

Université de Montréal

**Caractérisation des motifs permettant la mobilisation vers les endosomes
et la présentation par les molécules du CMH de classe II chez gp100,
un antigène du mélanome**

Par
Stéphanie Lepage

Programme de Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en Sciences Biomédicales

Décembre, 2005

© Stéphanie Lepage, 2005



W

4

U58

2006

V. 077

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**Caractérisation des motifs permettant la mobilisation vers les endosomes
et la présentation par les molécules du CMH de classe II chez gp100,
un antigène du mélanome**

présenté par :
Stéphanie Lepage

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Richard Bertrand, Ph.D.
Président-rapporteur

Réjean Lapointe, Ph.D.
Directeur de recherche

Jacques Thibodeau, Ph.D.
Membre du jury

Résumé

Dans les stratégies d'immunothérapie ciblant les antigènes tumoraux (AT), les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle important dans la réponse anti-tumorale dépendante des lymphocytes T CD8⁺. L'activation de lymphocytes T CD8⁺, via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, et de lymphocytes T CD4⁺, via les molécules du CMH de classe II, peut amplifier cette réponse. Normalement, les CMH de classe I présentent des protéines endogènes alors que les CMH de classe II présentent des protéines exogènes. Gp100, un antigène du mélanome, peut être présenté autant par les molécules du CMH de classe I que de classe II lorsqu'il est exprimé de façon endogène, suggérant qu'il peut atteindre les compartiments du CMH de classe II (MIIC).

Nous avons démontré que la séquence signal et les 70 derniers résidus en carboxy-terminal de gp100 étaient essentiels pour la mobilisation vers les MIIC et la présentation par les molécules du CMH de classe II. Ces séquences ont ensuite été caractérisées par la délétion de différentes sections en carboxy-terminal (positions 590 à 661). Leur transfection dans des cellules 293T, exprimant des molécules du CMH de classe I et de classe II, a révélé une diminution de la présentation par CMH de classe II pour certaines délétions, sans affecter la présentation par CMH de classe I. Finalement, nous avons utilisé ces séquences pour mobiliser la Protéine Fluorescente Verte (GFP) vers les endosomes, et pour permettre la présentation d'un épitope endogène par les molécules du CMH de classe I et de classe II.

Nous confirmons que ces séquences sont des motifs de mobilisation vers les MIIC. Conséquemment, ils pourront être inclus dans des cassettes d'expression d'antigènes tumoraux ou viraux pour permettre leur présentation par les molécules du CMH de classe I et de classe II et optimiser les réponses des lymphocytes T *in vivo*, ou être utilisés comme un outil *in vitro* pour faciliter la caractérisation de nouveaux épitopes de classe II.

Mots clés

Immunothérapie tumorale

Mélanome

gp100

Présentation antigénique

Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Compartiments du CMH de classe II (MIIC)

Mobilisation endosomiale

Lymphocytes T CD4⁺

Récepteur des lymphocytes T (TCR)

Summary

In tumor immunotherapy strategy, targeting tumor antigens (TA), CD4⁺ T lymphocytes play an important role in CD8⁺ T cell-mediated responses against tumors. Activation of both CD8⁺ T cells by major histocompatibility complex (MHC) class I and CD4⁺ T cells by MHC class II could amplify this response. Normally, MHC class I present endogenous proteins, while MHC class II present exogenous proteins. Interestingly, gp100, a melanoma antigen, can be presented by both MHC class I and class II when expressed endogenously, suggesting that it can reach endosomal/MHC class II compartments (MIIC).

We demonstrated that the gp100 signal sequence and the last 70 residues in carboxy-terminus are essential for MIIC localization and MHC class II presentation. These sequences were characterized by deleting different sections in the carboxy-terminus (residues 590 to 661). Transfection in 293T cells, expressing MHC class I and class II molecules, revealed a decreased MHC class II presentation for specific deletions in carboxy-terminus, without effects on MHC class I presentation. Finally, we used these gp100-targeting sequences to mobilize green fluorescent protein (GFP) to endosomal compartments, and to allow MHC class II and class I presentation of minimal endogenous epitopes.

We conclude that these specific sequences are MIIC-targeting motifs. Consequently, they could be included in expression cassettes for endogenously-expressed tumor or viral antigens to promote MHC class II and class I presentation and optimize *in vivo* T cell responses, or as an *in vitro* tool for characterization of new MHC class II epitopes.

Key words

Tumor immunotherapy

Melanoma

gp100

Antigen presentation

Major histocompatibility complex (MHC)

MHC class II compartments (MIIC)

CD4⁺ T lymphocytes

Endosomal trafficking

T cell receptor (TCR)

Table des matières

Résumé	i
Mots clés	ii
Summary	iii
Key words	iv
Table des matières	v
Liste des figures et tableaux	viii
Listes des signes et abréviations	ix
Remerciements	xi
CHAPITRE 1. INTRODUCTION	1
1.1 Immunothérapie tumorale	1
1.1.1 Défis du cancer	1
1.1.2 Immunothérapie tumorale	1
1.1.3 Historique de l'immunothérapie tumorale	2
1.1.3.1 Stimulation du système immunitaire	2
1.1.3.2 Lymphocytes T activés	3
1.1.3.2.1 Cellules LAK	3
1.1.3.2.2 Lymphocytes T infiltrant les tumeurs	4
1.1.3.3 Antigènes tumoraux	4
1.2 Présentation antigénique	5
1.2.1 Récepteur des lymphocytes T	5
1.2.2 Molécules du CMH	6
1.2.3 Présentation par les molécules du CMH de classe I	7
1.2.3.1 Présentation d'antigènes endogènes	7
1.2.3.2 Présentation croisée d'antigènes exogènes	9
1.2.4 Présentation par les molécules du CMH de classe II	11
1.2.4.1 Présentation d'antigènes exogènes	11
1.2.4.2 Présentation croisée d'antigènes endogènes	14
1.3 Approches ciblant les antigènes tumoraux (AT)	16

1.3.1	Caractéristiques des AT	16
1.3.2	Épitopes	17
1.3.3	Génération de lymphocytes T spécifiques	18
1.3.4	Identification des AT	18
1.3.5	Classification des AT selon leur profil d'expression	20
1.3.5.1	Antigènes exprimés exclusivement dans les tumeurs	20
1.3.5.2	Antigènes dont l'expression est partagée avec d'autres tissus	20
1.3.5.2.1	Protéines mutées	20
1.3.5.2.2	Protéines de cellules germinales	22
1.3.5.2.3	Protéines spécifiques à certains tissus	22
1.3.6	Immunogénicité	23
1.4	Mélanome	24
1.4.1	Mélanosomes	25
1.4.2	Protéines partagées entre mélanocytes et mélanomes	27
1.4.2.1	Protéines des mélanosomes	27
1.4.2.2	Antigènes du mélanome	27
1.4.2.2.1	Gp100	28
1.4.2.2.2	Présentation de gp100 par les molécules du CMH de classe I	30
1.4.2.2.3	Présentation de gp100 par les molécules du CMH de classe II	31
1.5	Hypothèse et objectifs du projet de maîtrise	32
CHAPITRE 2.	Melanosomal targeting sequences from gp100 are essential for MHC class II-restricted endogenous epitope presentation and mobilization to endosomal compartments	34
	Abstract	35
	Introduction	36
	Materials and Methods	39
	Results	46
	Discussion	55
	Acknowledgments	59
	Abbreviations	59
	References	60

CHAPITRE 3. Clonage du TCR d'un clone de lymphocyte T CD4⁺ spécifique à l'épitope gp100₁₇₀₋₁₉₀ présenté par HLA-DRβ1*0701	77
3.1 Résumé	77
3.2 Matériel et Méthodes	78
3.3 Présentation et description des résultats	80
3.3.1 Spécificité du récepteur des lymphocytes T	80
3.3.2 Isolement des gènes du TCR	80
3.3.3 Séquences des régions variables	81
CHAPITRE 4. DISCUSSION	85
4.1 Sommaire des résultats et pertinence du projet par rapport au domaine de l'immunothérapie	85
4.2 Présentation par les molécules du CMH de classe II	86
4.2.1 Présentation des antigènes du mélanome	86
4.2.2 Voies de mobilisation vers les MIIC	88
4.3 Mobilisation de gp100	89
4.4 Motifs de gp100	90
4.4.1 Domaine transmembranaire	90
4.4.2 Motif di-leucine potentiel	91
4.4.3 Signaux de mobilisation vers les MIIC	93
4.5 Conclusions	95
4.6 Perspectives et potentiel d'exploitation	96
4.6.1 Caractérisation d'antigènes	96
4.6.2 Vaccination	97
4.6.3 Présence de gp100 à la surface	97
CHAPITRE 5. BIBLIOGRAPHIE	98

Liste des figures et tableaux

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

Figure 1	Présentation antigénique par les molécules du CMH	8
Figure 2	Assemblage des molécules du CMH de classe II	12
Figure 3	Les différents stades de maturation des mélanosomes	26
Figure 4	Formation des striations à l'intérieur des prémélanosomes	29
Tableau 1	Classification des AT selon leur profil d'expression	21

CHAPITRE 2. **Melanosomal targeting sequences from gp100 are essential for MHC class II-restricted endogenous epitope presentation and mobilization to endosomal compartments**

Figure 1	MHC class II-restricted presentation of endogenous and exogenous gp100	65
Figure 2	Co-localization of gp100 and LAMP-1	67
Figure 3	Mapping of gp100-derived targeting sequences essential for MHC class II presentation.	69
Figure 4	Gp100 cell surface expression in melanoma cell lines	71
Figure 5	Endosomal localization of gp100 mutant	73
Figure 6	Endosomal mobilization of GFP, and presentation of minimal MHC class II and class I epitopes, using gp100-targeting sequences	75

CHAPITRE 3. **Clonage du TCR d'un clone de lymphocyte T CD4⁺ spécifique à l'épitope gp100₁₇₀₋₁₉₀ présenté par HLA-DRβ1*0701**

Figure 1	Isolement des gènes du TCR par PCR	83
Figure 2	Structure et séquence des gènes du TCR	84

Listes des signes et abréviations

ADN, acide désoxyribonucléique

ADNc, ADN complémentaire

ARN, acide ribonucléique

AT, antigène tumoral

BSA, albumine de sérum bovin (*bovine serum albumin*)

CLIP, peptide de Ii associé aux molécules de classe II (*class II-associated Ii peptide*)

CMH, complexe majeur d'histocompatibilité

CPA, cellules présentatrices d'antigènes

CTL, lymphocytes T cytotoxiques (*cytotoxic T lymphocytes*)

Da, dalton

EBV, virus Epstein-Barr

g, gramme

GFP, protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein*)

gp100, glycoprotéine 100

HLA, antigène des leucocytes humains (*human leukocyte antigen*)

Ii, chaîne invariante

IL, interleukine

IU, unité internationale

k, kilo

l, litre

LAK, cellules lymphoïdes tueuses activées (*lymphokine-activated killer*)

LAMP, protéine membranaire associée aux lysosomes (*lysosome-associated membrane protein*)

LL, motif di-leucine

m, milli

M, molaire

MAGE, antigène associé au mélanome (*melanoma-associated gene*)

MART-1/Melan-A, antigène du mélanome reconnu par des lymphocytes T (*melanoma antigen recognized by T cells*)

MIIC, compartiments du CMH de classe II (*MHC class II compartment*)

min, minute

n, nano

NK, cellules tueuses naturelles (*natural killer*)

pb, paire de bases

PBMC, cellules mononucléées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*)

PBS, *phosphate-buffered saline*

PCR, réaction de polymérisation en chaîne (*polymerization chain reaction*)

RACE, amplification rapide d'une extrémité d'ADNc (*rapid amplification of cDNA ends*)

RE, réticulum endoplasmique

REP, protocole d'expansion rapide (*rapid expansion protocol*)

RT, transcription inverse (*reverse transcription*)

Std, standard

TAP, transporteur associé à l'apprêtement des antigènes (*transporter associated with antigen processing*)

TCR, récepteur des lymphocytes T (*T-cell receptor*)

TIL, lymphocytes T infiltrant les tumeurs (*tumor-infiltrating lymphocytes*)

TM, domaine transmembranaire

T_{reg}, lymphocytes T régulateurs

TRP, protéines reliées à tyrosinase (*tyrosinase-related protein*)

U, unité

YV, séquence de Y à V

μ, micro

%, pourcentage

Δ, délétion

°C, degré Celsius

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Réjean Lapointe, d'abord pour son accueil dans son nouveau laboratoire, mais aussi pour son support, sa patience et sa grande disponibilité. Je tiens d'ailleurs à souligner l'encadrement exceptionnel dont j'ai bénéficié tout au long de mes études dans son laboratoire.

Je remercie également mes collègues de travail, présents et passés, Diane Beauseigle, Marie-Andrée Forget, Jessica Godin-Ethier, Sandy Pelletier, Dr Simon Turcotte, Urszula Krzemien, Simon Picard, Maud Grellety et Martin Lapierre, pour leur support, leurs encouragements et pour tout le plaisir que nous avons eu à travailler ensemble. J'ai grandement apprécié leur compagnie, ainsi que la continuelle entraide qu'il a régnée entre nous tous, tout au long de ces années. Je tiens aussi à remercier M. Michel Lauzon, du département de pathologie de l'université de Montréal, pour son aide précieuse en microscopie confocale. Je remercie également tous les étudiants et le personnel de l'Institut du Cancer de Montréal (ICM), du Centre de Recherche du CHUM, du programme de Sciences Biomédicales, pour leurs encouragements et leurs précieux conseils.

Je veux aussi remercier les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC), l'Institut du Cancer de Montréal (ICM), Candérel et le Centre de Recherche du CHUM pour leur support financier.

Finalement, je remercie de tout cœur mon amour Michel pour m'avoir accompagné, supporté et soutenu tout au long de ce cheminement, autant dans les périodes difficiles que dans les moments heureux. Je remercie également ma famille et mes amis pour leur support et leurs encouragements qui m'ont été précieux tout au long de ces années.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1 Immunothérapie tumorale

1.1.1 Défis du cancer

Pour 2005, on prévoit qu'environ 150 000 nouveaux cas de cancer seront diagnostiqués et que près de 70 000 décès seront dû au cancer (Société canadienne du cancer, 2005). De plus, on estime qu'environ 40% des canadiens seront un jour atteints du cancer, qui sera aussi la cause du quart des décès au Canada. Jusqu'à maintenant, les traitements conventionnels contre le cancer étaient la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Toutefois, malgré le fait que ces traitements contribuent à sauver plusieurs vies, le nombre de cas diagnostiqué chaque année ne cesse d'augmenter. Et, puisque la chimiothérapie et la radiothérapie ne sont pas des traitements spécifiques aux cellules tumorales, leur action atteint aussi certaines cellules normales saines pouvant parfois entraîner une morbidité importante chez les patients. De cette réalité découle donc le besoin de développer de nouveaux traitements contre le cancer, tel que l'immunothérapie tumorale.

1.1.2 Immunothérapie tumorale

Le principe de l'immunothérapie tumorale est essentiellement axé sur la stimulation du système immunitaire, pour cibler spécifiquement les cellules tumorales afin de les éliminer. Par rapport aux autres traitements déjà existants, l'immunothérapie tumorale a comme principal avantage de permettre une action spécifique contre les cellules tumorales, en causant le moins de dommage possible aux tissus normaux. De plus, cette réponse immunitaire peut aussi entraîner une réponse mémoire pouvant contribuer à réduire les risques de récurrence. Par contre, il reste encore beaucoup de chemin à faire afin que l'immunothérapie tumorale devienne un traitement plus efficace et accessible.

1.1.3 Historique de l'immunothérapie tumorale

1.1.3.1 Stimulation du système immunitaire

L'intérêt porté sur la stimulation du système immunitaire pour traiter le cancer a débuté il y a plus de 100 ans. Vers la fin du 19^e siècle, le Dr William Coley a utilisé la réponse inflammatoire aux bactéries comme forme d'immunothérapie (Coley, 1991). Par cette activation non spécifique du système immunitaire, il espérait créer un ciblage vers les cellules tumorales pour ainsi mener à leur élimination par les cellules du système immunitaire. Par la suite, d'autres approches utilisant les réponses immunitaires engendrées par des bactéries, ou des produits bactériens, ont été développées. Dans certaines circonstances, la réponse inflammatoire ainsi engendrée s'est aussi avérée anti-tumorale (Meyer et al., 2002).

D'un point de vue immunologique, les cellules tumorales peuvent être considérées comme des cellules du soi modifiées ayant échappé aux mécanismes de contrôle du système immunitaire. Elles sont donc peu immunogéniques, c'est-à-dire qu'elles sont faiblement reconnues par le système immunitaire pour être éliminées de façon spontanée. D'où l'intérêt de l'immunothérapie tumorale basé sur la stimulation du système immunitaire pour augmenter la réponse anti-tumorale.

D'ailleurs, au cours des dernières décennies, il a été démontré que l'immunothérapie tumorale pouvait mener à une régression significative des tumeurs chez des patients porteurs de tumeurs volumineuses et disséminées (Rosenberg, 2001). Les exemples les plus évidents ont d'abord été observés lors d'études chez des patients atteints de mélanomes ou de cancers rénaux métastatiques traités par injection d'interleukine (IL)-2 (Rosenberg et al., 1985). Une administration de fortes doses d'IL-2 a pu générer une réponse dans 15-20% des cas de mélanomes traités. Chez environ le tiers des patients ayant répondu, le traitement a été suivi par la disparition complète et durable de la tumeur (Rosenberg, 1998). L'IL-2 étant un facteur d'activation des lymphocytes T, l'effet anti-tumoral observé est donc obtenu

suite à une stimulation non spécifique des lymphocytes T du système immunitaire, démontrant ainsi l'importance du rôle des lymphocytes T dans l'immunité anti-tumorale.

1.1.3.2 Lymphocytes T activés

L'étude des lymphocytes a permis d'établir différentes façons d'activer des lymphocytes T anti-tumoraux, *in vitro*, soit en les co-cultivant en présence de cellules tumorales (Wagner and Rollinghoff, 1973), ou en présence d'IL-2 (Ting and Yang, 1982) ou d'autres facteurs de croissance de lymphocytes T (Eberlein et al., 1982; Rosenberg et al., 1982). Ces études ont également permis de confirmer que les lymphocytes T activés pouvaient entraîner une destruction des cellules tumorales plus efficacement que des lymphocytes T non activés. Cependant, l'activation d'une grande quantité de lymphocytes T anti-tumoraux peut parfois être difficile à obtenir par ces procédés.

