive

To examine whether the IDO produced by B lymphocytes was functionally active, we assessed tryptophan consumption and kynurenine production by untreated or CD40L/IFN- $\gamma$ -stimulated B cells. After 4 h in tryptophan-containing HBSS medium, IFN- $\gamma$  + LPS-treated U937 cells, serving as positive control, degraded around 40% of the initial tryptophan (Fig. 5A). This observation was supported by a corresponding increase in kynurenine concentration. However, no tryptophan disappearance or kynurenine production



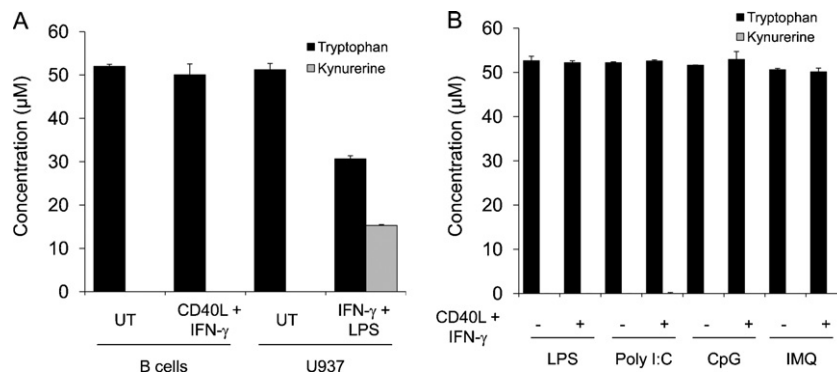
**Fig. 4.** IDO and CD20 co-expression. (A) Healthy donor B lymphocytes were untreated or stimulated with IFN- $\gamma$ , IL-4 + CD40L, or IFN- $\gamma$  + CD40L, for 24 h. Dual-color immunofluorescence staining was performed with primary Abs specific to IDO and CD20, and with secondary Abs coupled respectively with FITC and Rhodamine. Nuclei were stained with DAPI. The results obtained with 1 representative donor are illustrated. (B) U937 cells untreated or treated with LPS/IFN- $\gamma$  were considered as positive controls for IDO staining.

was detected in untreated or CD40L/IFN- $\gamma$ -treated B lymphocyte supernatants (Fig. 5A). Finally, B lymphocytes stimulated with TLR ligands with or without CD40L/IFN- $\gamma$  stimulation had no effect on tryptophan consumption (Fig. 5B). This absence of tryptophan degradation indicates that IDO expression by stimulated B lymphocytes is not functionally active, and may have no biological effect on the immune system.

**4. Discussion**

Cellular cross-talk between B and T lymphocytes is central to humoral responses. After antigen recognition by B cell receptors, followed by processing and presentation of this antigen, B lymphocytes must receive signals from CD4<sup>+</sup> helper T cells specific to the same antigen to start antibody production. These include contact-mediated signals through MHC/TCR, B7/CD28 and CD40/CD40L, but also cytokines secreted by CD4<sup>+</sup> T cells (reviewed in Mills and Cambier, 2003). It has been known for over a decade that antigen-presenting cells (APC), such as macrophages and DC, can produce IDO, after interaction with T cells, and mediate inhibition of T cell

proliferation. Despite the fact that human CD40-activated B cells have previously been shown to be effective APC (Lapointe et al., 2003), no such IDO activity has been investigated in these cells. Kai et al. (2004) examined IDO gene expression in different cellular subsets from human PBMC. Though IDO mRNA has been found in isolated B lymphocytes, the poor purity of this cellular population rendered these data questionable. In addition, neither protein expression nor tryptophan degradation was evaluated. A recent report demonstrated that upon stimulation with CTLA4-Ig, IDO1 and IDO2 mRNA levels increased in murine PDCA-expressing B lymphocytes. However, it is still unknown whether this cellular subset expresses IDO at the protein level and in a functional state (Vinay et al., 2010). CTLA4-Ig has been previously demonstrated to induce IDO expression in DC when high concentration of IFN- $\gamma$  is present in the microenvironment (Munn et al., 2004b). However the IFN- $\gamma$  is not required in CD8<sup>-</sup> DC compared to CD8<sup>+</sup> DC (Orabona et al., 2006). This IDO induction by CTLA4-Ig can occur only when DC were activated by LPS, but not by CD40L ligation, which is preventing tolerogenic properties onset in human dendritic cells (Vacca et al., 2005). In the present study, we noted IDO1 and IDO2 mRNA



**Fig. 5.** Functional assessment of IDO produced by B cells. (A) B lymphocytes were isolated from healthy donor PBMC and were either untreated or treated with IFN- $\gamma$  + CD40L for 24 h to induce IDO expression. The U937 cell line used as control was treated with IFN- $\gamma$  and LPS for 24 h to stimulate IDO expression. The cells were incubated for 4 h in serum-free HBSS medium, and 50  $\mu$ M L-tryptophan. Levels of tryptophan and its degradation product kynurenine were quantified by HPLC. One representative experiment of two is shown. (B) B lymphocytes were stimulated by 4 different TLR ligands with or without CD40L + IFN- $\gamma$  for 24 h. The same experiment as in A was performed. One representative experiment is shown.

up-regulation in human B lymphocytes in response to stimuli from activated T lymphocytes. While this up-regulation translated into protein expression, tryptophan was not degraded by these IDO-expressing cells.

To investigate whether IDO could be a counter-regulatory mechanism deployed by B lymphocytes, we sought to mimic possible interaction with activated T cells. We thus tested the previously identified IDO inducers CD40L and IFN- $\gamma$  (Munn et al., 1999). However, by combining CD40L with IL-4, IDO expression could not be detected from human B lymphocytes. This is not surprising, considering the reported effects of the Th2 cytokine IL-4 on IDO expression in other cell types. It has indeed been demonstrated that IL-4 has an inhibitory impact on IDO expression and activity in human monocytes (Musso et al., 1994). Furthermore, CpG oligodeoxynucleotides are known to elicit IDO expression in DC (Mellor et al., 2005), and, when administered systemically as adjuvant therapy in a murine model, they induce IDO expression in the spleen, leading to T lymphocyte suppression (Wingender et al., 2006). TLR9, which recognizes CpG motifs, is constitutively expressed by B lymphocytes. In our study, we stimulated enriched human B lymphocytes with TLR ligands; CpG alone cannot stimulate IDO expression, but surprisingly seems to down-regulate the protein expression when combined to CD40L and IFN- $\gamma$ . However, imiquimod a TLR7/8 agonist was able to induce IDO expression in human B lymphocytes, and amplify CD40L/IFN- $\gamma$  response at mRNA and protein level. This IDO activation by imiquimod can be an explanation of the immune response down-regulation observed in sheep PBMC and B cells when TLR7/8 agonists are added (Booth et al., 2010).

In this study, we report that IDO, expressed by B lymphocytes in response to different T cell stimuli or TLR engagement, does not translate into tryptophan degradation. In mice, the situation has been encountered in other cell types, such as DC. IDO expression has been observed in 2 different DC subsets, namely CD8 $\alpha^+$  and CD8 $\alpha^-$ . However, no kynurenine accumulation had been quantified from the latter subset, indicating an inactive state of IDO in the CD8 $\alpha^-$  DC subset (Fallarino et al., 2002b). More recently, IDO1 and IDO2 expression was detected in monocyte-derived DC, but enzymatic activity was only exerted by IDO1, as demonstrated by siRNA and the use of 2 different 1MT isomers specifically inhibiting IDO1 or IDO2 (Löb et al., 2008). These investigations highlight the fact that when expressed, IDO is not necessarily in an active form. This finding supports our results showing that neither of the 2 IDO genes was expressed in a functional state in human B cells. More mechanistic experiments have to be conducted to determine why the IDO expressed in human B cells is inactive or if another mechanism inhibits IDO enzymatic activity.

In conclusion, despite the observation that the tryptophan-catabolizing enzyme IDO is induced by IFN- $\gamma$  and CD40L in human B lymphocytes, it may not have a biological impact in limiting immune responses. Further studies are needed to determine whether other factors could prompt functional IDO in B cells.