1.1.3.2.1 Cellules LAK

Une population de cellules lymphoïdes activées ayant la capacité de tuer des cellules tumorales, générée en présence de hautes concentrations d'IL-2, a été identifiée par le groupe du Dr Steven Rosenberg (Grimm et al., 1982; Rosenberg, 1984). Appelées cellules LAK (*lymphokine-activated killer*), elles étaient typiquement constituées à plus de 90% de cellules NK (*natural killer*) activées. Les cellules NK sont surtout associées à l'immunité innée, c'est-à-dire qu'elles n'ont pas besoin d'avoir de spécificité pour reconnaître et tuer les cellules tumorales. Elles possèdent plusieurs récepteurs à leur surface, qui régulent leurs réponses aux signaux avoisinants (Colucci et al., 2002). Puisque de grandes quantités de cellules LAK pouvaient être générées *in vitro* et qu'elles semblaient être réactives contre une grande variété de tumeurs, leur efficacité en immunothérapie tumorale a été évaluée lors de plusieurs essais cliniques (Jacobs et al., 1986; Rosenberg et al., 1986). Dans ces études, les cellules lymphoïdes du sang périphérique, prélevées chez des patients

présentant divers cancers métastatiques avancés, étaient activées *in vitro* avec de l'IL-2 pour générer des cellules LAK. Ces cellules activées étaient ensuite réinjectées aux patients en association avec de hautes doses d'IL-2. Lors d'un essai portant sur 25 patients, une régression tumorale a pu être observée chez 11 patients (Rosenberg et al., 1985). Par la suite, un essai plus étendu sur 157 patients, dont 108 d'entre eux avaient reçu le traitement à base de cellules LAK, s'est traduit par une régression complète chez 8 patients, une réponse partielle chez 15 patients et une réponse mineure chez 10 patients (Rosenberg et al., 1987). Toutefois, cette approche a été abandonnée vu la présence de nombreux effets secondaires indésirables dus à la dose élevée d'IL-2 nécessaire à l'activité des cellules LAK. De plus, la réponse anti-tumorale attribuable aux cellules LAK était difficilement différenciable de celle attribuable à l'effet de hautes doses d'IL-2 seules, ce qui mettait en doute leur efficacité réelle.

1.1.3.2.2 Lymphocytes T infiltrant les tumeurs

L'identification d'une population de lymphocytes T anti-tumoraux spécifiques infiltrant les tumeurs (TIL), a aussi beaucoup contribué à l'avancement des recherches sur l'immunologie du cancer (Svennevig et al., 1979; Svennevig and Svaar, 1979). Certaines études sur des populations de TIL provenant de différents cancers, dont le mélanome, ont mis en évidence des activités cytotoxiques spécifiques contre les cellules tumorales (Hoshino et al., 1997; Chaperot et al., 1999; Benlalam et al., 2001). Les TIL spécifiques peuvent être activés *in vitro* et être réinjectés aux patients en association avec des perfusions continues d'IL-2. Lors d'un essai clinique, une régression partielle des carcinomes à cellules rénales et des mélanomes malins a pu être observée chez 29% et 23% des patients, respectivement (Kradin et al., 1989).

1.1.3.3 Antigènes tumoraux

Plus récemment, la découverte des mécanismes permettant au système immunitaire de reconnaître et détruire les cellules tumorales ont mené vers une ère

nouvelle en immunothérapie tumorale. D'abord, il y a eu la description d'antigènes exprimés sur les cellules tumorales, les antigènes tumoraux (AT), qui peuvent être reconnus et ciblés par les lymphocytes T spécifiques. Il y a ensuite eu la caractérisation du récepteur des lymphocytes T (TCR) (Zinkernagel and Doherty, 1979) capable de reconnaître spécifiquement un antigène présenté par une molécule particulière du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), exprimée par les cellules tumorales ou les cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que l'immunisation contre un AT spécifique pouvait mener à une régression tumorale chez certains patients. Par exemple, une régression tumorale a été observée chez 42% des patients, avec un mélanome métastatique, immunisés avec un épitope de classe I dérivé de l'antigène du mélanome gp100, ainsi que de fortes doses d'IL-2 (Rosenberg et al., 1998). De plus, une réponse complète a été obtenue chez 13% des patients immunisés avec des cellules dendritiques chargées avec des antigènes du mélanome (Nestle et al., 1998).

Bien que les principes de l'immunothérapie dirigée contre des AT aient été démontrés, le défi consiste maintenant à augmenter la proportion de patients qui répondent aux traitements de même que la durée de la réponse anti-tumorale. De plus, les différentes études cliniques ne semblent pas toujours démontrer de corrélation entre l'activité cytotoxique des lymphocytes T et les réponses cliniques observées chez les patients.

1.2 Présentation antigénique

1.2.1 Récepteur des lymphocytes T

Le TCR est une protéine transmembranaire composée d'une chaîne α et d'une chaîne β . Il est associé à un complexe de transduction du signal composé de plusieurs protéines, dont le CD3 (Hedrick et al., 1984). Chacune des chaînes du TCR est constituée d'un domaine constant et d'un domaine variable résultant du

réarrangement de plusieurs segments géniques (Oltz, 2001; Michie and Zuniga-Pflucker, 2002). Le domaine variable de la chaîne α est constitué d'un segment V et d'un segment J, alors que celui de la chaîne β est constitué d'un segment V, d'un segment D et d'un segment J. Le domaine variable contribue à l'importante diversité du TCR, et donne la spécificité caractéristique de chaque lymphocyte T (Nikolich-Zugich et al., 2004).

Bien que seul le complexe TCR/CD3 soit nécessaire à la reconnaissance spécifique de l'antigène présenté par les molécules du CMH, les molécules transmembranaires CD4 et CD8 jouent aussi un rôle accessoire important dans la reconnaissance de l'antigène et l'activation des lymphocytes T. De plus, la reconnaissance de l'antigène par le TCR n'est pas suffisante pour l'activation des lymphocytes T naïfs. En effet, la présentation de l'antigène par les molécules du CMH, doit être suivie d'un signal de co-stimulation via le TCR par la cellule présentatrice, résultant en l'augmentation de l'expression de plusieurs cytokines et de récepteurs de cytokines par les lymphocytes T activés (Weaver and Unanue, 1990; Linsley et al., 1991).

1.2.2 Molécules du CMH

Pour être reconnus par les lymphocytes T, les antigènes doivent être présentés à la surface des cellules sous forme de peptides associés aux molécules du CMH. Il existe différents types de molécules du CMH, dont les molécules du CMH de classe I et les molécules du CMH de classe II, et 6 différents sous-types chez l'humain : HLA-A, HLA-B et HLA-C pour la classe I ; HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR pour la classe II (Beck and Trowsdale, 2000). De plus, chacun de ces sous-types est très polymorphique, c'est-à-dire que de nombreuses formes alternatives du gène, ou allèles, existent au niveau de chaque locus. Pour les molécules du CMH de classe I, il existe près de 350 différents allèles codants pour HLA-A, plus de 600, pour HLA-B et près de 200, pour HLA-C. Pour les molécules du CMH de classe II, il existe plus

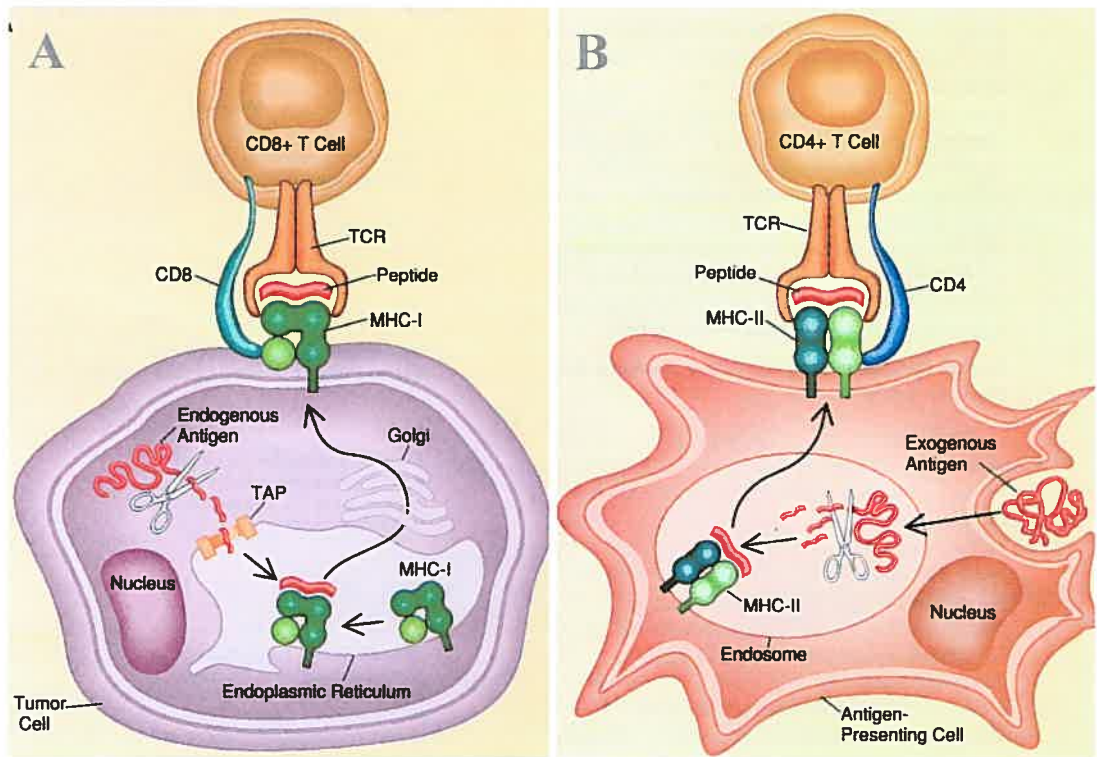
d'une centaine d'allèles pour HLA-DP, un peu moins pour HLA-DQ et près de 500 allèles pour HLA-DR (Marsh et al., 2005).

Le principal rôle de ces molécules est de présenter des peptides aux lymphocytes T (voir Figure 1). Les molécules du CMH de classe I, généralement exprimées par la plupart des cellules nucléées, présentent des antigènes endogènes apprêtés par la voie cytosolique et induisent une réponse cellulaire impliquant les lymphocytes T CD8⁺. À l'opposé, les molécules du CMH de classe II, principalement exprimées par les CPA, présentent des antigènes exogènes apprêtés par la voie endocytaire et induisent une réponse humorale impliquant les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes B, producteurs d'anticorps. Les lymphocytes T CD4⁺ peuvent aussi avoir un effet d'aide sur les autres cellules effectrices, dont les lymphocytes T CD8⁺, par la production de cytokines.

1.2.3 Présentation par les molécules du CMH de classe I

1.2.3.1 Présentation d'antigènes endogènes

La présentation d'antigènes endogènes par les molécules du CMH de classe I est illustrée à la Figure 1-A. Les molécules du CMH de classe I, exprimées par la plupart des cellules nucléées, présentent des peptides d'environ 8 à 10 acides aminés, dérivés de protéines endogènes. Les protéines endogènes sont dégradées en peptides dans le cytoplasme par différentes protéases, dont le complexe du protéasome (York and Rock, 1996; Hwang et al., 2001), et sont ensuite transportées par un complexe de protéines TAP (Hwang et al., 2001; Cresswell et al., 1999) à travers la membrane du réticulum endoplasmique (RE), où sont synthétisées les molécules du CMH de classe I (Germain, 1994). Le complexe du CMH de classe I est composé d'une protéine à 3 domaines α , associée de façon non covalente à la β_2 -microglobuline (Solheim J.C., 1999). Les domaines α_1 et α_2 de la molécule du CMH de classe I forment une poche peptidique qui restreint la longueur des peptides pouvant s'associer et qui est constituée de sites d'ancrage spécifiques pour le peptide.



(Rosenberg, 1995) The Cancer Journal from Scientific American

Figure 1 Présentation antigénique par les molécules du CMH

A. Présentation des protéines endogènes par les molécules du CMH de classe I. Les protéines endogènes sont dégradées en peptides dans le cytoplasme par un complexe de protéases et sont ensuite transportées à travers la membrane du RE où sont synthétisées les molécules du CMH. Certains peptides vont s'associer avec des molécules du CMH de classe I, pour être ensuite présentés à la surface, où ils pourront être reconnus par des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques.

B. Présentation des protéines exogènes par les molécules du CMH de classe II. Les protéines exogènes sont capturées par les CPA et atteignent les compartiments de la voie d'apprêtement endocytaire, les endosomes/MIIC, où elles sont dégradées en peptides. Certains peptides vont s'associer avec des molécules du CMH de classe II, pour être ensuite présentés à la surface, où ils pourront être reconnus par des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques.

Seuls les peptides ayant suffisamment d'affinité vont pouvoir s'associer avec des molécules du CMH de classe I particulières et les complexes ainsi formés vont ensuite migrer vers la membrane plasmique de la cellule, où ils seront présentés aux lymphocytes T CD8⁺ qui pourront les reconnaître grâce à leur TCR (Garcia et al., 1999).

Une fois activés, les lymphocytes T CD8⁺, aussi appelés lymphocytes T cytotoxiques (CTL), tuent leurs cibles de façon spécifique (Townsend and Bodmer, 1989). Dans le contexte de l'immunothérapie tumorale, les lymphocytes T CD8⁺ sont donc considérés comme une des principales cellules effectrices requises pour la régression de la tumeur.

1.2.3.2 Présentation croisée d'antigènes exogènes

De façon générale, les molécules du CMH de classe I présentent des antigènes endogènes apprêtés par la voie cytosolique, aux lymphocytes T CD8⁺. Ces antigènes endogènes sont principalement des AT exprimés par des cellules tumorales, ou encore des antigènes viraux ou bactériens exprimés à l'intérieur des cellules infectées.

Toutefois, afin de pouvoir accéder au site de la tumeur ou de l'infection, les lymphocytes T naïfs doivent d'abord subir une première phase d'activation à l'intérieur des organes lymphoïdes secondaires. Cette première activation est principalement accomplie par les cellules dendritiques, résidants dans les ganglions lymphatiques, qui présentent différents antigènes par les molécules du CMH et expriment des signaux de co-stimulation pour les lymphocytes T (Mackay, 1993; Butcher and Picker, 1996). Ainsi, les lymphocytes T CD8⁺ doivent être en mesure de rencontrer leurs antigènes spécifiques présentés par les molécules du CMH de classe I, par des cellules dendritiques, dans les ganglions lymphatiques.

Une voie de présentation alternative a d'ailleurs été suggérée par le Dr Michael John Bevan, il y a environ 30 ans (Bevan, 1976), soit la présentation croisée

d'antigènes exogènes par les molécules du CMH de classe I. Le phénomène de présentation croisée a d'abord été démontré *in vivo* dans des modèles de souris transgéniques (Kurts et al., 1996; Morgan et al., 1999). Mais c'est surtout à l'aide de modèles *in vitro* que le mécanisme de cette présentation croisée a pu être étudié.

Trois voies ont été suggérées pour l'apprêtement d'antigènes exogènes pour la présentation par les molécules du CMH de classe I, par les cellules dendritiques. D'abord, une voie cytoplasmique où les antigènes, une fois internalisés par les CPA, seraient transférés vers le cytoplasme de la cellule pour ensuite être apprêtés comme les antigènes endogènes, par la voie de présentation des molécules du CMH de classe I (Kovacs-Bankowski and Rock, 1995; Ramirez and Sigal, 2002). Il y a aussi une voie vacuolaire où l'apprêtement des antigènes se ferait plutôt dans des vacuoles spécialisées de phagocytose, soit les phagosomes (Ackerman et al., 2003), où les protéines sont dégradées par des enzymes protéolytiques. Les peptides peuvent ensuite être chargés sur des molécules du CMH de classe I (Pfeifer et al., 1993). Ces peptides ainsi générés doivent alors compétitionner avec des peptides déjà liés aux molécules du CMH de classe I, pour pouvoir prendre leur place (Ackerman and Cresswell, 2004). Plus récemment, une 3^e voie, où le RE est impliqué dans la formation du phagosome, a été décrite par au moins 3 auteurs différents (Houde et al., 2003; Guermonprez et al., 2003; Ackerman et al., 2003). Cette fusion permettrait aux phagosomes de recruter les protéines nécessaires au chargement des peptides sur les molécules du CMH de classe I, qui pourront ensuite atteindre la surface cellulaire.

Les cellules dendritiques peuvent donc capturer et internaliser des AT provenant de cellules tumorales (Huang et al., 1994; Robinson et al., 1999) ou des antigènes viraux ou bactériens provenant de cellules infectées (Yewdell et al., 1988; Sigal et al., 1999). De façon générale, ces antigènes proviennent des corps apoptotiques formés suite à l'apoptose, soit la mort programmée, de cellules tumorales ou de cellules infectées (Albert et al., 1998). Ces antigènes sont ensuite apprêtés par les cellules dendritiques pour être présentés par les molécules du CMH de classe I, aux lymphocytes T CD8⁺, dans les organes lymphoïdes secondaires.

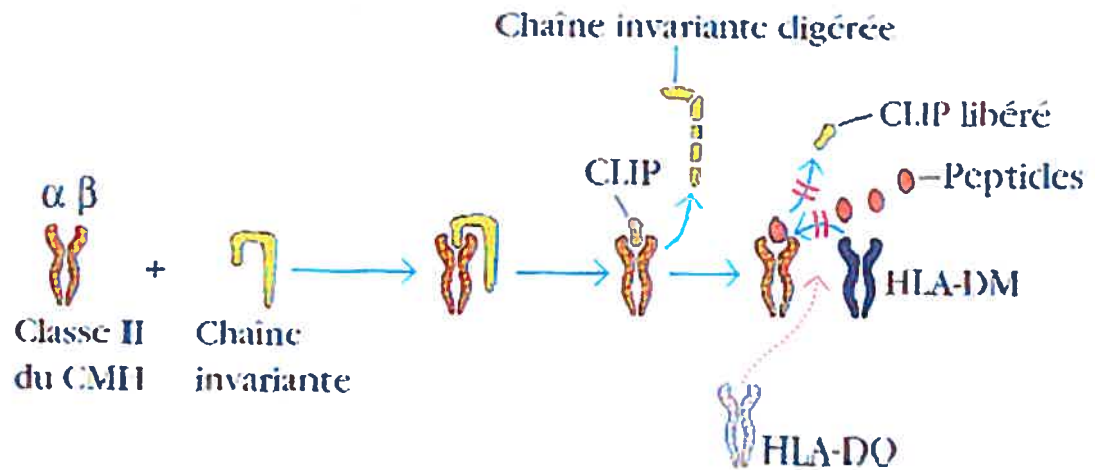
1.2.4 Présentation par les molécules du CMH de classe II

1.2.4.1 Présentation d'antigènes exogènes

La présentation d'antigènes exogènes par les molécules du CMH de classe II est illustrée à la Figure 1-B. Contrairement à la présentation par les molécules du CMH de classe I qui peut être accomplie par la plupart des cellules nucléées, la présentation par les molécules du CMH de classe II est principalement accomplie par des cellules spécialisées du système immunitaire : les CPA, tel que les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B (Pieters, 1997).

Les molécules du CMH de classe II présentent des peptides dérivés de protéines exogènes. Les protéines internalisées par phagocytose ou endocytose, par les CPA, atteignent les compartiments de la voie d'apprêtement endocyttaire, les compartiments du CMH de classe II (MIIC) (Peters et al., 1991; Sachse et al., 2002), où elles sont dégradées en peptides, grâce à des enzymes protéolytiques et au pH acide (Nakagawa T.Y. and Rudensky, 1999; Watts, 2001). C'est aussi dans ces compartiments que les peptides ayant suffisamment d'affinité vont pouvoir s'associer avec des molécules du CMH de classe II particulières. Contrairement aux peptides présentés par les molécules du CMH de classe I, les peptides présentés par les molécules du CMH de classe II n'ont aucune contrainte de longueur.