### Conflicts of interest

The authors have no financial conflicts of interest.

### Acknowledgments

This work was supported by operating grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council [grant number 340955-2010]; the Canadian Institutes of Health Research [grant number MOP-89727]; and by a fellowship from Fonds de la recherche en santé du Québec to [RL].

Healthy donor samples were provided by Dr. Jean-Pierre Routy and Dr. Mohamed-Rachid Boulassel from the Division of

Hematology and Immunodeficiency Service of Royal Victoria Hospital. The editorial assistance of Ovid Da Silva and logistical support from Bureau d'aide à la recherche (Research Support Office), CRCHUM, is acknowledged.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.molimm.2011.08.017.

### References

- Ball, H.J., Sanchez-Perez, A., Weiser, S., Austin, C.J., Astelbauer, F., Miu, J., McQuillan, J.A., Stocker, R., Jermini, L.S., Hunt, N.H., 2007. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene* 396, 203–213.
- Booth, J.S., Buza, J.J., Potter, A., Babiuk, L.A., Mutwiri, G.K., 2010. Co-stimulation with TLR7/8 and TLR9 agonists induce down-regulation of innate immune responses in sheep blood mononuclear and B cells. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 572–578.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M.C., Puccetti, P., 2002a. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* 9, 1069–1077.
- Fallarino, F., Vacca, C., Orabona, C., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Marshall, B., Keskin, D.B., Mellor, A.L., Fioretti, M.C., Grohmann, U., Puccetti, P., 2002. Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 $\alpha^+$  dendritic cells. *Int. Immunol.* 14, 65–68.
- Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B.C., Cavener, D.R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Volpi, C., Santamaria, P., Fioretti, M.C., Puccetti, P., 2006. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J. Immunol.* 176, 6752–6761.
- Friberg, M., Jennings, R., Alsarraj, M., Dessureault, S., Cantor, A., Extermann, M., Mellor, A.L., Munn, D.H., Antonia, S.J., 2002. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int. J. Cancer* 101, 151–155.
- Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., Ferrara, G.B., 2002. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Exp. Med.* 196, 459–468.
- Hwu, P., Du, M.X., Lapointe, R., Do, M., Taylor, M.W., Young, H.A., 2000. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J. Immunol.* 164, 3596–3599.
- Inoue, S., Leitner, W.W., Golding, B., Scott, D., 2006. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer Res.* 66, 7741–7747.
- Johnson III, B.A., Kahler, D.J., Baban, B., Chandler, P.R., Kang, B., Shimoda, M., Koni, P.A., Pihkala, J., Vilagos, B., Busslinger, M., Munn, D.H., Mellor, A.L., 2010. B-lymphoid cells with attributes of dendritic cells regulate T cells via indoleamine 2,3-dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 10644–10648.
- Kai, S., Goto, S., Tahara, K., Sasaki, A., Tone, S., Kitano, S., 2004. Indoleamine 2,3-dioxygenase is necessary for cytolytic activity of natural killer cells. *Scand. J. Immunol.* 59, 177–182.
- Kyewski, B., Klein, L., 2006. A central role for central tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 571–606.
- Lapointe, R., Bellemare-Pelletier, A., Housseau, F., Thibodeau, J., Hwu, P., 2003. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res.* 63, 2836–2843.
- Leclerc, D., Beauseigle, D., Denis, J., Morin, H., Pare, C., Lamarre, A., Lapointe, R., 2007. Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells. *J. Virol.* 81, 1319–1326.
- Löb, S., Konigsrainer, A., Schafer, R., Rammensee, H.G., Opelz, G., Terness, P., 2008. Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan abrogates the IDO activity of human dendritic cells. *Blood* 111, 2152–2154.
- Mellor, A.L., Baban, B., Chandler, P.R., Manlapat, A., Kahler, D.J., Munn, D.H., 2005. Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19 $^+$  dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling. *J. Immunol.* 175, 5601–5605.
- Metz, R., DuHadaway, J.B., Kamasani, U., Laury-Kleintop, L., Muller, A.J., Prendergast, G.C., 2007. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Res.* 67, 7082–7087.
- Mills, D.M., Cambier, J.C., 2003. B lymphocyte activation during cognate interactions with CD4 $^+$  T lymphocytes: molecular dynamics and immunologic consequences. *Semin. Immunol.* 15, 325–329.
- Morse, D.L., Carroll, D., Weberg, L., Borgstrom, M.C., Ranger-Moore, J., Gillies, R.J., 2005. Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 342, 69–77.
- Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C., Mellor, A.L., 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281, 1191–1193.

- Munn, D.H., Shafizadeh, E., Attwood, J.T., Bondarev, I., Pashine, A., Mellor, A.L., 1999. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* 189, 1363–1372.
- Munn, D.H., Sharma, M.D., Hou, D., Baban, B., Lee, J.R., Antonia, S.J., Messina, J.L., Chandler, P., Koni, P.A., Mellor, A.L., 2004a. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J. Clin. Invest.* 114, 280–290.
- Munn, D.H., Sharma, M.D., Mellor, A.L., 2004b. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4<sup>+</sup> T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J. Immunol.* 172, 4100–4110.
- Musso, T., Gusella, G.L., Brooks, A., Longo, D.L., Varesio, L., 1994. Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes. *Blood* 83, 1408–1411.
- Orabona, C., Puccetti, P., Vacca, C., Bicchato, S., Luchini, A., Fallarino, F., Bianchi, R., Velardi, E., Perruccio, K., Velardi, A., Bronte, V., Fioretti, M.C., Grohmann, U., 2006. Toward the identification of a tolerogenic signature in IDO-competent dendritic cells. *Blood* 107, 2846–2854.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2002–2007.
- Pfefferkorn, E.R., 1984. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 908–912.
- Rosenblatt, J., Zhang, Y.D., Tadmor, T., 2007. Inhibition of antitumor immunity by B cells. *Cancer Res.* 67, 5058–5059.
- Shah, S., Divekar, A.A., Hilchey, S.P., Cho, H.M., Newman, C.L., Shin, S.U., Nechustan, H., Challita-Eid, P.M., Segal, B.M., Yi, K.H., Rosenblatt, J.D., 2005. Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. *Int. J. Cancer* 117, 574–586.
- Sharma, M.D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D.Y., Singh, N., Yagita, H., Azuma, M., Blazar, B.R., Mellor, A.L., Munn, D.H., 2007. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 117, 2570–2582.
- Taylor, M.W., Feng, G.S., 1991. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J.* 5, 2516–2522.
- Terness, P., Bauer, T.M., Rose, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., Opelz, G., 2002. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* 196, 447–457.
- Turcotte, S., Forget, M.A., Beauseigle, D., Nassif, E., Lapointe, R., 2007. Prostate-derived Ets transcription factor overexpression is associated with nodal metastasis and hormone receptor positivity in invasive breast cancer. *Neoplasia* 9, 788–796.
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., 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.
- Vacca, C., Fallarino, F., Perruccio, K., Orabona, C., Bianchi, R., Gizzi, S., Velardi, A., Fioretti, M.C., Puccetti, P., Grohmann, U., 2005. CD40 ligation prevents onset of tolerogenic properties in human dendritic cells treated with CTLA-4-Ig. *Microbes Infect.* 7, 1040–1048.
- Vinay, D.S., Kim, C.H., Chang, K.H., Kwon, B.S., 2010. PDCA expression by B lymphocytes reveals important functional attributes. *J. Immunol.* 184, 807–815.
- Wingender, G., Garbi, N., Schumak, B., Jungerkes, F., Endl, E., von, B.D., Steitz, J., Striegler, J., Moldenhauer, G., Tuting, T., Heit, A., Huster, K.M., Takikawa, O., Akira, S., Busch, D.H., Wagner, H., Hammerling, G.J., Knolle, P.A., Limmer, A., 2006. Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO. *Eur. J. Immunol.* 36, 12–20.