Comme les molécules du CMH de classe I, les molécules du CMH de classe II sont synthétisées dans le RE (Germain, 1994). Chaque molécule du CMH de classe II est composée d'une chaîne α et d'une chaîne β , associées de façon non covalente (Cresswell, 1994). Aussitôt synthétisées, les chaînes α et β sont associées à une chaîne invariante (Ii) (Cresswell, 1996) grâce à laquelle elles seront dirigées vers la voie d'apprêtement endocyttaire et les MIIC (Cresswell, 1994) (voir Figure 2).



(Goldsby et al., 2001) Immunologie : Le cours de Janis Kuby

Figure 3 Assemblage des molécules du CMH de classe II

Au sein du RE, les chaînes α et β du CMH de classe II sont associées à une Ii, qui prévient la fixation prématurée de peptides et aide à diriger le complexe vers les compartiments de la voie d'apprêtement endocytaire. Les enzymes présents dans ces compartiments vont dégrader la Ii jusqu'à n'y laisser qu'un petit fragment, le CLIP, qui sera ensuite échangé contre un peptide antigénique par un procédé impliquant la molécule de classe II, HLA-DM. Une autre molécule de classe II, HLA-DO, exprimée principalement par les lymphocytes B, vient moduler négativement l'échange du peptide par HLA-DM.

Les enzymes présents dans ces compartiments vont dégrader la Ii jusqu'à n'y laisser qu'un petit fragment, le CLIP, qui sera ensuite échangé contre un peptide antigénique par un procédé impliquant la molécule de classe II, HLA-DM (Denzin and Cresswell, 1995; Sloan et al., 1995). Une autre molécule de classe II, HLA-DO, exprimée principalement par les lymphocytes B (Chen and Jensen, 2004) vient moduler négativement l'échange du peptide par HLA-DM (Denzin et al., 1997). Les complexes du CMH de classe II/peptides ainsi formés vont ensuite migrer vers la membrane plasmique de la cellule, où ils seront présentés aux lymphocytes T CD4⁺ qui pourront les reconnaître grâce à leur TCR (Garcia et al., 1999).

Les lymphocytes T CD4⁺, aussi appelés lymphocytes T auxiliaires, sont surtout reconnus pour leur rôle dans les réponses humorales entraînant une sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B. Toutefois, ils ont aussi un rôle d'aide dans la réponse à médiation cellulaire impliquant les CTL (Phan et al., 2003; Wong et al., 2004; Corthay et al., 2005). Plus précisément, les lymphocytes T CD4⁺ aident à générer et à maintenir la réponse immunitaire (Toes et al., 1999; Wang, 2001) en stimulant l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs et mémoires par la production de cytokines (Janssen et al., 2003; Shedlock and Shen, 2003), ce qui pourrait être un mécanisme critique dans l'immunité anti-tumorale.

La nature exacte de l'aide apportée par les lymphocytes T CD4⁺ aux lymphocytes T CD8⁺ reste encore à être clairement définie. Par contre, il a clairement été démontré qu'une réponse anti-tumorale optimale requiert la participation des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ (Velders et al., 2003; Gerloni and Zanetti M., 2005). Des stratégies doivent donc être développées pour optimiser la présentation des AT par les molécules du CMH de classe I et II et ainsi optimiser l'immunisation contre les cellules tumorales suite à l'amélioration des collaborations entre les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques.

Cependant, les lymphocytes T CD4⁺ n'ont pas uniquement une influence positive envers les lymphocytes T CD8⁺. En effet, les lymphocytes T CD4⁺

régulateurs (T_{reg}), aussi nommés lymphocytes T suppresseurs, qui représentent environ 1-2% de la population totale des lymphocytes T $CD4^+$ (Baecher-Allan et al., 2001), ont aussi un rôle significatif à jouer dans la réponse anti-tumorale considérant leur fonction immuno-régulatrice (Javala and Rosenberg, 2003; Wang et al., 2004). Ils ont une activité suppressive sur les fonctions effectrices des lymphocytes T $CD8^+$ (Piccirillo and Shevach, 2001; Murakami et al., 2002) et aussi des lymphocytes T $CD4^+$ (Annacker et al., 2001; Almeida et al., 2002). Ce qui suggère que la présentation antigénique par les molécules du CMH de classe II peut potentiellement avoir des conséquences tant positives que négatives sur l'immunité anti-tumorale.

1.2.4.2 Présentation croisée d'antigènes endogènes

Les molécules du CMH de classe II peuvent aussi présenter des protéines endogènes. Des études biochimiques portant sur la source des peptides antigéniques associés aux molécules du CMH de classe II ont, bien sur, révélé une prédominance pour les peptides dérivés de protéines exogènes, mais aussi de plusieurs protéines endogènes, dont des protéines de la membrane plasmique et parfois même des protéines cytoplasmiques (Rudensky et al., 1991; Chicz et al., 1993). Les premières évidences sur l'existence d'une voie endogène menant à la présentation par les molécules du CMH de classe II ont été démontrées par des études sur des protéines virales cytoplasmiques, synthétisées de façon endogène (Nuchtern et al., 1990; Jaraquemada et al., 1990).

Selon certaines études, les protéines endogènes pourraient transiter par la surface cellulaire avant d'atteindre la voie d'apprêtement endocytaire (Polydefkis et al., 1990; Griffin et al., 1997). Selon d'autres études, dont celles du groupe du Dr Eric Long portant sur les lymphocytes B modifiés, la présentation d'antigènes endogènes par les molécules du CMH de classe II serait indépendante de l'expression de la protéine TAP (Malnati et al., 1992) et du complexe du protéasome (Malnati et al., 1993). Ces protéines endogènes ne seraient donc pas apprêtées par la même voie cytosolique que les antigènes présentés par les

molécules du CMH de classe I. Cependant, la présentation de courtes séquences peptidiques, par les molécules du CMH de classe II, serait dépendante de la protéine TAP (Malnati et al., 1992), comme dans la voie d'apprêtement cytosolique. Par contre, il semblerait que la présentation d'antigènes endogènes par les molécules du CMH de classe II à la surface des cellules dendritiques serait plutôt dépendante de l'apprêtement par le protéasome et la protéine TAP (Tewari et al., 2005).

D'autres études suggèrent que l'apprêtement des protéines exogènes et endogènes pour la présentation par les molécules du CMH de classe II, pourrait avoir lieu via des voies plus ou moins similaires (Lich et al., 2000; Mukherjee et al., 2001). C'est-à-dire que l'apprêtement de certaines protéines endogènes pourrait dépendre de l'action des protéases cytoplasmiques, telles que le protéasome ou autres, mais suite à leur transport du cytoplasme vers les compartiments de la voie d'apprêtement endocytaire, les antigènes cytoplasmiques seraient possiblement aussi apprêtés par les mêmes enzymes protéolytiques que les antigènes exogènes, avant d'être présentés par les molécules du CMH de classe II.

Ces études semblent donc démontrer que l'apprêtement d'antigènes endogènes pour la présentation par les molécules du CMH de classe II pourrait se faire selon différents mécanismes, plus ou moins similaires à la voie d'apprêtement cytosolique pour la présentation par les molécules du CMH de classe I. En fait, la présentation d'antigènes endogènes par les molécules du CMH de classe II demeure encore un phénomène mal connu.

Généralement, seules les CPA expriment les molécules du CMH de classe II et seraient donc les seules à pouvoir présenter des antigènes par les molécules du CMH de classe II. Cependant, des études cherchant à développer de nouvelles stratégies de traitement par immunothérapie ont démontré que des cellules tumorales modifiées pour exprimer les molécules du CMH de classe II, pouvaient aussi présenter des antigènes endogènes par ces molécules (Ostrand-Rosenberg, 1994; Chen et al., 1994). De plus, certaines cellules tumorales peuvent en venir à exprimer

des molécules du CMH de classe II et ainsi présenter des protéines endogènes autant par les molécules du CMH de classe II que de classe I. D'ailleurs, environ 20-25% des mélanomes peuvent exprimer des molécules du CMH de classe II de façon constitutive durant leur processus de transformation (Lopez-Nevot et al., 1988) et même davantage lorsqu'il y a présence d'inflammation ou de métastases (Brocker et al., 1984; Bernsen et al., 2003). Il serait donc possible que la présentation antigénique de protéines endogènes par les molécules du CMH de classe I et de classe II influence une réponse anti-tumorale via des mécanismes positifs et négatifs. Il y aurait donc possiblement activation de lymphocytes T $CD8^+$ et $CD4^+$ au site de la tumeur, ce qui illustre davantage l'importance de bien définir la présentation de protéines endogènes par les molécules du CMH de classe II.

1.3 Approches ciblant les antigènes tumoraux (AT)

1.3.1 Caractéristiques des AT

Un des principes de l'immunothérapie est basé sur le fait que les cellules tumorales peuvent exprimer des protéines qui sont absentes ou faiblement exprimées dans les tissus normaux. Ces protéines, appelées antigènes tumoraux (AT), peuvent potentiellement être présentées par les molécules du CMH à la surface des cellules tumorales ou des CPA, et ainsi être reconnues par le TCR des lymphocytes T (Rosenberg, 1999; Boon et al., 1997). Une approche plus moderne de l'immunothérapie tumorale a donc été axée sur la stimulation d'une réponse immunitaire spécifique dirigée contre des AT, plutôt que sur la stimulation non spécifique du système immunitaire (par de hautes doses d'IL-2, par exemple) qui définissait les premières approches thérapeutiques.

Les AT sont des antigènes dont l'expression doit être spécifique aux cellules tumorales, donc idéalement absente des cellules normales. Il est important qu'ils soient immunogéniques, c'est-à-dire qu'ils aient la capacité d'être présentés par les molécules du CMH et d'être reconnus de façon spécifique par les lymphocytes T. De

plus, certains AT peuvent aussi être impliqués dans différentes étapes du processus de cancérisation, bien que ce ne soit pas absolument essentiel.

Par contre, peu d'AT identifiés jusqu'à maintenant possèdent toutes ces caractéristiques. En effet, plusieurs AT connus, et utilisés en clinique, sont aussi exprimés par des cellules normales, mais généralement dans des tissus moins importants pour la survie. C'est d'ailleurs le cas de nombreux antigènes du mélanome qui sont aussi exprimés dans les mélanocytes normaux (Albino and Houghton, 1985). Le ciblage de ces AT par le système immunitaire, lors d'un traitement par immunothérapie, provoque des effets secondaires auto-immuns mineurs chez les patients qui répondent positivement à ces traitements (Rosenberg and White, 1996). Cependant, ces effets secondaires peuvent souvent être contrôlés par l'administration d'agents immuno-suppresseurs faibles, tels que des stéroïdes.

1.3.2 Épitopes

Pour être reconnus par le système immunitaire, les AT doivent être présentés à la surface des cellules, sous forme de petits fragments ou peptides, aussi appelés épitopes, associés aux molécules du CMH. Les principaux critères déterminant le potentiel d'un bon épitope sont l'affinité avec laquelle il s'associe avec une molécule du CMH particulière, ainsi que l'avidité avec laquelle il est reconnu par des lymphocytes T spécifiques. Donc, puisque chacune des allèles du CMH ne lie de façon spécifique qu'un ensemble limité de peptides qui partagent des résidus conservés à des positions fixes, la caractérisation d'un AT doit être complétée par l'identification d'épitopes spécifiques présentés par différentes molécules du CMH. Idéalement, les AT devraient posséder plusieurs épitopes pouvant être présentés par différentes molécules du CMH et reconnus par des lymphocytes T spécifiques.

1.3.3 Génération de lymphocytes T spécifiques

Plusieurs techniques permettant l'expansion de lymphocytes T spécifiques à des AT ont été développées, soit à partir de lymphocytes du sang périphérique sensibilisés *in vitro* par des cellules tumorales (Rivoltini et al., 1995), ou directement à partir de TIL (Topalian et al., 1987; Itoh et al., 1988). Plusieurs de ces études ont effectivement démontré que les lymphocytes T pouvaient efficacement reconnaître des peptides antigéniques présentés par des molécules du CMH de classe I à la surface des cellules tumorales (Muul et al., 1987; Topalian et al., 1989). Plus tard, il a même été démontré qu'il pouvait aussi y avoir reconnaissance d'AT présentés par les molécules du CMH de classe II (Topalian, 1994; Topalian et al., 1994b; Topalian et al., 1996).

1.3.4 Identification des AT

Il existe différentes approches permettant d'identifier des AT et des épitopes présentés par les molécules du CMH (Boon, 1993; Rosenberg, 1996).

Les travaux de Boon et ses collègues ont été une première entrée dans les méthodes d'identification d'AT reconnus par les lymphocytes T. D'abord, l'isolation de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à une mutation d'un seul acide nucléique dans un gène de souris (De Plaen et al., 1988) a été un des événements marquants dans l'histoire de l'immunothérapie tumorale. Par la suite, en 1991, il y a aussi eu l'identification du tout premier AT humain reconnu par les lymphocytes T d'un patient atteint du mélanome, la protéine MAGE-1 (*melanoma-associated gene-1*) (Van Der Bruggen et al., 1991). C'est par des techniques de biologie moléculaire, à l'aide de banques d'ADNc de gènes d'expression de cellules tumorales et de clones de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques, que le clonage de ces gènes a pu être réalisé (Traversari et al., 1992).

Par la suite, d'autres méthodes alternatives ont été exploitées pour permettre l'identification de nouveaux AT. D'abord, il y a eu l'élaboration de méthodes reposant sur des approches biochimiques. Une méthode impliquant, entre autres, l'extraction de peptides antigéniques associés aux molécules du CMH de classe I, exprimées à la surface des cellules tumorales (Hunt et al., 1992; Cox et al., 1994). L'immunogénicité de ces peptides était ensuite analysée, par leur présentation par des CPA à des lymphocytes T. L'identification des AT candidats était ensuite finalisée par la purification et le séquençage de ces peptides.

Une autre méthode ciblant l'expression d'antigène par les cellules tumorales a aussi été utilisée avec succès pour identifier des AT (Kawashima et al., 1998). Cette méthode implique des techniques de sensibilisation *in vitro* utilisées pour générer des lymphocytes T réactifs contre des AT candidats, qui sont ensuite évalués pour leur habilité à reconnaître spécifiquement des cellules tumorales (Parkhurst, 1998).

Plus récemment, d'autres approches ont été développées de façon à pouvoir aussi caractériser des épitopes présentés par les molécules du CMH de classe II par les CPA, et reconnus par les lymphocytes T CD4⁺. Une percée qui a préparé le chemin à des vaccins plus efficaces pour l'immunothérapie tumorale (Topalian et al., 1994a). Plusieurs techniques ont d'ailleurs été utilisées, incluant l'extraction de peptides à la surface des cellules tumorales (Halder et al., 1997) ou la purification biochimique de lysats de cellules tumorales (Monach et al., 1995; Pieper et al., 1999). L'immunogénicité de ces peptides ou protéines était ensuite analysée, par leur présentation par des CPA à des lymphocytes T CD4⁺.

En utilisant l'une ou l'autre de ces approches, plusieurs nouveaux AT reconnus par les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ spécifiques ont été décrits (Kawakami and Rosenberg, 1996; Castelli et al., 2000), en grande majorité chez le mélanome.

1.3.5 Classification des AT selon leur profil d'expression

Il existe plus d'une façon de classer les AT. Je vous présente, ici, une classification selon le profil d'expression des AT et quelques exemples spécifiques reliés au mélanome, résumé dans le Tableau 1.

1.3.5.1 Antigènes exprimés exclusivement dans les tumeurs

Certains AT proviennent de gènes dont l'expression est retrouvée exclusivement dans les cellules tumorales, et donc absente des tissus normaux. Ce groupe comprend entre autres, des gènes ayant subis des mutations reliées aux processus carcinogènes, comme dans les cas des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur, ou des peptides codés par une séquence en intron d'un gène normal (Guilloux et al., 1996). Ce groupe peut aussi inclure des gènes viraux présents dans certains cancers à origine virale. En effet, certains types de cancer expriment des antigènes spécifiques aux virus ayant infecté ces cellules et induit le cancer, et peuvent stimuler une réponse cytotoxique contre ces protéines virales, entre autres dans des lymphomes induits par le virus Epstein Barr (EBV) (Lee et al., 1997), ou les cancers causés par le papillomavirus humain (Todd et al., 2004). Ces AT se retrouvent dans très peu de cancers. Cependant, puisque ce sont des gènes absents des cellules normales ou d'origine virale, le système immunitaire devrait être moins tolérant envers ces protéines, il devrait donc être plus facile de stimuler une réponse immunitaire.

1.3.5.2 Antigènes dont l'expression est partagée avec d'autres tissus

1.3.5.2.1 Protéines mutées

Les mutations produites dans des gènes de cellules tumorales peuvent parfois permettre la présentation d'épitopes différents. Par exemple, un nouvel épitope dans le gène de la β -caténine a été identifié suite à une mutation ponctuelle dans le gène,

Classification des AT selon leur profil d'expression

Groupes	Antigènes
Antigènes exprimés exclusivement dans les tumeurs	
<ul style="list-style-type: none"> • Oncogènes • Gènes suppresseurs de tumeur • Gènes codés par des séquences en intron • Protéines virales 	
Antigènes dont l'expression est partagée avec d'autres tissus	
<ul style="list-style-type: none"> • Protéines mutés 	<ul style="list-style-type: none"> β-catenine
<ul style="list-style-type: none"> • Protéines de cellules germinales 	<ul style="list-style-type: none"> MAGE GAGE BAGE
<ul style="list-style-type: none"> • Protéines spécifiques à certains tissus 	<ul style="list-style-type: none"> gp100 tyrosinase TRP-1 et TRP-2 MART-1/Melan-A

Tableau 1 Classification des AT selon leur profil d'expression

dans des cellules de mélanomes (Robbins et al., 1996). Généralement, ces épitopes sont spécifiques aux cellules tumorales du patient et ne devraient donc pas être tolérés par le système immunitaire, ils pourraient donc être d'excellents AT potentiels. Cependant, il semble que ces AT ne soient pas suffisamment efficaces pour déclencher une réponse immunitaire envers les cellules tumorales. De plus, il n'y a que très peu d'AT, dérivant de protéines mutées, qui ont été identifiés jusqu'à maintenant (Boon and Van Der Bruggen, 1996; Rosenberg, 1999), et ils ne sont donc pas très appropriés pour le traitement d'un grand nombre de patients.

1.3.5.2.2 Protéines de cellules germinales

Certaines protéines exprimées essentiellement par des cellules germinales peuvent éventuellement être exprimées dans les cellules tumorales. Cette famille de gènes a d'ailleurs été identifiée dans plusieurs différents types de cancer. Par exemple, les antigènes de la famille MAGE, GAGE et BAGE, d'abord identifiés chez le mélanome (Van Den Eynde et al., 1995), ont aussi été détectés dans d'autres cancers, tel le cancer du sein (Otte et al., 2001), le cancer des ovaires (Russo et al., 1996), le cancer du cerveau (Scarcella et al., 1999) et bien d'autres. Puisque ces antigènes sont surtout exprimés dans des sites privilégiés, donc souvent ignoré par le système immunitaire, ils pourraient potentiellement être de bons AT. Cependant, ils n'ont démontré qu'une faible immunogénicité *in vitro* et *in vivo* (Chaux et al., 1998).