## **Annexe III : Curriculum vitae scientifique**



## ***Formation académique***

---

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>Sept 2009</b>          | <b>Ph.D. Sciences biomédicales</b><br>Université de Montréal, Montréal, QC, Canada  |
| <b>Jan 2008-Août 2009</b> | <b>M.Sc. Sciences biomédicales</b><br>Université de Montréal, Montréal, QC, Canada. |
| <b>2005-2007</b>          | <b>B.Sc. Sciences biomédicales</b><br>Université de Montréal, Montréal, QC, Canada. |

## ***Publications***

---

**1- Laïla-Aïcha Hanafi**, Angélique Bellemare-Pelletier, Katia Hamelin, Marie-Josée Hébert, Étienne Gagnon, Denis Leclerc and Réjean Lapointe. (Soumis 2014) *MHC class I antigen cross-presentation mediated by PapMV nanoparticles in human antigen presenting cells is dependent on autophagy*, *Autophagy*.

**2- Laïla-Aïcha Hanafi**, Dominique Gauchat, Jessica Godin-Ethier, David Possamaï, Jean-Baptiste Duvignaud, Denis Leclerc, Nathalie Grandvaux and Réjean Lapointe. (2013) *Fludarabine down-regulates indoleamine 2,3-dioxygenase in tumors via a proteasome-mediated degradation mechanism*, *Plos One*, **9**(6) : e99211

**3- Nicolas Pallet, Isabelle Sirois, Christina Bell, Laïla-Aïcha Hanafi, Katia Hamelin, Mélanie Dieudé, Christiane Rondeau, Pierre Thibault, Michel Desjardins and Marie-Josée Hébert.** (2013) *A comprehensive characterization of autophagic membrane vesicles released by apoptotic human endothelial cells*, *Proteomics*, **13**(7), pp.1108-20.

**4- Laïla-Aïcha Hanafi**, Jessica Godin-Ethier, Ciriaco A. Piccirillo and Réjean Lapointe. (2011) *Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancer: clinical and immunological perspectives*, *Clinical Cancer Research* **17**(22), pp.6985-6991.

**5- Jessica Godin-Ethier, Laïla-Aïcha Hanafi, Jean-Baptiste Duvignaud et al.** (2011) *IDO expression by human B lymphocytes in response to T lymphocyte stimuli and TLR ligation is biologically inactive*. *Molecular Immunology* **49**(1-2), pp.253-259.

**6- Laïla-Aïcha Hanafi, Marilène Bolduc, Marie-Ève Laliberté-Gagné et al.** (2010) *Two distinct chimeric potexviruses share antigenic cross-presentation properties of MHC class I epitopes*, *Vaccine* **28**, pp.5617-5626.

**7- Jessica Godin-Ethier, Sandy Pelletier, Laïla-Aïcha Hanafi et al.** (2009) *Human activated T lymphocytes modulate indoleamine 2,3-dioxygenase expression in tumors through Th1/Th2 balance*. *Journal of Immunology* **183**(12), p.7752-7760.

## ***Prix***

---

|                      |  |        |
|----------------------|--|--------|
| <b>Mai 2013</b>      | Prix d'engagement étudiant (ICM)                       | 500 \$ |
| <b>Décembre 2009</b> | Prix de présentation poster (PhD au CRCHUM)            | 500 \$ |
| <b>Mars 2009</b>     | Prix de présentation poster (M.Sc. au CRCHUM)          | 500 \$ |
| <b>Mai 2008</b>      | Liste d'honneur du doyen (B.Sc. Sciences biomédicales) |        |

## ***Bourses***

---

|                  |  |         |
|------------------|--|---------|
| <b>2013-2014</b> | Bourse de rédaction (Sciences biomédicales)                | 5000 \$ |
| <b>2012-2013</b> | Bourse de rédaction (Sciences biomédicales)                | 3500 \$ |
| <b>2012-2013</b> | Bourse d'excellence de la Faculté des études supérieures   | 5000 \$ |
| <b>Juin 2012</b> | Bourse de voyage Fonds Olive-Beaudry-Leriché               | 500 \$  |
| <b>Mai 2012</b>  | Bourse de voyage AAI (American Association for Immunology) | 500 \$  |
| <b>Mai 2012</b>  | Bourse de voyage CRCHUM                                    | 700 \$  |