1.3.5.2.3 Protéines spécifiques à certains tissus

Certaines protéines spécifiques à des tissus peuvent être considérées comme des AT. C'est le cas de plusieurs antigènes du mélanome, dont MART-1/Melan-A (Kawakami et al., 1994a), gp100 (Kawakami et al., 1994b), la protéine tyrosinase (Kang et al., 1995) ainsi que les protéines reliées à tyrosinase, TRP-1 (*tyrosinase-related protein-1*) (Wang et al., 1996b) et TRP-2 (Wang et al., 1996a). Ces protéines sont également retrouvées dans les mélanocytes normaux où elles sont impliquées dans la biosynthèse de la mélanine. Leur efficacité comme AT pourrait être

dans la biosynthèse de la mélanine. Leur efficacité comme AT pourrait être considérée comme sous-optimale puisqu'elles ont déjà suscité une certaine tolérance auprès du système immunitaire. Il y a par contre de nombreux exemples qui démontrent l'immunogénicité de ces AT : des démonstrations de la présence de TIL spécifiques à tyrosinase chez des patients atteints du mélanome (Robbins et al., 1994), des essais *in vitro* où il a été possible de générer des lignées de lymphocytes spécifiques à des peptides de MART-1/Melan-A capables de reconnaître et de lyser des cellules tumorales (Rivoltini et al., 1995). De plus, des essais cliniques ont démontré qu'il était possible d'engendrer une régression tumorale par un transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques à des peptides de gp100, jumelé à une administration d'IL-2 (Kawakami et al., 1995). Certains des patients traités ont même ressenti des manifestations d'auto-immunités, soit une dépigmentation de la peau, appelée vitiligo. Ces symptômes semblent d'ailleurs corrélés avec un meilleur pronostic et parfois une réponse complète au traitement, soit la disparition de la tumeur (Bystryn et al., 1987; Rosenberg and White, 1996).

1.3.6 Immunogénicité

Une autre caractéristique importante des AT est leur immunogénicité, c'est-à-dire la capacité du système immunitaire à réagir contre ces antigènes, soit en induisant des réponses immunitaires humorales ou à médiation cellulaire. La réponse dite humorale implique les lymphocytes T CD4⁺ et résulte en une production d'anticorps par les lymphocytes B. La réponse à médiation cellulaire ou réponse cytotoxique fait surtout appel aux lymphocytes T CD8⁺, qui lysent directement les cellules cibles.

Une des approches utilisées en immunothérapie tumorale consiste à solliciter une réponse à médiation cellulaire dirigée contre des AT, impliquant principalement les lymphocytes T CD8⁺. Par contre, les modèles *in vitro* impliquant uniquement les lymphocytes T CD8⁺ sont trop simplistes et très peu réalistes. En effet, *in vivo*, ils subissent énormément d'influences de la part des autres cellules du système

immunitaire. D'une part, leur activité est modulée par une influence positive des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires (Phan et al., 2003; Wong et al., 2004; Corthay et al., 2005), mais aussi par une certaine influence négative des T_{reg} (Piccirillo and Shevach, 2001; Murakami et al., 2002). D'autres part, les autres cellules du système immunitaire peuvent aussi avoir une certaine influence sur les lymphocytes T CD8⁺, entre autres par la production de différentes cytokines, pouvant modifier leur activité anti-tumorale (Blankenstein, 2005).

1.4 Mélanome

Le mélanome est un type de cancer de la peau, qui dérive des mélanocytes (cellules pigmentées). Il peut apparaître tant chez l'homme que chez la femme, toutefois les personnes de race blanche, à la peau claire et aux yeux bleus sont plus à risque de le développer. Il existe aussi un certain facteur héréditaire, mais le principale facteur déclenchant est l'exposition excessive au soleil. Pour 2005, on estime à 4 400, le nombre de nouveaux cas de mélanome et à 20%, le taux de décès (Société canadienne du cancer, 2005).

L'évolution d'un mélanome peut être très sévère, par sa forte prédisposition aux métastases et à la récurrence. De plus, malgré qu'il ait été rapporté dans certaines études, que 50-70% des tumeurs semblaient répondre à la chimiothérapie, celle-ci a très peu d'impact sur la survie générale des patients. La résistance de ces cellules tumorales à la chimiothérapie a mené au développement de traitements alternatifs, dont l'immunothérapie.

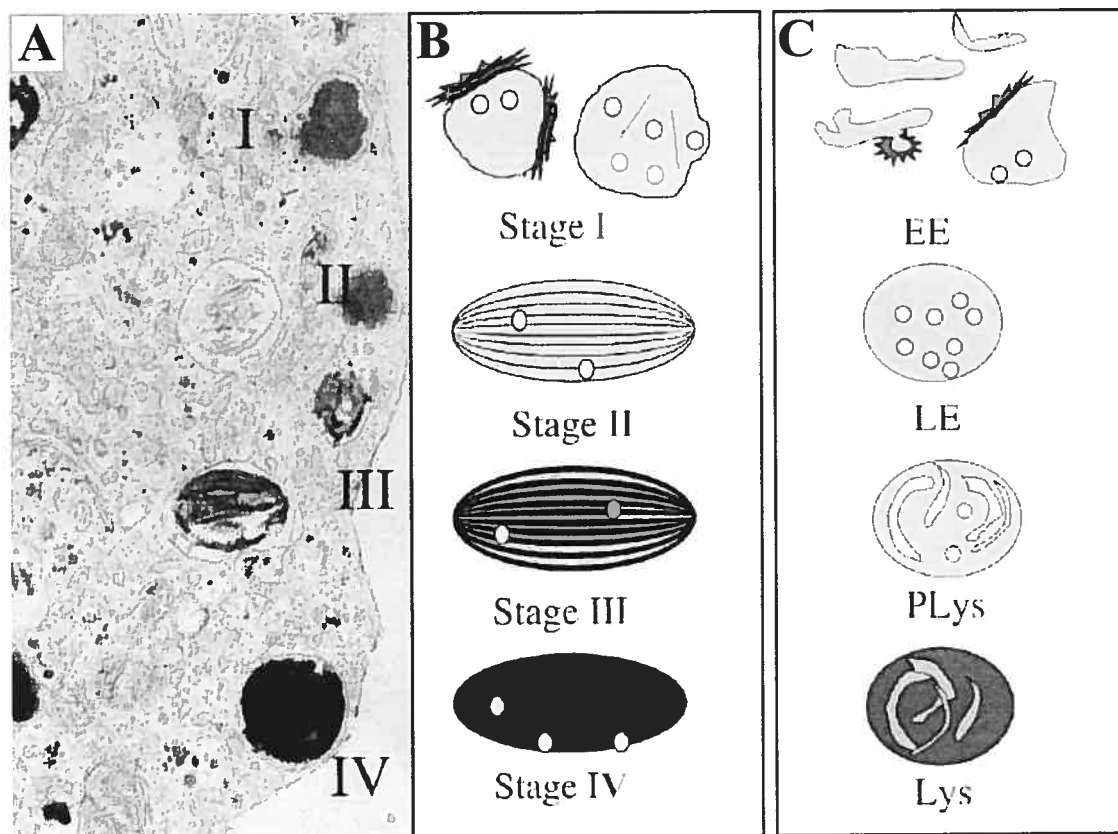
Le mélanome a d'abord été considéré comme un cancer immunologique, suite à des observations cliniques démontrant que des lésions primaires pouvaient régresser spontanément et que cette régression corrélait avec une infiltration de lymphocytes dans la tumeur (Clemente et al., 1996). Par la suite, des études sur l'aspect fondamental de la biologie des lymphocytes T et de la présentation antigénique ont mené à l'identification d'un grand nombre d'antigènes associés au mélanome et au

développement de plusieurs stratégies d'immunothérapie tumorale (Nestle et al., 1999).

1.4.1 Mélanosomes

Les mélanosomes sont des compartiments intracellulaires spécialisés retrouvés uniquement à l'intérieur des mélanocytes, d'où est synthétisée, stockée et sécrétée la mélanine (Marks and Seabra, 2001). Plus spécifiquement, les mélanosomes servent de vésicules sécrétrices, facilitant le transfert de la mélanine des mélanocytes vers les kératinocytes voisins et la génération de la pigmentation caractéristique de la peau et des cheveux (King et al., 1995).

Les mélanosomes font partie de la grande famille des compartiments reliés aux lysosomes (Raposo et al., 2002), comme les compartiments de la voie des endosomes et les compartiments de la voie d'apprêtement endocytaire, les MIIC. Ils partagent donc certaines caractéristiques structurelles et physiologiques avec les lysosomes, dont la présence de protéines lysosomiales (Orlow, 1995) et un pH acide (Bhatnagar et al., 1993). De plus, comme les compartiments de la voie des endosomes, les mélanosomes peuvent être divisés en différents stades selon leurs caractéristiques de maturation (Seiji et al., 1963) (voir Figure 3). Le stade précoce, le prémélanosome stade I, est sans pigmentation et d'une morphologie très similaire aux endosomes, c'est-à-dire une structure membranaire avec une quantité variable de membranes internes. La distinction entre les deux systèmes devient plus évidente à partir du prémélanosome stade II. Sa structure devient plus elliptique et parcourue de fibres allant d'une extrémité à l'autre produisant une apparence striée. C'est sur ces fibres que sera déposée la mélanine nouvellement synthétisée, résultant en une striation plus noire et plus épaisse dans le mélanosome stade III, jusqu'à en remplir l'ensemble interne de la structure dans le mélanosome stade IV.



(Raposo and Marks, 2002) Traffic

Figure 3 Les différents stades de maturation des mélanosomes

A. Microscopie électronique d'une cellule de mélanome, illustrant les quatre stades de maturation des mélanosomes.

B. Représentation schématique de chacun des quatre stades de maturation des mélanosomes et de leur caractéristique morphologique, tels que décrits dans le texte.

C. Représentation schématique des compartiments de la voie des endosomes, en comparaison avec différents stades de maturation des mélanosomes.

Légende : EE: endosomes précoces; LE: endosomes tardifs; PLys: prélysosomes; Lys: lysosomes

1.4.2 Protéines partagées entre mélanocytes et mélanomes

1.4.2.1 Protéines des mélanosomes

En plus des protéines lysosomiales, les mélanosomes contiennent aussi des protéines exclusives, dont la plupart sont impliquées dans la biosynthèse de la mélanine, telles que la protéine tyrosinase, les protéines reliées à tyrosinase (TRP-1 et TRP-2) et gp100 (Hearing and Tsukamoto, 1991; Kwon, 1993; Sharma et al., 2002). Les protéines tyrosinase, TRP-1 et TRP-2 semblent être davantage enrichies dans les stades plus tardifs des mélanosomes (Orlow et al., 1993; Raposo et al., 2001) où elles sont impliquées directement dans la synthèse de la mélanine. Alors que gp100, aussi connu sous le nom de Pmel17, semble plutôt être enrichi préférentiellement dans les prémélanosomes (Lee et al., 1996; Raposo et al., 2001), et est plus spécifiquement impliqué dans la maturation des mélanosomes (Kushimoto et al., 2001; Berson et al., 2001). Une autre protéine, MART-1/Melan-A, d'abord clonée en tant qu'AT du mélanome (Kawakami et al., 1994a; Kawakami et al., 1997), est aussi une protéine des mélanosomes, mais sa fonction exacte reste encore inconnue.

1.4.2.2 Antigènes du mélanome

Le mélanome étant le cancer dérivé des mélanocytes, les cellules de mélanomes possèdent donc aussi des mélanosomes. C'est pourquoi les protéines des mélanosomes sont aussi considérées comme des antigènes spécifiques du mélanome (Sakai et al., 1997; Overwijk and Restifo, 2000) reconnus par des lymphocytes T (Kawakami, 1996) et pouvant être utilisés dans diverses stratégies d'immunothérapie tumorale (Kawakami, 1998). D'ailleurs, le mélanome est un cancer relativement immunogénique, pour lequel plusieurs études ont démontré l'implication des lymphocytes T dans la régression des mélanomes (Kawakami et al., 2000b; Wang et al., 2002; Dudley et al., 2002).

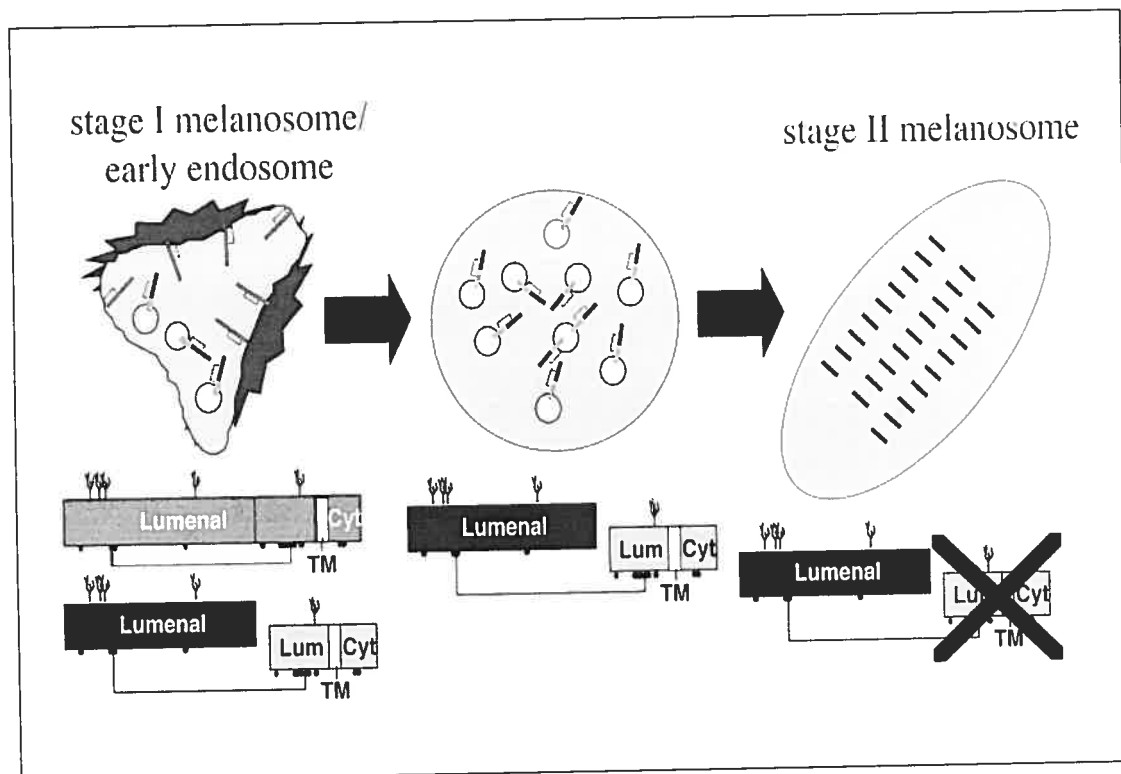
Les protéines des mélanosomes sont d'ailleurs reconnues pour être des AT particulièrement immunogéniques, puisque de nombreux TIL spécifiques à ces protéines ont été isolés chez plusieurs patients atteints du mélanome. De plus, plusieurs épitopes présentés par les molécules du CMH de classe I ont été identifiés dans ces protéines (Kawakami et al., 1998; Kawakami et al., 2000a).

Curieusement, quelques épitopes présentés par les molécules du CMH de classe II ont aussi été identifiés dans certaines de ces protéines, dont la protéine tyrosinase (Topalian et al., 1996), gp100 (Touloukian et al., 2000; Lapointe et al., 2001), TRP-1 et TRP-2 (Robbins et al., 2002). Ceci suggère que les mélanosomes pourraient possiblement jouer un rôle dans la présentation de ces antigènes par les molécules du CMH de classe II (Marks et al., 2003), puisqu'ils ont des caractéristiques très similaires aux compartiments de la voie endocyttaire et aux MIIC.

1.4.2.2.1 Gp100

Gp100 est une protéine de différenciation des mélanocytes, impliquée dans la maturation des mélanosomes, plus précisément dans la transition du prémélanosome stade I en prémélanosome stade II (Kushimoto et al., 2001; Berson et al., 2001), où gp100 est impliqué dans l'initiation de la formation des striations où s'accumulera la mélanine nouvellement synthétisée (Kobayashi et al., 1994; Berson et al., 2001).

La protéine gp100 est initialement traduite en une protéine native de 70 kDa, comprenant une séquence signal en amino-terminal qui permet sa prise en charge par le RE, où elle est glycosylée en sa forme mature de 100 kDa (Yasumoto et al., 2004). Elle est ensuite fractionnée en petits fragments, qui vont s'associer avec les membranes intracellulaires des prémélanosomes pour former la matrice sur laquelle sera déposée la mélanine (Berson et al., 2001; Berson et al., 2003) (voir Figure 4).



(Raposo and Marks, 2002) Traffic

Figure 4 Formation des striations à l'intérieur des prémélanosomes

Représentation schématique illustrant la présence de gp100 dans les prémélanosomes stade I (ou les endosomes) et dans les prémélanosomes stade II, et structure de la protéine gp100 native et ses intermédiaires correspondant à chaque stade de maturation des prémélanosomes.

Gp100 a aussi été identifié comme un antigène spécifique du mélanome, pouvant être reconnu par des lymphocytes T (Kawakami et al., 1994b; Bakker et al., 1994). Son expression est retrouvée dans plus de 75% des mélanomes (Cormier et al., 1998), il a donc été largement étudié et couramment utilisé dans différentes stratégies d'immunothérapie tumorale chez des patients atteints du mélanome.

1.4.2.2.2 Présentation de gp100 par les molécules du CMH de classe I

Plusieurs épitopes de gp100 présentés par les molécules du CMH de classe I et reconnus par des lymphocytes T CD8⁺ ont été identifiés jusqu'à maintenant, dont 3 en particulier, gp100₁₅₄₋₁₆₂ (Skipper et al., 1996a; Kawakami et al., 1995) gp100₂₀₉₋₂₁₇ (Kawakami et al., 1995) et gp100₂₈₀₋₂₈₈ (Bakker et al., 1995; Kawakami et al., 1995) présenté par HLA-A*0201. De plus, des TIL spécifiques à ces épitopes ont fréquemment été isolés chez des patients (Kawakami et al., 2000a).

Certaines études ont démontré qu'il était possible de générer des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à gp100, à partir de lymphocytes du sang périphérique de patients HLA-A*0201 en les stimulant avec l'un ou l'autre de ses peptides (Salgaller et al., 1995). Par contre, il faut parfois plus d'un cycle de stimulation avant d'obtenir une population de lymphocytes T réactives, et la génération d'une activité cytotoxique spécifique peut parfois s'avérer impossible avec certains patients. De plus, ces peptides semblent faiblement immunogéniques, comparativement à des peptides dérivant d'antigènes viraux. Ceci peut s'expliquer en partie par la faible affinité de ces épitopes pour la molécule du CMH de classe I HLA-A*0201 (Kawakami et al., 1995). Toutefois, l'immunogénicité de ces peptides a pu être améliorée en modifiant certains acides aminés aux positions d'ancrage avec le CMH, afin d'en augmenter l'affinité envers la molécule HLA-A*0201.