|                   |   |                |
|-------------------|---|----------------|
| <b>2011-2012</b>  | Bourse d'excellence CRCHUM                              | 1000 \$        |
| <b>2011-2012</b>  | Bourse d'excellence Sciences biomédicales               | 1000 \$        |
| <b>2011-2014</b>  | Bourse Ph.D. Fond de recherche du Québec - santé (FRQS) | 20 000 \$/year |
| <b>2010-2011</b>  | Bourse de doctorat Sciences biomédicales                | 3500 \$        |
| <b>2009-2010</b>  | Bourse Marc-Bourgie (ICM)                               | 6000 \$        |
| <b>2009-2010</b>  | Bourse de doctorat Sciences biomédicales                | 2500 \$        |
| <b>Avril 2009</b> | Bourse de voyage CSI (Canadian Society for Immunology)  | 500 \$         |
| <b>2008-2009</b>  | Bourse de maîtrise Sciences biomédicales                | 2000 \$        |
| <b>2008-2009</b>  | Bourse de maîtrise CRCHUM                               | 2000 \$        |

### Présentations

#### **Orales :**

**1- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc et Réjean Lapointe. *Mécanismes moléculaires de la présentation croisée par le CMH de classe I via les VLP de potexvirus* (9 novembre 2012) 22<sup>e</sup> Journée scientifique de l'Institut du Cancer de Montréal, Montréal, QC.

**2- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc et Réjean Lapointe. *Autophagy is implicated in MHC class I antigen cross-presentation mediated by potexvirus VLP* (4-8 mai 2012) 99<sup>th</sup> American Association for immunology (AAI) meeting, Boston, MA

**3- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc et Réjean Lapointe. *Mécanismes moléculaires de la présentation croisée par le CMH de classe I via les VLP de potexvirus* (18 novembre 2011) 21<sup>e</sup> Journée scientifique de l'Institut du Cancer de Montréal, Montréal, QC.

**4- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc et Réjean Lapointe. *Mécanismes moléculaires de la présentation croisée par le CMH de classe I via les particules pseudo-virales de potexvirus* (12 novembre 2010) 20<sup>e</sup> Journée scientifique de l'Institut du Cancer de Montréal, Montréal, QC.

**5- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc et Réjean Lapointe. *Mécanismes moléculaires de la présentation croisée par le CMH de classe I via les particules pseudo-virales de potexvirus* (27 février 2009) 19<sup>e</sup> Journée scientifique de l'Institut du Cancer de Montréal, Montréal, QC.

**6- Laïla-Aïcha Hanafi** et Réjean Lapointe. *Caractérisation de l'indoleamine 2,3-dioxygénase dans des cancers du sein et du rein chez l'humain* (11 septembre 2007) Séminaire de stage, Université de Montréal, Montréal, QC

#### **Affiches :**

**1- Laïla-Aïcha Hanafi**, Dominique Gauchat, Jessica Godin-Ethier et al. *Fludarabine down-regulates indoleamine 2,3-dioxygenase in tumors via a proteasome-mediated degradation mechanism* (21-23 mai 2014) 7<sup>th</sup> annual canadian cancer immunotherapy symposium, CCIC Québec city, QC

**2- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc and Réjean Lapointe. *Autophagy is implicated in MHC class I antigen cross-presentation mediated by potexvirus VLP* (5 décembre 2013) Congrès des étudiants et stagiaires du CRCHUM, Montréal, QC

**3- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc and Réjean Lapointe. *Autophagy is implicated in MHC class I antigen cross-presentation mediated by potexvirus VLP* (5-7 juin 2013) 6<sup>th</sup> annual canadian cancer immunotherapy symposium, CCIC Toronto, ON

**4- Laïla-Aïcha Hanafi**, Dominique Gauchat, Jessica Godin-Ethier et al. *Fludarabine down-regulates indoleamine 2,3-dioxygenase in tumors via a proteasome-mediated degradation mechanism* (5-7 juin 2013) 6<sup>th</sup> annual canadian cancer immunotherapy symposium, CCIC Toronto, ON