Des essais de stimulation ont donc été réalisés avec des peptides modifiés, dont les peptides gp100₂₀₉₋₂₁₇-2M, où le 2^e acide aminé a été remplacé par une méthionine, et gp100₂₈₀₋₂₈₈-9V, où le 9^e acide aminé a été remplacé par une valine

(Parkhurst et al., 1996). L'utilisation de ces peptides modifiés a permis la génération *in vitro* de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de façon beaucoup plus efficace qu'avec les peptides natifs. Des essais cliniques ont aussi démontré que la vaccination avec les peptides modifiés entraînait une augmentation de la fréquence des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques anti-gp100 *in vivo* plus marquée qu'avec les peptides natifs (Rosenberg, 1996; Rosenberg et al., 1998). De plus, les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques ainsi générés reconnaissent les peptides natifs aussi bien que les peptides modifiés. Ces résultats ont d'ailleurs mené à l'utilisation de ces peptides modifiés dans des stratégies d'immunothérapie tumorale chez des patients atteints de mélanome.

D'autres épitopes de gp100 ont aussi été identifiés, dont gp100₆₁₉₋₆₂₇ et gp100₆₃₉₋₆₄₇ (Kawakami et al., 1998) présentés par HLA-A*0201, gp100₁₇₋₂₅ (Skipper et al., 1996b) et gp100₆₁₄₋₆₂₂ (Kawakami et al., 1998) présentés par HLA-A*0301, et gp100₇₁₋₇₈ (Castelli et al., 1999) présenté par HLA-Cw*0801.

1.4.2.2.3 Présentation de gp100 par les molécules du CMH de classe II

Alors que le principal intérêt de l'immunothérapie tumorale était surtout axé sur les lymphocytes T CD8⁺, plusieurs groupes ont démontré que les lymphocytes T CD4⁺ avaient également un rôle critique à jouer dans la réponse immunitaire anti-tumorale (Pardoll and Topalian, 1998; Wang et al., 2002). Des épitopes présentés par les molécules du CMH de classe II et reconnus par des lymphocytes T CD4⁺ ont aussi été identifiés chez gp100, dont gp100₄₄₋₅₉ (Touloukian et al., 2000) et gp100₆₁₅₋₆₃₃ (Kierstead et al., 2001) présentés par HLA-DRβ1*0401, ainsi que gp100₁₇₀₋₁₉₀ (Lapointe et al., 2001) présenté par HLA-DRβ1*0701.

De plus, certains de nos résultats précédents ont suggéré que même la forme endogène de gp100 pouvait être présentée par les molécules du CMH de classe II et ainsi stimuler des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques (Lapointe et al., 2001; Lapointe et al., 2004). Il serait donc possible que gp100 puissent atteindre les compartiments

de la voie d'apprêtement endocytaire de l'intérieur de la cellule pour ainsi être présenté par les molécules du CMH de classe II. Ce qui suggère également que la séquence de gp100 pourrait posséder un ou des motifs spécifiques permettant une mobilisation vers les compartiments de la voie d'apprêtement endocytaire. D'ailleurs, de tels motifs ont déjà été identifiés chez d'autres antigènes du mélanome (Wang et al., 1999), dont un motif di-leucine présent en carboxy-terminal de la protéine tyrosinase (Simmen et al., 1999; Calvo et al., 1999). Ce motif se retrouve aussi chez d'autres glycoprotéines présentes dans les mélanosomes (Le Borgne et al., 2001).

1.5 Hypothèse et objectifs du projet de maîtrise

Lors d'un traitement par immunothérapie, les AT sont utilisés comme cibles pour solliciter une réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses. Pour amplifier cette réponse, il faudrait être en mesure de stimuler à la fois les lymphocytes T CD8⁺ par le biais des molécules du CMH de classe I, et les lymphocytes T CD4⁺ par le biais des molécules du CMH de classe II.

Gp100 présente donc un avantage certain, puisqu'il a la capacité d'être présenté à la fois par les molécules du CMH de classe I et de classe II, lorsqu'il est exprimé de façon endogène. De plus, ceci évoque que gp100 peut atteindre les compartiments de la voie d'apprêtement endocytaire, les MIIC, pour ainsi être présenté par les molécules du CMH de classe II. Notre hypothèse est donc que gp100 possède des séquences particulières impliquées dans sa mobilisation vers les MIIC et sa présentation par les molécules du CMH de classe II.

Mon projet de maîtrise concerne donc l'étude de la présentation de gp100 endogène par les molécules du CMH de classe II, et par le fait même, sa mobilisation vers les compartiments de la voie d'apprêtement endocytaire et les MIIC. Le principal objectif étant d'identifier des motifs de gp100 qui permettent cette mobilisation et cette présentation, et d'en faire un outil pour favoriser la présentation par les molécules du CMH de classe II, de différents antigènes.

Des expériences préliminaires ont permis de localiser une région critique pour la mobilisation de gp100 vers les endosomes/MIIC et la présentation par les molécules du CMH de classe II. La séquence signal en amino-terminal et les 70 derniers acides aminés en carboxy-terminal de gp100 ont été fusionnés à la Protéine Fluorescente Verte (GFP), pour en évaluer la localisation en microscopie confocale. Par la suite, différentes versions du gène de gp100 (délétées dans la partie 3' codant pour la portion en carboxy-terminal) ont été préparées par réaction PCR, clonées dans un vecteur d'expression eucaryote et transfectées dans des cellules 293T exprimant des molécules du CMH de classe I et de classe II, pour évaluer la présentation à l'aide de clones de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques à des épitopes de gp100.

Les motifs de mobilisation de gp100 pourront éventuellement être exploités pour l'amélioration de vecteurs d'expression utilisés en immuno-oncologie. Plus spécifiquement, ces motifs pourront être greffés à d'autres AT pour favoriser une double présentation par les molécules du CMH de classe I et de classe II. De plus, une fois intégrés à d'autres AT, ils pourront constituer un outil avantageux pour identifier de nouveaux épitopes présentés par les molécules du CMH de classes II.

CHAPITRE 2. **Melanosomal targeting sequences from gp100 are essential for MHC class II-restricted endogenous epitope presentation and mobilization to endosomal compartments**

Stéphanie Lepage and Réjean Lapointe

Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) –
Hôpital Notre Dame, Université de Montréal and Institut du Cancer de Montréal,
Montréal, Québec, Canada

Running title: MHC class II-mediated presentation of endogenous gp100

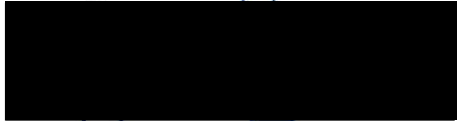
Keywords: gp100; antigen presentation; MHC class II compartments (MIIC); CD4⁺
T lymphocytes, endosomal trafficking

Article en révision, resoumis pour publication à:

Cancer Research, novembre 2005

* S. Lepage est responsable de la totalité de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article. R. Lapointe a supervisé l'ensemble de l'étude.


Stéphanie Lepage


Dr Réjean Lapointe
Directeur de recherche

Abstract

CD4⁺ T lymphocytes play an important role in CD8⁺ T cell-mediated responses against tumors. Considering that about 20% of melanomas express major histocompatibility complex (MHC) class II, it is plausible that concomitant presentation by MHC class I and class II shapes positive (helper T cells) or negative (regulatory T cells) anti-tumor responses. Interestingly, gp100, a melanoma antigen, can be presented by both MHC class I and class II when expressed endogenously, suggesting that it can reach endosomal/MHC class II compartments (MIIC). Here, we demonstrated that gp100 putative amino-terminal signal sequences and the last 70 residues in carboxy-terminus, are essential for MIIC localization and MHC class II presentation. Confocal microscopy analyses confirmed that gp100 was localized in LAMP-1⁺/HLA-DR⁺ endosomal/MIIC. Gp100-targeting sequences were characterized by deleting different sections in the carboxy-terminus (last 70 residues). Transfection in 293T cells, expressing MHC class I and class II molecules, revealed that specific deletions in carboxy-terminus resulted in decreased MHC class II presentation, without effects on class I presentation, suggesting a role in MIIC trafficking for these deleted sections. Then, we used these gp100-targeting sequences to mobilize GFP to endosomal compartments, and to allow MHC class II and class I presentation of minimal endogenous epitopes. We conclude that these specific sequences are MIIC-targeting motifs, which could be included in expression cassettes for endogenously-expressed tumor or viral antigens for MHC class II and class I presentation and optimize *in vivo* T cell responses, or as an *in vitro* tool for characterization of new MHC class II epitopes.

Introduction

Cancer immunotherapy strategies targeting tumor antigens (TA)¹ were mainly developed by eliciting CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. Over the past decade, growing evidence has emerged from animal studies (1-3) and clinical trials (4, 5), indicating that CD4⁺ helper T lymphocytes play an important role in initiating and maintaining immune responses against cancer (6, 7) by expanding effective and memory CD8⁺ T cells (8, 9). Thus, optimal anti-tumor immunity might require the participation of both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes to generate a strong and durable response against cancer cells (10, 11). However, a subset of CD4⁺ T cells, defined as regulatory T lymphocytes (T_{reg}) and representing 1-2% of the total CD4⁺ T cell population (12), also may play a significant role in human cancer considering their cognate immuno-regulatory functions (13, 14). T_{reg} have suppressive activities on effective CD8⁺ (15, 16) and CD4⁺ (17, 18) T cell functions, suggesting that major histocompatibility complex (MHC) class II-mediated antigen presentation can potentially be either positive or detrimental in anti-tumor immunity.

Considering that about 20-25% of melanomas naturally express MHC class II molecules during the process of malignant transformation (19), and perhaps more than 50% during inflammation and metastases formation (20, 21), it is plausible that concomitant antigenic presentation by MHC class I and class II shapes anti-tumor responses mediating both positive and negative mechanisms. Thus, activation of tumor-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells may occur at the tumor site. This illustrates the importance of better defining MHC class II antigenic presentation from endogenously-expressed proteins.

Interestingly, gp100, a melanoma/melanocyte-shared antigen, can be presented by both MHC class I and class II molecules when expressed endogenously by melanoma and non-melanoma cells. This implies that gp100 can reach endosomal/MHC class II compartments (MIIC) for antigen processing and presentation by MHC class II. Normally, CD4⁺ T cells recognize exogenous proteins, which are ingested by antigen-presenting cells (APC) and get degraded into peptides which can be coupled with MHC class II molecules in MIIC, which are lysosome-related organelles (22). These peptide/MHC class II complexes then migrate to the cell surface. Interestingly, an endogenous protein can sometimes reach endosomal/MIIC to be processed similarly to an exogenous protein for MHC class II-mediated presentation. However, endosomal/MIIC internal trafficking leading to MHC class II presentation remains poorly understood.

We previously generated a CD4⁺ T cell clone specific to gp100 by using retrovirally-transduced dendritic cells (23), indicating plausible MHC class II presentation. We also demonstrated that this gp100-specific CD4⁺ T cell clone could recognize melanoma cell lines (24), which evoked potential targeting sequences in gp100 for MHC class II-mediated presentation.

In the current work, we prepared different deletions in the gp100 sequence to 1) assess MHC class I and class II-mediated presentation, and 2) evaluate endosomal protein localization, with the aim of finding sequences, within gp100, involved in these processes. We first confirmed gp100 presentation by MHC class II molecules in gp100-transfected 293T cells, and its endosomal mobilization. Our data demonstrate that both the carboxy-terminal (last 70 residues) and putative amino-terminal signal sequences are essential for MHC class II-mediated presentation of endogenous

gp100, and other antigens. Our results also suggest that gp100 may transit to the cell surface to be internalized in endosomal/MIIC.

A better understanding of the MHC class II presentation of endogenous antigens may help us to optimize the immune response directed to gp100 or other TA, in cancer immunotherapy.

Materials and Methods

Media and cell culture

Complete medium consisted of AIM-V medium (Invitrogen; Carlsbad, CA) supplemented with 5% human AB serum (heat-inactivated; Gemini Bio-Products; Calabasas, CA), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 10 µg/ml gentamicin (all from Invitrogen). A gp100-specific CD4⁺ T cell clone, HLA-DRβ1*0701-restricted (23) and a CD8⁺ T cell clone, HLA-A*0201-restricted (25) were cultured as described previously in complete medium supplemented with 300 IU/ml recombinant human Interleukin (IL)-2 (Chiron; Emeryville, CA).

CD40-stimulated B lymphocytes (CD40-B) were cultured as described previously (26) in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Invitrogen; and Wisent; St-Bruno, Quebec, Canada) supplemented with 10% human serum (heat-inactivated, prepared from normal donors), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 10 µg/ml gentamicin, 500 ng/ml of a soluble trimeric CD40L (Immunex Corporation; Seattle, WA) and 500 U/ml recombinant human IL-4 (Peprotech; Rocky Hill, NJ).

HEK-293T cells expressing HLA-DRβ1*0701 or DRβ1*0401, kindly provided by Dr. Paul F. Robbins and Dr. Suzanne L. Topalian (NCI/NIH; Bethesda, MD), and HEK-293T cells expressing HLA-A*0201 were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen and Wisent) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Invitrogen and Wisent), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 10 µg/ml gentamicin.

The melanoma cell line MelFB, which was immuno-selected for the absence of gp100 and MART-1, was transduced by retroviral vectors encoding gp100 or green fluorescent protein (GFP), as described previously (23). Melanoma cell lines 1087mel, 624.38mel, 624.38mel-CIITA, 1088mel, 1102mel, 1300mel, 397mel, 553mel and SK23mel were established at the Surgery Branch (NCI/NIH). Breast tumor cell lines MCF-7 and MDA231 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA). All tumor cell lines were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 10 µg/ml gentamicin.

Gp100 mutants and other plasmids

Plasmids encoding HLA-A*0201 and A*0101 (pcDNA-A2 and CLNCx-A1 respectively), kindly supplied by Dr. Paul F. Robbins, were cloned from HLA-typed patients, at the NIH. Plasmid encoding gp100 (pcDNA-gp100) also was gifted by Dr. Paul F. Robbins (NCI/NIH).

Plasmids encoding the different versions of gp100, deleted in the carboxy-terminus or amino-terminus (presented in Figure 3-A (left panel)), were prepared by PCR from the wild type sequence, cloned in pcDNA3.1, and their sequences were confirmed by sequencing. PcDNA-gp100 Δ TM was internally deleted from residues 594 to 615, which corresponded to the transmembrane domain, and pcDNA-gp100 Δ LL was deleted from residues 650 to the end, which corresponded to a putative di-leucine motif. These latter 2 constructs were prepared by Dr. Paul F. Robbins at the Surgery Branch (NCI/NIH). PcDNA-gp100TM was deleted from residue 615 to the end; and pcDNA-gp100NoTM, from residue 594 to the end.

PcDNA-gp100 Δ SS was deleted from residues 1 to 20, which corresponded to the putative amino-terminal signal sequence. PcDNA-gp100 Δ YV was deleted from residues 616 to 627, which corresponded to a sequence including a tyrosine residue. In pcDNA-gp100CD8, the gp100-transmembrane domain (residues 594 to 615) was exchanged with the CD8-transmembrane domain (residues 183 to 204 of CD8 sequence). PcDNA-gp100 Δ YVCD8 was similar to pcDNA-gp100CD8, but residues 610 to 627 were also removed.

In the construct pcDNA-gp100/GFP (presented in Figure 6-A), the entire GFP sequence, from which the first methionine was changed for a valine, was cloned between the putative amino-terminal signal sequence (residues 1 to 20) and the last 70 residues from gp100 (residue 594 to the end). In pcDNA-gp/GFP+epit (presented in Figure 6-B), residues 150 to 225 from gp100, which corresponded to minimal MHC class II and class I epitopes, were inserted after the GFP sequence.

Cell transfection and APC-pulsing

The day before transfection, cells were plated at 5×10^5 cells/well in 6-well plates to get 50-90% confluence on the day of transfection. The cells were transiently transfected employing Lipofectamine Plus Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Transfected cells were cultured for an additional 24 hours. We routinely reached between 30% to 50% transfection efficiency.

In some experiment, MeIFB and CD40-B cells were electroporated in a nucleofection system (Amaza Biosystems; Gaithersburg, MD) according to the manufacturer's instructions.

The HLA-DR β 1*0701-binding peptide gp100₁₇₀₋₁₉₀ (23) and the HLA-DR β 1*0701 control binding peptide Ig κ ₁₈₈₋₂₀₂ (27) were synthesized at the Surgery Branch (NCI/NIH). Recombinant gp100 protein was prepared as described previously (28). Recombinant NY-ESO-1 protein (29), another TA, served as a negative control. Peptide or protein pulsing of CD40-B cells (1×10^5) was carried out in B-cell culture medium for 16 hours in 96-well flat-bottom plates.

T cell assays

Gp100-specific T cell clones were analyzed for their capacity to recognize target cells, such as gp100-transfected 293T cells, melanoma cell lines or CD40-B pulsed with synthetic peptides or recombinant proteins. Target cells (1×10^5) were co-cultured with either a specific CD4⁺ T cell clone (2×10^4) or a specific CD8⁺ T cell clone (1×10^5) in 200 μ l of complete medium, in 96-well flat-bottom plates. Supernatants were harvested after 20-hour incubation, and human Interferon-gamma (IFN- γ) was assayed by ELISA with coupled antibodies (Endogen; Woburn, MA).

In some experiments, chloroquine (CHL) (Sigma; St-Louis, MO) was added on target cells, at 100 μ M for 4 hours. Cells were washed once and fixed with 0.5% of formaldehyde for 5 min. They were then washed extensively 3 times and co-cultured with T cells in 200 μ l of complete medium in 96-well flat-bottom plates.

Western blotting

Protein extracts were prepared from gp100-transfected 293T cells at 4°C, for 20 min, in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH8, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM Na₃VO₄ and 2 mM EDTA) containing protease inhibitors (1

mM PMSF, 2 μ M pepstatin A, 2 μ M leupeptin) (all from Sigma). Cell debris were sedimented and discarded, and protein concentration was measured by Lowry assay with a DC Protein Assay kit (Bio Rad; Hercules, CA). Proteins were prepared and loaded (7.5 μ g/well) on 10% SDS-polyacrylamide gel in a Mini-PROTEAN 3 system (Bio Rad) according to the manufacturer's instructions. Proteins were transferred to Hybond ECL membranes (Amersham Pharmacia Biotech; Buckinghamshire, UK) and revealed by incubation with a goat gp100-specific antibody (1:200) (K-18; Santa Cruz; Santa Cruz, CA) or a mouse actin-specific antibody (1:4,000) (Chemicon; Temecula, CA), for 1 hour. Membranes were washed and re-incubated for 1 hour with secondary peroxidase-conjugated antibodies, chicken anti-goat (1:10,000) or goat anti-mouse (1:40,000) (both from Chemicon), before detection with ECL Plus Western Blotting (Amersham Pharmacia Biotech).

Confocal microscopy

Cells were plated at 3×10^5 cells/well on Poly-D-Lysine (Sigma)-treated coverslips in 12-well plates the day before transfection (when necessary) and cultured for an additional 24 hours. Before intracellular staining, the cells were washed once with PBS (Invitrogen and Wisent) containing 0.5% BSA (Sigma), fixed and permeabilized with BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences; Mississauga, ON) directly on coverslips for 20 minutes and washed twice with BD Perm/Wash Solution (BD Biosciences).

Permeabilized cells were stained with a gp100-specific antibody (NK-1; Bio-Design; Saco, ME), a LAMP-1-specific antibody (anti-CD107a; BD Biosciences) or a pan-MHC Class II (HLA-DR, P, Q)-specific antibody (TÜ39; BD Biosciences). After

30 minutes of incubation with the first antibody, the cells were washed and re-incubated for 30 minutes with isotype-specific secondary antibodies coupled with Alexa Fluor-488 (green), -568 (red) or -647 (blue) (all from Molecular Probes; Eugene, OR). The cells were then washed and the coverslips were mounted on microscope slides using Geltol (Immunon; Pittsburgh, PA). After overnight incubation at 4°C, the coverslips were sealed with nail polish.

The cells were observed under a Leica TCS-SP1 confocal microscope (Leica Microsystems; Mannheim, Germany) fitted with an x100 oil immersion objective, analyzed by Leica Confocal Software (LCS) and processed by Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc.; San Jose, CA).

Cell surface analyzed by flow cytometry

293T cells were co-transfected by plasmids coding for GFP and gp100 mutants. Preliminary experiments in transient transfection by our group confirmed that the same cells were co-transfected with 2 different plasmids, gp100 and GFP, for instance (data not shown; figure available for reviewers in Appendix 1). Twenty-four hours later, the cells were harvested with trypsin, distributed at $>1 \times 10^5$ cells/tube in 5 ml polystyrene round-bottom tubes and washed with PBS containing 0.5% BSA. For intracellular staining, the cells were fixed and permeabilized with BD Cytotfix/Cytoperm for 20 min, then washed twice with BD Perm/Wash Solution (both from BD Biosciences).

Intracellular and cell surface staining were performed using a gp100-specific antibody (NK-1) or an isotype-matched control (IgG2b; BD Biosciences). After 30 minutes of incubation, the cells were washed and re-incubated for 30 minutes with a

phycoerythrin-conjugated isotype-specific secondary antibody (anti-mouse-R-PE; Molecular Probes). The cells were finally analyzed by flow cytometry on a Fluorescence-Activated Cell Sorter FACS Calibur (Becton Dickinson; Mississauga, ON). Only GFP-positive cells, which were also positive for gp100, were analyzed by WinMDI 2.8 software. Gp100 cell surface expression was compared with total expression in permeabilized cells.

Results

Exogenous and endogenous gp100 can be presented by MHC class II molecules

We have previously reported the generation of a CD4⁺ T cell clone specific for an HLA-DRβ1*0701 epitope from gp100 (gp100₁₇₀₋₁₉₀) using retrovirally-transduced dendritic cells (23). With this CD4⁺ T cell clone, classical MHC class II-mediated presentation of exogenous gp100 was first controlled. CD40-stimulated B lymphocytes (CD40-B) served as a source of APC (26). As expected, HLA-DRβ1*0701⁺ APC pulsed with recombinant gp100, but not the DRβ1*0701⁻ APC, were recognized by the CD4⁺ T cell clone (Figure 1-A). APC pulsed with different amounts of gp100 peptide, corresponding to the DRβ1*0701 epitope (gp100₁₇₀₋₁₉₀), were effectively recognized in a dose-dependent manner, but DRβ1*0701⁺ APC pulsed with either a different recombinant protein or a known DRβ1*0701-binding peptide derived from the immunoglobulin κ light chain (Igκ₁₈₈₋₂₀₂) were not recognized.

We next deployed the same gp100-specific CD4⁺ T cell clone to evaluate MHC class II-mediated presentation from endogenously-expressed gp100. HLA-DRβ1*0701⁺ melanoma cells (MelFB), immuno-selected for the absence of gp100, and 293T cells were engineered to express gp100 or GFP. As expected, only cells expressing gp100 and HLA-DRβ1*0701 were recognized (Figure 1-B). 293T cells expressing a control gene (GFP) or a different MHC class II molecule (HLA-DRβ1*0401) failed to promote IFN-γ secretion from the CD4⁺ T cell clone. In all cases, gp100 expression and class I presentation were controlled by co-transfection of

an HLA-A*0201 expression plasmid, and recognition was monitored by a CD8⁺ T cell clone specific to an HLA-A*0201 gp100 epitope (gp100₂₀₉₋₂₁₇) (25). We have previously confirmed that the amount of IFN- γ secretion by gp100-specific CD4⁺ (23) or CD8⁺ T cell clones correlated with the density of the peptide loaded on APC (data not shown).

Also, melanoma cells expressing gp100 and the class II transactivator (CIITA), up-regulating invariant chain (Ii), HLA-DM and -DR molecules, were recognized by the CD4⁺ T cell clone (624-CIITA, Figure 1-C), but not wild type CIITA⁻ cells not expressing HLA-class II molecules. Melanoma cells naturally expressing HLA-class II molecules DR β 1*0701 and gp100 (1087mel) were recognized by the CD4⁺ T cell clone. Other melanoma cells expressing HLA-class II molecules but not DR β 1*0701 (1300mel) were not recognized, confirming HLA-DR β 1*0701-restricted presentation.

Finally, we evaluated if intracellular antigen processing was required for MHC class II presentation of endogenously-expressed gp100. To do so, we treated target cells with CHL, which inhibits the processing of exogenous antigen and MHC class II presentation by neutralizing the pH of endosomes. As shown in Figure 1-D (left panel), CHL treatment resulted in inhibition of MHC class II presentation of exogenous gp100 by HLA-DR β 1*0701⁺ APC pulsed with recombinant gp100 and endogenous gp100 expressed by the melanoma cell line or 293T cells expressing HLA-DR β 1*0701, indicating that intracellular processing was required for MHC class II presentation. This inhibition was not caused by CHL toxicity, since similar

treatments of tumor cell lines did not inhibit MHC class I presentation of endogenous gp100 (Figure 1-D, right panel), as expected.

Importantly, data revealed that gp100 can be presented by MHC class II from either classical exogenous or endogenous pathways, suggesting protein mobilization to the endosomal compartment and MIIC.

Gp100 localizes to LAMP-1⁺ endosomal vesicles

Gp100 localization experiments were carried out with laser scanning confocal microscopy. As shown in Figure 2, gp100 seems to be localized in intracellular vesicles in both melanoma and transfected 293T cells (labeling in green). Double staining was performed with anti-LAMP-1, a membrane glycoprotein enriched in the lysosomal membrane and found in endosomes/lysosomes and MIIC (30, 31). Double staining revealed that several gp100⁺ vesicles were also positive for LAMP-1 (in red), suggesting co-localization in endosomal compartments (yellow vesicles indicated by white arrows). This experiment underscores the importance of the gp100 trafficking to endosomal compartments, which could be linked to its MHC class II presentation.

Mapping of endosomal targeting sequences essential for MHC class II presentation

Endosomal/melanosomal targeting motifs could be involved in gp100 mobilization to MIIC, and optimize MHC class II-mediated presentation. We hypothesized that the putative amino-terminal signal sequence and the last 70 residues (Figure 3-C), which contain a transmembrane domain, a tyrosine residue and a putative di-leucine motif, could be important for gp100 trafficking to endosomal

compartments. We prepared different deletions in the gp100 sequence to map potential sequences important for endosomal homing and MHC class II presentation. Plasmids encoding gp100 mutants and HLA-A*0201 were co-transfected in 293T cells expressing HLA-DR β 1*0701. MHC class I presentation was monitored with a CD8⁺ T cell clone specific to an HLA-A*0201 epitope from gp100 (gp100₂₀₉₋₂₁₇). MHC class II presentation was evaluated with a CD4⁺ T cell clone specific to an HLA-DR β 1*0701 epitope from gp100 (gp100₁₇₀₋₁₉₀). The different versions of deleted gp100 are represented in Figure 3-A (left panel). Importantly, both MHC class I and class II epitopes remained intact; only the last 70 residues were modified, which is more than 350 amino acids downstream of the epitopes. As expected, on the basis of IFN- γ secretion, gp100 and HLA-A*0201-transfected 293-DR β 1*0701⁺ cells (293 DR7/A2) were recognized by both CD4⁺ and CD8⁺ T cell clones, whereas gp100 and HLA-A*0101-transfected 293-DR β 1*0701⁺ cells (293 DR7/A1) failed to be recognized by the CD8⁺ T cell clone. Also, gp100 and HLA-A*0201-transfected 293-DR β 1*0401⁺ cells (293 DR4/A2) failed to be recognized by the CD4⁺ T cell clone. Although MHC class I-mediated presentation was similar for all gp100 mutants (Figure 3-A), deletions in the carboxy-terminus resulted in decreased MHC class II-restricted presentation. More specifically, deletion of the last 70 residues (gp100-NoTM) or internal deletion of the transmembrane domain (gp100- Δ TM) reduced MHC class II presentation to less than 10% of wild type gp100, suggesting an important role for the transmembrane domain. However, as demonstrated by the MHC class II/class I presentation ratio (Figure 3-B), MHC class II presentation was not affected by substitution of the transmembrane domain by the one from CD8

(gp100-CD8). Interestingly, deletion of the putative di-leucine motif (gp100- Δ LL), a motif previously described as being important for protein trafficking to endosomes (32-35), minimally diminished MHC class II presentation, as illustrated by the MHC class II/class I presentation ratio (Figure 3-B). Further deletion in the carboxy-terminal sequence downstream of the transmembrane domain (gp100-TM) resulted in 45% IFN- γ secretion by the CD4⁺ T cell clone when compared to the full length sequence (Figure 3-A).

Interestingly, deletion of a sequence of 12 residues, including a tyrosine and 3 consecutive arginines, located immediately after the transmembrane domain (gp100- Δ YV), had minimal effect on MHC class II presentation (Figure 3-A). However, this deletion combined with CD8-transmembrane substitution (gp100- Δ YVCD8) abrogated MHC class II presentation, which was revealed by the MHC class II/class I presentation ratio (Figure 3-B). Finally, as expected, deletion of the amino-terminal signal sequence (gp100- Δ SS) resulted in marked decrease MHC class II presentation with no changed MHC class I presentation compared to wild type gp100 (Figure 3-A).

These data suggested a similar expression for all mutants considering that MHC class I-mediated presentation was equivalent (Figure 3-A). A comparable expression level was further confirmed by analysis of gp100 expression by Western blotting (Figure 3-D). The expression level of gp100- Δ SS could not be evaluated, since the epitope recognized by the antibody was located in the amino-terminus.

Clearly, the data demonstrated that the last 70 residues, including the transmembrane domain and the amino-terminal signal sequence are critical for gp100

MHC class II-mediated presentation. Interestingly, multiple elements within these sequences seemed to be involved in this process.

Gp100 surface expression correlates with MHC class II presentation

Gp100 can possibly reach relevant endosomal compartments by 2 pathways for proper processing and MHC class II loading: 1) directly from the Golgi, and 2) by transiting to the cell surface with internalization. Interestingly, gp100-modification resulting in decreased MHC class II presentation was not caused by endoplasmic reticulum (ER)/Golgi retention, since endoglycosidase H (EndoH) sensitivity patterns were similar for all gp100 mutants (data not shown). Thus, to address the possibility of transition to the cell surface, we evaluated gp100 cell surface expression by flow cytometry and compared it with total expression in permeabilized cells (Figure 3-E). All gated transfected cells were gp100⁺, and surface expression was detected in 59% of these cells. The assessment of gp100 cell surface expression determinates for all mutants is summarized in Figure 3-B. Interestingly, all cells transfected with plasmid encoding gp100- Δ LL mobilized gp100 at the cell surface (Figure 3-E). In contrast, gp100-NoTM, gp100- Δ TM, gp100- Δ SS and gp100- Δ YVCD8 failed to mobilize to the cell surface. Consequently, as illustrated in Figure 3-B, there was a direct correlation between gp100 cell surface expression and the MHC class II/class I presentation ratio. These results suggest that gp100 could transit to the cell surface to gain access to relevant endosomal compartments and MIIC.

Gp100 cell surface expression may be due to overexpression in cells without melanosomes. Consequently, we also evaluated gp100 cell surface and total expression from 8 different melanoma cell lines. Gp100 expression was detected in 6

of 7 melanoma cell lines tested (excluding MelFB) (Figure 4), and gp100 cell surface expression was observed in 3 of these 6 melanoma cell lines. We also noted gp100 cell surface expression in a gp100⁻ melanoma cell line (MelFB) engineered to express gp100. Surface expression may have clinical implications and needs to be further investigated.

Endosomal localization of gp100 mutants presented by MHC class II

Characterization of the different versions of deleted gp100 was completed by gp100 localization experiments with laser scanning confocal microscopy of transfected 293T cells stained for gp100 and LAMP-1. As expected, gp100 mutants, presented by MHC class II, were located in intracellular vesicles co-localizing with LAMP-1 (yellow vesicles), similar to wild type gp100 (Figure 5-A). In contrast, the other gp100 mutants showed no specific vesicular localization, and no co-localization with LAMP-1, demonstrating the importance of these deleted sequences in gp100 trafficking. Interestingly, we found higher gp100 cell surface expression in gp100- Δ LL-transfected cells than in wild type gp100-transfected cells (green fluorescence in cell outline), confirming the gp100- Δ LL cell surface expression already noted by flow cytometry (Figure 3-E).

To further confirm that LAMP-1⁺ endosomes co-localizing with gp100 were MIIC, we stained gp100-transfected 293T cells and melanoma cells with an anti-gp100, an anti-LAMP-1 and an anti-HLA-DR, and laser scanning confocal microscopy was performed. As shown in Figure 5-B, LAMP-1⁺ vesicles containing gp100 (yellow vesicles in the left image) were also positive for HLA-DR (white

vesicles in the central image), indicating that they were MIIC. LAMP-1⁺/HLA-DR⁻ vesicles in MelFB may represent melanosomes.

These latter experiments confirmed that the putative amino-terminal signal sequence and the last 70 residues are essential for gp100 mobilization in MIIC.

Gp100-targeting sequences mobilize GFP to endosomes and allow the presentation of minimal class II and class I epitopes

Gp100-targeting sequences from gp100 were cloned in fusion with GFP, transfected in 293T cells engineered to express HLA-class II and accessory molecules, and laser scanning confocal microscopy was undertaken. As presented in Figure 6-A, wild type GFP showed no particular mobilization. However, GFP in fusion with the putative signal sequence and the last 70 residues from gp100 (gp100/GFP) co-localized with LAMP-1 (yellow vesicles indicated by white arrows). This confirms the importance of these sequences for protein localization in endosomal compartments and MIIC.

To link endosomal localization to MHC class II-mediated presentation, a short sequence from gp100, corresponding to minimal class II and class I epitopes, was inserted after GFP within the last-mentioned construct. Plasmids encoding this chimeric protein (gp/GFP+epit) and HLA-A*0201 or A*0101 were co-transfected in 293T cells expressing HLA-DRβ1*0701 or DRβ1*0401. GFP expression was confirmed by flow cytometry, and vesicular mobilization was studied by fluorescence microscopy (data not shown). As presented in Figure 6-B, 293-DRβ1*0701 cells transfected by plasmids encoding gp/GFP+epit or wild type gp100 were recognized by the CD4⁺ T cell clone. As expected, 293-DRβ1*0401 failed to stimulate the CD4⁺

T cell clone. Interestingly, gp/GFP+epit and full length gp100 were efficiently recognized by the CD8⁺ T cell clone, and the negative control, HLA-A*0101-transfected 293T cells, failed to be recognized. Presentation of gp100-MHC class II epitope was further confirmed in melanoma (MelFB; Figure 6-C) and APC (CD40-B).

The latter experiments confirm the importance of these sequences for: 1) mobilization to endosomes, and 2) MHC class II-mediated presentation of endogenous gp100.

Discussion

MHC class II antigenic presentation plays a critical role in anti-tumor immunity. Interestingly, specific endogenous proteins can reach MIIC and get processed for MHC class II presentation, similarly to exogenous proteins. Previous data suggested that endogenous gp100 can be presented by MHC class II molecules and stimulates specific CD4⁺ T lymphocytes (23, 24). Consequently, we wanted to further characterize MHC class II-mediated presentation of endogenous proteins and endosomal/MIIC internal trafficking leading to MHC class II presentation. We confirmed that exogenous and endogenous gp100 can be presented by MHC class II. We also demonstrated that gp100 expressed endogenously can reach LAMP-1⁺/HLA-DR⁺ endosomal/MIIC, which processing correlates with presentation by MHC class II. Therefore, we expected to define sequences within gp100 involved in these processes. Our results demonstrated that the putative amino-terminal signal sequence and the last 70 residues in the carboxy-terminus are essential for endosomal localization and MHC class II-mediated presentation of endogenous gp100. Moreover, we demonstrated that gp100 cell surface expression correlates with MHC class II presentation, suggesting gp100 transition to the cell surface before internalization to relevant endosomal/MIIC.

Mobilization of endogenous proteins to endosomal/MIIC and processing through the MHC class II pathway has already been evoked, especially in melanoma. Some melanosomal proteins might contain epitopes recognized by CD4⁺ T lymphocytes. Topalian *et al.* had previously found tyrosinase-specific CD4⁺ T cells from populations of tumor-infiltrating lymphocytes cultured from a metastatic

melanoma lesion (36). Other groups had also isolated tyrosinase-specific CD4⁺ T lymphocytes from peripheral blood of melanoma patients (37, 38). It could be suggested that tyrosinase and probably other melanosome membrane proteins, such as gp100, have the capacity to reach MHC class II molecules transported to endosomal/MIIC. Possibly, melanosomes, endosomes/lysosomes and MIIC, may be compartments with very similar characteristics (39, 40). Since gp100 is known to reach melanosomal compartments via an intracellular pathway (41), it can also possibly reach endosomal/MIIC by a similar pathway.

Two major pathways have been defined, by which proteins enter endosomal/MIIC to be processed for MHC class II-restricted presentation and recognition by CD4⁺ T lymphocytes. The traditional pathway involves the endocytosis of exogenous proteins by APC. In contrast, the second pathway implicates the processing of endogenously-synthesized membrane proteins (42). These membrane proteins are believed to enter endosomal compartments by internalization from the cell surface. As we observed a direct correlation between gp100 cell surface expression and MHC class II-mediated presentation (Figures 3-B), it is possible that gp100 also reached endosomal/MIIC by internalization from the cell surface.

Considering previous studies showing that melanosomal glycoproteins were mobilized to melanosomes by a di-leucine-based sorting motif (32), we originally predicted that removal of the putative gp100-di-leucine motif would impair endosomal/MIIC mobilization and MHC class II presentation. Surprisingly, removal of the gp100 putative di-leucine motif (gp100- Δ LL) unchanged mobilization to LAMP-1⁺ endosomes (Figure 5-A) and presentation by MHC class II (Figure 3-A). It

is plausible that this putative di-leucine motif is not functional, even if it fits with the accepted consensus sequence. Actually, functional di-leucine motifs from gp75 (43) and tyrosinase (33, 34), are structurally surrounded by basic residues, an acidic spacer and tyrosine residues, which is not the case for gp100.

However, the gp100-transmembrane domain is clearly important for endosomal/MIIC mobilization and MHC class II-mediated presentation. We demonstrated that substitution of the transmembrane domain by the one from CD8 did not affect gp100 MHC class II-mediated presentation (Figure 3-A), indicating that the presence of a transmembrane domain with all other sequences could be sufficient to mediate endosomal/MIIC mobilization of gp100. Interestingly, deletion of a sequence, including a tyrosine residue and 3 consecutive arginine residues, located immediately after the transmembrane domain, associated with CD8-transmembrane substitution, negatively affected MHC class II presentation, whereas deletion of this sequence alone had no effect compared to wild type gp100 (Figure 3-A). This could possibly be caused by an inappropriate folding of the protein within the membrane in the gp100- Δ YVCD8 construct. However, it could also suggest the involvement of important residues in the gp100 Y to V sequence (residues 616 to 627) that may have a role with the gp100-specific transmembrane domain for endogenous MHC class II presentation, but both are not absolutely required. Interestingly, other membrane glycoproteins, such as LAMP-1 or other lysosomal proteins, contain a lysosomal-trafficking tyrosine residue in a specific position within the cytoplasmic tail (44, 45).