**5- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc and Réjean Lapointe. *Autophagy is implicated in MHC class I antigen cross-presentation mediated by potexvirus VLP* (17-22 février 2013) Keystone (B4 – Autophagy, Immunity and Inflammation) Montréal, QC

**6- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc and Réjean Lapointe. *L'autophagie est impliquée dans la présentation croisée par CMH de classe I des potexvirus* (18 décembre 2012) Congrès des étudiants et stagiaires du CRCHUM, Montréal, QC

**7- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc and Réjean Lapointe. *Autophagy is implicated in MHC class I antigen cross-presentation mediated by potexvirus VLP* (12-14 juin 2012) 25<sup>th</sup> Canadian student health research forum (CSHRF) Winnipeg, Canada (selected by biomedical sciences program)

**8- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc and Réjean Lapointe. *Autophagy is implicated in MHC class I antigen cross-presentation mediated by potexvirus VLP* (4-8 mai 2012) 99<sup>th</sup> American Association for immunology (AAI) meeting, Boston, MA

**9- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc and Réjean Lapointe. *Autophagy is implicated in MHC class I cross-presentation by potexvirus VLP* (11-13 avril 2012) 5<sup>th</sup> annual canadian cancer immunotherapy symposium, CCIC Montréal, QC

**10- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc and Réjean Lapointe. *Mécanismes moléculaires de la présentation croisée par le CMH de classe I via les particules pseudo-virales de potexvirus* (13 décembre 2011) Congrès des étudiants et stagiaires du CRCHUM, Montréal, QC

**11- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc and Réjean Lapointe. *Mécanismes moléculaires de la présentation croisée par le CMH de classe I via les particules pseudo-virales de potexvirus* (15 décembre 2010) Congrès des étudiants et stagiaires du CRCHUM, Montréal, QC

**12- Laïla-Aïcha Hanafi**, Marilène Bolduc, Marie-Ève Laliberté-Gagné et al. *Two distinct chimeric potexviruses share antigenic cross-presentation properties of MHC class I epitopes* (22-27 août 2010) 14<sup>th</sup> International Congress for Immunology, Kobe, Japon

**13- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc and Réjean Lapointe. *Mécanismes moléculaires de la présentation croisée par le CMH de classe I via les particules pseudo-virales de potexvirus* (16 décembre 2009) Congrès des étudiants et stagiaires du CRCHUM, Montréal, QC

**14- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc and Réjean Lapointe. *Molecular pathways of major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by new vaccine platform Papaya Mosaic Virus-like particles* (24 avril 2009) Journée d'immunologie du CHUM, Montréal, QC

**15- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc and Réjean Lapointe. *Molecular pathways of major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by new vaccine platform Papaya Mosaic Virus-like particles* (3-6 avril 2009) Canadian Society for Immunology, Whistler, BC

**16- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc and Réjean Lapointe. *Mécanismes moléculaires de la présentation croisée par le CMH de classe I via les particules pseudo-virales de potexvirus* (19 mars 2009) Congrès des étudiants et stagiaires du CRCHUM, Montréal, QC

**17- Laïla-Aïcha Hanafi**, Denis Leclerc, Diane Beauseigle et al. *Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by new vaccine platform Papaya Mosaic Virus-like particles* (11-14 avril 2008) Canadian Society for Immunology, Mont Tremblant, QC

### ***Implication sociale***

---

**Mars 2010-2014**

**Juge Expo-sciences**

Finale régionale de Laval (2010) et de Montréal (2011-14) et finale provinciale (2010 et 2014)

**Février 2009-2014**

**Bénévole**

Concert contre le cancer, Casino contre le cancer

**Sept 2010-Déc 2013**

**Réprésentante étudiante**

Conseil d'administration d'Immunologie Montréal

**Janvier 2013**

**Campagne promotionnelle "Je suis Michèle"**

Participation à une vidéo pour réduire les coupes du FRQ-S

**Sept -Nov 2010**

**Organisation d'évènements** (20<sup>e</sup> journée scientifique de l'ICM)