Specifically, the lysosomal targeting signal formed the pattern Y-X-X-hydrophobic residue (46). In the gp100 sequence, the tyrosine residue is followed by 3 consecutive arginine residues, before a leucine, a hydrophobic residue (Y-R-R-R-

L). Three arginine residues have already been identified as an ER-retention signal (RXR) (47, 48), known to play an important role in trafficking of many membrane proteins to the cell surface (49). Here, we observed that deletion of this motif did not affect gp100 cell surface trafficking (Figure 3-B). However, MHC class II presentation was abrogated when this deletion was associated with CD8-transmembrane substitution (Figure 3-A).

Interestingly, these findings suggested that more than one sequence have a related role in gp100 MIIC-trafficking. Moreover, we confirmed that there are essential sequences present within the gp100 putative amino-terminal signal sequence and the last 70 residues in the carboxy-terminus, for endosomal/MIIC localization and MHC class II-mediated presentation of endogenous gp100.

To complete our study, we employed these gp100-targeting sequences to mobilize GFP, as a model endogenous protein, to endosomal compartments (Figure 6-A). Also, we demonstrated that these targeting sequences allow MHC class II and class I presentation of endogenous epitopes linked to GFP in 293T cells, melanoma and APC (Figure 6-B, C). Consequently, we believe that these sequences could be exploited as a tool *in vivo* to optimize CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses against tumor- and viral-associated antigens. Specifically, MIIC targeting sequences could be included in expression cassettes for DNA vaccines or for improved expression in APC and optimized MHC class II presentation without apparent negative impact on MHC class I presentation. Thus, these targeting sequences could also be exploited as an *in vitro* tool to characterize new MHC class II epitopes and promote the stimulation of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

Acknowledgments

We thank Ovid Da Silva from the “Bureau d’aide à la recherche” (from CHUM) for text editing. We also thank Dr Jacques Thibodeau for critical review of the manuscript and helpful discussions. We thank Diane Beauseigle for technical support. R.L. is the recipient of a « Fond pour la recherche en santé du Québec » scholarship. SL was supported by a studentship from the Canderel fund of the Institut du cancer de Montréal. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and from « La fondation du CHUM ».

Abbreviations

¹The abbreviations used are:

APC, antigen-presenting cells

CD40-B, CD40-stimulated B lymphocytes

CIITA, class II transactivator

CHL, chloroquine

EndoH, endoglycosidase H

ER, endoplasmic reticulum

GFP, green fluorescent protein

IFN- γ , Interferon-gamma

Igk, immunoglobulin κ light chain

Ii, invariant chain

IL, Interleukin

MHC, major histocompatibility complex

MIIC, MHC class II compartments

TA, tumor antigen

T_{reg}, regulatory T lymphocytes.

References

1. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, and Levitsky H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J. Exp. Med.* 1998;188:2357-2368.
2. Surman DR, Dudley ME, Overwijk WW, and Restifo NP. Cutting edge: CD4+ T cell control of CD8+ T cell reactivity to a model tumor antigen. *J. Immunol.* 2000;164:562-565.
3. Corthay A, Skovseth DK, Lundin KU et al. Primary antitumor immune response mediated by CD4(+) T cells. *Immunity* 2005;22:371-383.
4. Phan GQ, Touloukian CE, Yang JC et al. Immunization of patients with metastatic melanoma using both class I- and class II-restricted peptides from melanoma-associated antigens. *J. Immunother.* 2003;26:349-356.
5. Wong R, Lau R, Chang J et al. Immune responses to a class II helper peptide epitope in patients with stage III/IV resected melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2004;10:5004-5013.
6. Toes REM, Ossendorp F, Offringa R, and Melief CJM. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J. Exp. Med.* 1999;189:753-756.
7. Wang RF. The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *Trends Immunol.* 2001;22:269-276.
8. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, and Schoenberger SP. CD4(+) T cells are required for secondary expansion and memory in CD8(+) T lymphocytes. *Nature* 2003;421:852-856.
9. Shedlock DJ and Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 2003;300:337-339.
10. Velders MP, Markiewicz MA, Eiben GL, and Kast WM. CD4(+) T cell matters in tumor immunity. *Int. Rev. Immunol.* 2003;22:113-140.
11. Gerloni M and Zanetti M. CD4 T cells in tumor immunity. *Springer Semin. Immunopathol.* 2005;27:37-48.
12. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, and Hafler DA. CD4+CD25(high) regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 2001;167:1245-1253.
13. Javia LR and Rosenberg SA. CD4(+)CD25(+) suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J. Immunother.* 2003;26:85-93.

14. Wang HY, Lee DA, Peng GY et al. Tumor-specific human CD4(+) regulatory T cells and their ligands: Implications for immunotherapy. *Immunity* 2004;20:107-118.
15. Piccirillo CA and Shevach EM. Cutting edge: Control of CD8(+) T cell activation by CD4(+)CD25(+) immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 2001;167:1137-1140.
16. Murakami M, Sakamoto A, Bender J, Kappler J, and Marrack P. CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 2002;99:8832-8837.
17. Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, and Bandeira A. CD25(+) CD4(+) T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J. Immunol.* 2001;166:3008-3018.
18. Almeida ARM, Legrand N, Papiernik M, and Freitas AA. Homeostasis of peripheral CD4(+) T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4(+) T cell numbers. *J. Immunol.* 2002;169:4850-4860.
19. Lopez-Nevot MA, Garcia E, Romero C, Oliva MR, Serrano S, and Garrido F. Phenotypic and genetic-analysis of HLA class-I and HLA-DR antigen expression on human melanomas. *Exp. Clin. Immunogenet.* 1988;5:203-212.
20. Bernsen MR, Hakansson L, Gustafsson B et al. On the biological relevance of MHC class II and B7 expression by tumour cells in melanoma metastases. *Br. J. Cancer* 2003;88:424-431.
21. Brocker EB, Suter L, and Sorg C. HLA-DR antigen expression in primary melanomas of the skin. *J. Invest. Dermatol.* 1984;82:244-247.
22. Sachse M, Ramm G, Strous G, and Klumperman J. Endosomes: multipurpose designs for integrating housekeeping and specialized tasks. *Histochem. Cell Biol.* 2002;117:91-104.
23. Lapointe R, Royal RE, Reeves ME, Altomare I, Robbins PF, and Hwu P. Retrovirally-transduced human dendritic cells can generate T cells recognizing multiple MHC class I and class II epitopes from the melanoma antigen gp100. *J. Immunol.* 2001;167:4758-4764.
24. Lapointe R, Thibodeau J, and Hwu P. Correspondence re R. Lapointe et al., CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. (*Cancer Res.* 2003;63:2836-2843). *Cancer Res.* 2004;64:4056-4057.

25. Dudley ME, Nishimura MI, Holt AK, and Rosenberg SA. Antitumor immunization with a minimal peptide epitope (G9-209-2M) leads to a functionally heterogeneous CTL response. *J. Immunother.* 1999;22:288-298.
26. Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, and Hwu P. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res.* 2003;63:2836-2843.
27. Chicz RM, Urban RG, Gorga JC, Vignali DA, Lane WS, and Strominger JL. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* 1993;178:27-47.
28. Touloukian CE, Leitner WW, Topalian SL et al. Identification of a MHC class II-restricted human gp100 epitope using DR4-IE transgenic mice. *J. Immunol.* 2000;164:3535-3542.
29. Zeng G, Touloukian CE, Wang X, Restifo NP, Rosenberg SA, and Wang RF. Identification of CD4+ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by HLA-DR molecules. *J. Immunol.* 2000;165:1153-1159.
30. Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, and Geuze HJ. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 1991;349:669-675.
31. Calafat J, Nijenhuis M, Janssen H et al. Major histocompatibility complex class-II molecules induce the formation of endocytic MIIC-like structures. *J. Cell Biol.* 1994;126:967-977.
32. Wang S, Bartido S, Yang G et al. A role for a melanosome transport signal in accessing the MHC class II presentation pathway and in eliciting CD4+ T cell responses. *J. Immunol.* 1999;163:5820-5826.
33. Simmen T, Schmidt A, Hunziker W, and Beermann F. The tyrosinase tail mediates sorting to the lysosomal compartment in MDCK cells via a di-leucine and a tyrosine-based signal. *J. Cell Sci.* 1999;112:45-53.
34. Calvo PA, Frank DW, Bieler BM, Berson JF, and Marks MS. A cytoplasmic sequence in human tyrosinase defines a second class of di-leucine-based sorting signals for late endosomal and lysosomal delivery. *J. Biol. Chem.* 1999;274:12780-12789.
35. Le Borgne R, Planque N, Martin P, Dewitte F, Saule S, and Hoflack B. The AP-3-dependent targeting of the melanosomal glycoprotein QNR-71 requires a di-leucine-based sorting signal. *J. Cell Sci.* 2001;114:2831-2841.

36. Topalian SL, Rivoltini L, Mancini M et al. Human CD4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 1994;91:9461-9465.
37. Yee C, Gilbert MJ, Riddell SR et al. Isolation of tyrosinase-specific CD8(+) and CD4(+) T cell clones from the peripheral blood of melanoma patients following in vitro stimulation with recombinant vaccinia virus. *J. Immunol.* 1996;157:4079-4086.
38. Kobayashi H, Kokubo T, Sato K et al. CD4(+) T cells from peripheral blood of a melanoma patient recognize peptides derived from nonmutated tyrosinase. *Cancer Res.* 1998;58:296-301.
39. Raposo G and Marks MS. The dark side of lysosome-related organelles: Specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. *Traffic* 2002;3:237-248.
40. Zhou BK, Boissy RE, Pifko-Hirst S, Moran DJ, and Orlow SJ. Lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1) is the melanocyte vesicular membrane glycoprotein band II. *J. Invest. Dermatol.* 1993;100:110-114.
41. Berson JF, Harper DC, Tenza D, Raposo G, and Marks MS. Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Mol. Biol. Cell* 2001;12:3451-3464.
42. Polydefkis M, Koenig S, Flexner C et al. Anchor sequence-dependent endogenous processing of human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160 for CD4+ T cell recognition. *J. Exp. Med.* 1990;171:875-887.
43. Vijayasaradhi S, Xu Y, Bouchard B, and Houghton AN. Intracellular sorting and targeting of melanosomal membrane proteins: identification of signals for sorting of the human brown locus protein, gp75. *J. Cell Biol.* 1995;130:807-820.
44. Williams MA and Fukuda M. Accumulation of membrane-glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *J. Cell Biol.* 1990;111:955-966.
45. Peters C, Braun M, Weber B et al. Targeting of a lysosomal membrane-protein - A tyrosine-containing endocytosis signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid-phosphatase is necessary and sufficient for targeting to lysosomes. *EMBO J.* 1990;9:3497-3506.
46. Guarnieri FG, Arterburn LM, Penno MB, Cha Y, and August JT. The motif Tyr-X-X-Hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein-1. *J. Biol. Chem.* 1993;268:1941-1946.

47. Schutze MP, Peterson PA, and Jackson MR. An N-terminal double-arginine motif maintains type-II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 1994;13:1696-1705.
48. Standley S, Roche KW, McCallum J, Sans N, and Wenthold RJ. PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* 2000;28:887-898.
49. Xia H, Hornby ZD, and Malenka RC. An ER retention signal explains differences in surface expression of NMDA and AMPA receptor subunits. *Neuropharmacology* 2001;41:714-723.

Figure 1 MHC class II-restricted presentation of endogenous and exogenous gp100

Lepage and Lapointe

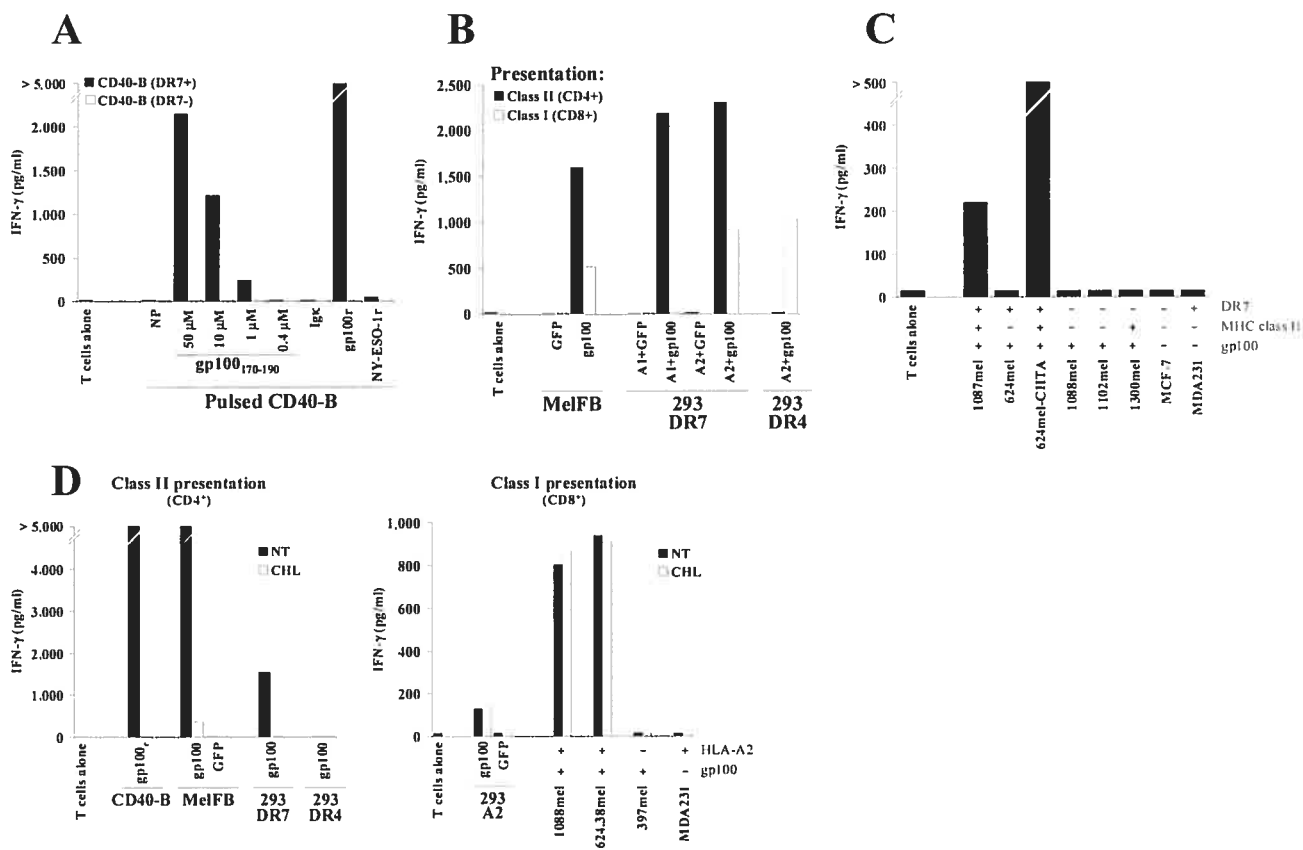


Figure 1 MHC class II-restricted presentation of endogenous and exogenous gp100.

A. HLA-DR β 1*0701⁻ or *0701⁻-stimulated B lymphocytes (CD40-B) were pulsed with recombinant gp100 (gp100r), or NY-ESO-1 (NY-ESO-1r), different amounts of gp100₁₇₀₋₁₉₀ peptide or a DR β 1*0701-binding control peptide (Igk₁₈₈₋₂₀₂). A gp100-specific CD4⁺ T cell clone was co-cultured with these target cells.

B. An HLA-DR β 1*0701⁺ gp100-deficient melanoma cell line (melFB) was retrovirally-transduced using genes encoding gp100 or GFP. 293T cells expressing HLA-DR β 1*0701 or DR β 1*0401 (DR7 or DR4) were co-transfected with plasmids coding for gp100 or GFP and HLA-A*0201 or A*0101 (A2 or A1). Gp100-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell clones were co-cultured with these target cells.

C. Melanoma cell lines expressing or not gp100, MHC class II molecules or HLA-DR β 1*0701 (DR7) were co-cultured with a gp100-specific CD4⁺ T cell clone.

D. HLA-DR β 1*0701⁺-stimulated B lymphocytes (CD40-B) pulsed with recombinant gp100 (gp100r), HLA-DR β 1*0701⁺ gp100-deficient melanoma cell line (MelFB) expressing gp100 or GFP, gp100-transfected 293T cells expressing HLA-DR β 1*0701, DR β 1*0401 or HLA-A*0201 (DR7, DR4 or A2), and melanoma cell lines expressing or not gp100 or HLA-A*0201 (HLA-A2), were treated with 100 μ M chloroquine (CHL) or left untreated (NT), as described in section *Materials and Methods*. Gp100-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell clones were co-cultured with these target cells.

For **A**, **B**, **C** and **D**, supernatants were harvested after 20-hour co-culture, and IFN- γ secretion was determined by ELISA. (representative of ≥ 5 independent experiments)

Figure 2 Co-localization of gp100 and LAMP-1
Lepage and Lapointe

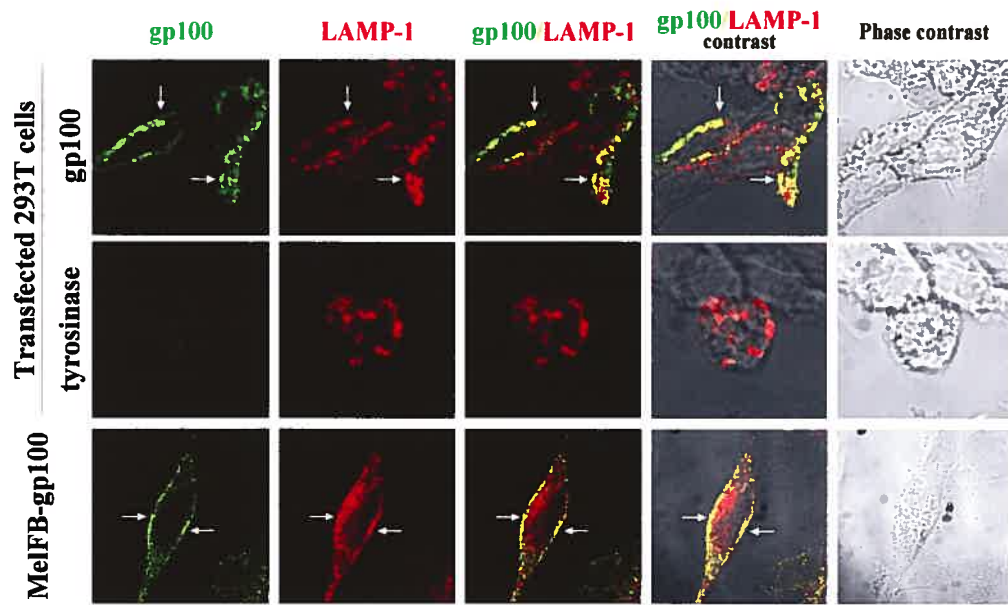


Figure 2 Co-localization of gp100 and LAMP-1.

293T cells transfected with plasmids coding for gp100 or tyrosinase and a melanoma cell line expressing gp100 (MelFB-gp100) were permeabilized and double-stained with an anti-gp100 coupled with Alexa Fluor-488 (in green) and an anti-LAMP-1 coupled with Alexa Fluor-568 (in red). The cells were analyzed by laser scanning confocal microscopy. Yellow vesicles, in merged images, revealed the co-localization of gp100 and LAMP-1 (white arrows). (representative of 3 independent experiments)

Figure 3 Mapping of gp100-derived targeting sequences essential for MHC class II presentation.

Lepage and Lapointe

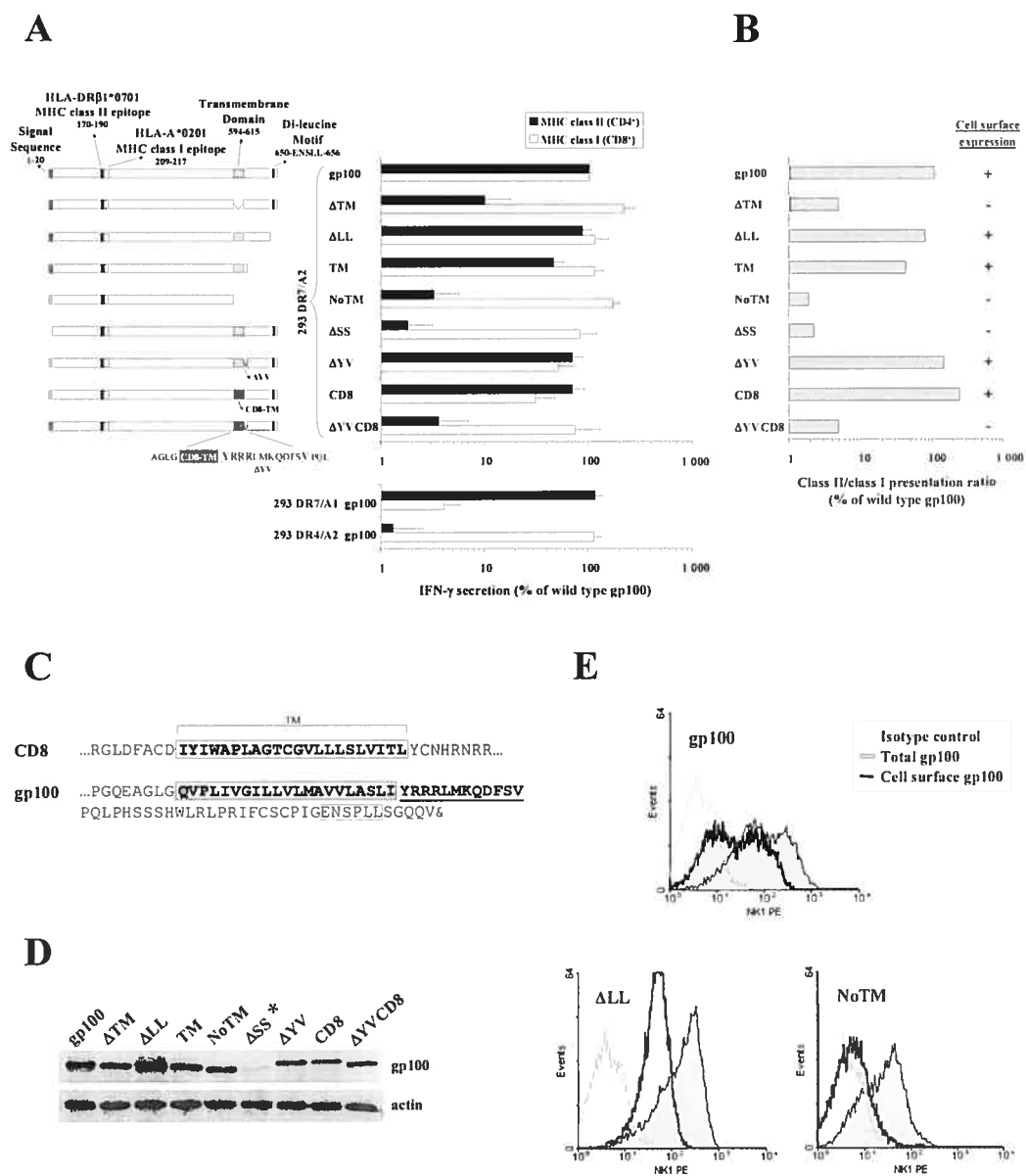


Figure 3 Mapping of gp100-derived targeting sequences essential for MHC class II presentation.

A. Plasmids encoding gp100 mutants and HLA-A*0201 or A*0101 (A2 or A1) were co-transfected in 293T cells expressing HLA-DR β 1*0701 or DR β 1*0401 (DR7 or DR4). Gp100-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell clones were co-cultured with transfected cells, and peptide presentation was evaluated on the basis of IFN- γ secretion, as determined by ELISA. Data from gp100 mutants are presented as a percentage of IFN- γ secretion compared to wild type gp100, normalized to 100%. (average of 10 independent experiments)

B. Data from panel A are presented as a class II/class I antigen presentation efficiency ratio.

C. Amino acid sequences of the transmembrane domain from CD8, the transmembrane domain and the carboxy-terminus of gp100.

D. Gp100 expression levels were revealed by Western blot analysis with a gp100-specific antibody. * The epitope recognized by this antibody is located in the amino-terminus; consequently, the expression level of gp100- Δ SS could not be evaluated.

E. Gp100 cell surface expression was evaluated by flow cytometry (Cell surface expression). Total gp100 expression was also evaluated, by permeabilizing transfected cells prior to staining (Total gp100). Gp100 cell surface expression from all gp100 mutants is summarized in panel B. (representative of 6 independent experiments)

Figure 4 Gp100 cell surface expression in melanoma cell lines
Lepage and Lapointe

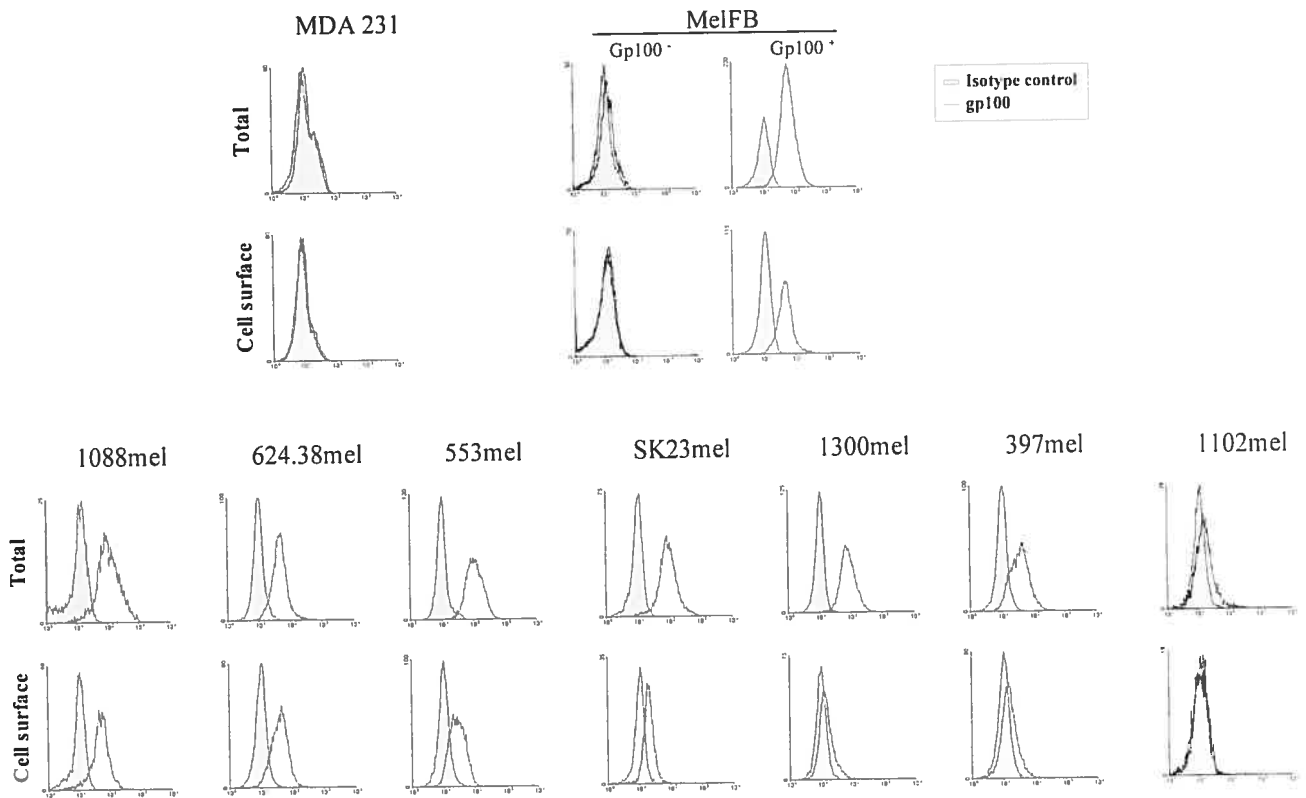


Figure 4 Gp100 cell surface expression in melanoma cell lines.

Gp100 cell surface expression from different melanoma cell lines was evaluated by flow cytometry (Cell surface). Total gp100 expression was also evaluated, by permeabilizing cells prior to staining (Total). (representative of 3 independent experiments)

Figure 5 Endosomal localization of gp100 mutant
Lepage and Lapointe

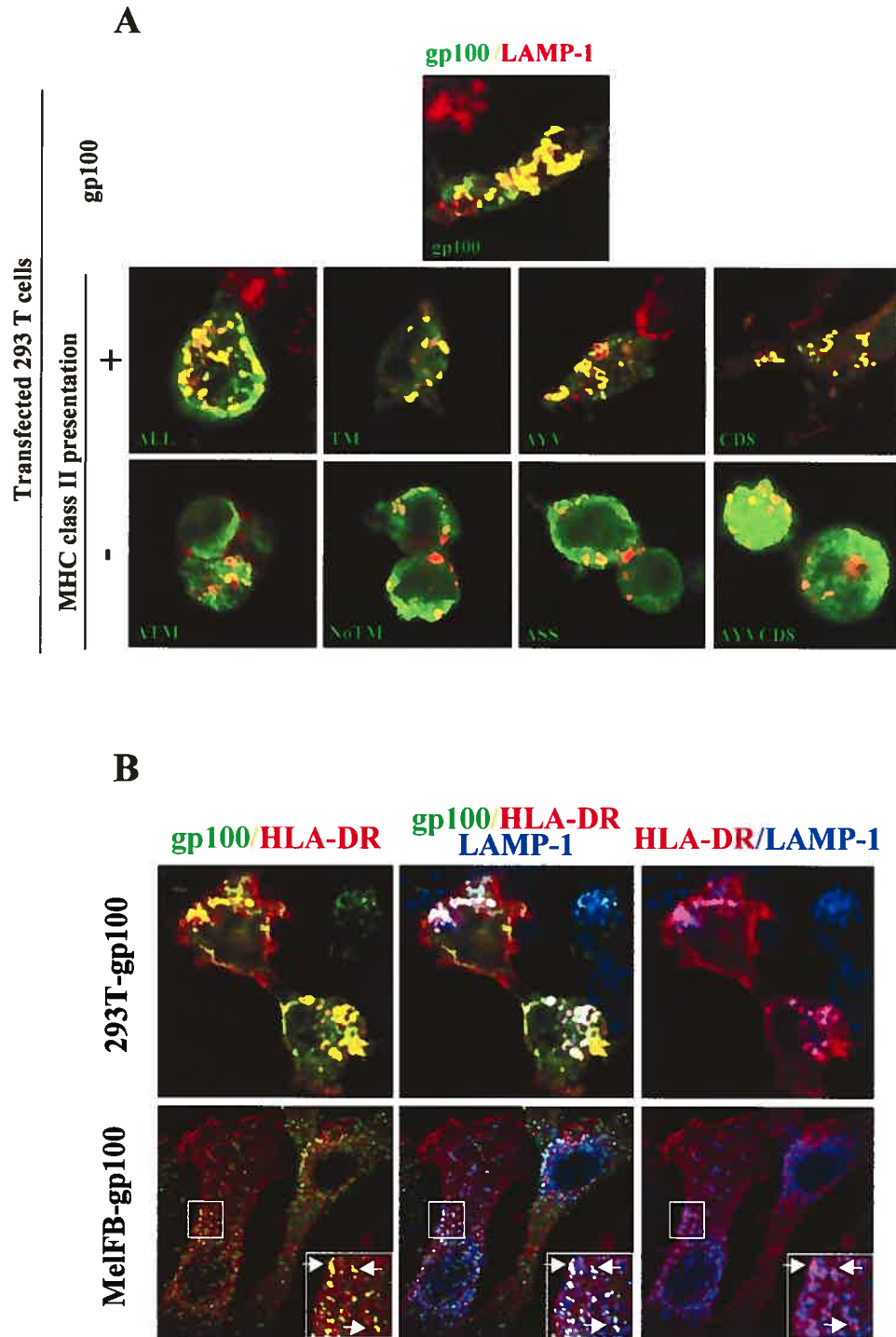


Figure 5 Endosomal localization of gp100 mutant.

A. 293T cells transfected with plasmid coding for gp100 or gp100 mutants were permeabilized and double-stained with an anti-gp100 coupled with Alexa Fluor-488 (in green) and an anti-LAMP-1 coupled with Alexa Fluor-568 (in red). The cells were analyzed by laser scanning confocal microscopy. Yellow vesicles, in mutants presented by MHC class II, revealed co-localization of gp100 and LAMP-1. (representative of 2 independent experiments)

B. Gp100-transfected 293T cells and a melanoma cell line expressing gp100 (MelFB-gp100) were permeabilized and stained with an anti-gp100 coupled with Alexa Fluor-488 (in green), an anti-HLA-DR coupled with Alexa Fluor-568 (in red) and an anti-LAMP-1 coupled with Alexa Fluor-647 (in blue). The cells were analyzed by laser scanning confocal microscopy. White vesicles, in the central image, revealed co-localization of gp100, LAMP-1 and MHC class II molecule HLA-DR. (representative of 2 independent experiments)

Figure 6 Endosomal mobilization of GFP, and presentation of minimal MHC class II and class I epitopes, using gp100-targeting sequences

Lepage and Lapointe

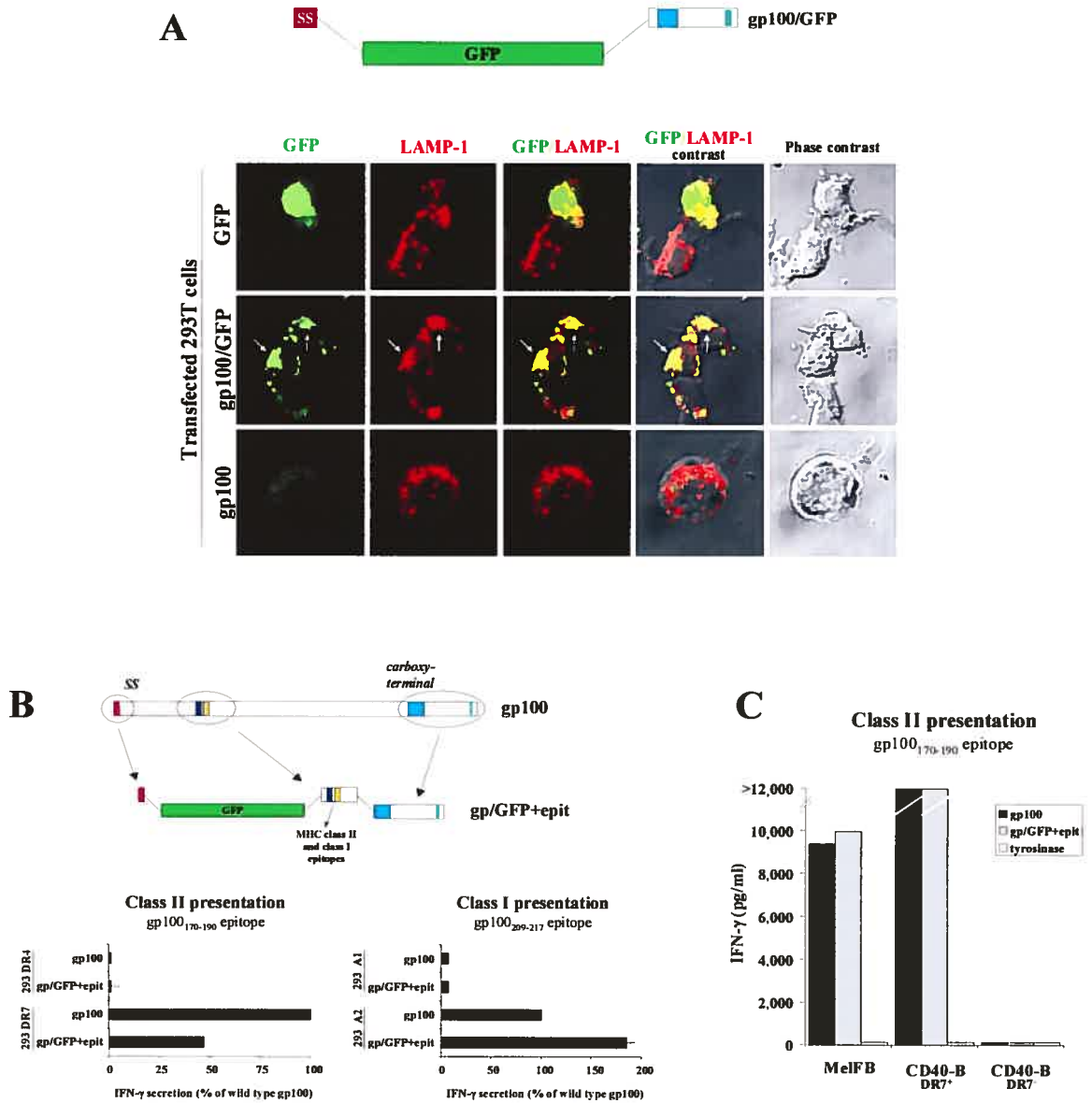


Figure 6 Endosomal mobilization of GFP, and presentation of minimal MHC class II and class I epitopes, using gp100-targeting sequences.

A. Schematic representation of GFP modified with gp100-targeting sequences (gp100/GFP). 293T cells were transfected with plasmids coding for GFP, gp100 or gp100/GFP. The cells were permeabilized, stained with an anti-LAMP-1 coupled with Alexa Fluor-568 (in red) and analyzed by laser scanning confocal microscopy. Yellow vesicles, in merged image, revealed co-localization of gp100/GFP and LAMP-1 (white arrows). (representative of 5 independent experiments)

B. Schematic representation of GFP modified with gp100-targeting sequences and minimal MHC class II and class I gp100 epitopes (gp/GFP+epit). Plasmids encoding gp100 or gp/GFP+epit were transfected in 293T cells expressing HLA-DR β 1*0701 or DR β 1*0401 (DR7 or DR4), and a gp100-specific CD4⁺ T cell clone was co-cultured with these transfected cells (left panel). Plasmids encoding gp100 or gp/GFP+epit and HLA-A*0201 or A*0101 (A2 or A1) were co-transfected in 293T cells, and a gp100-specific CD8⁺ T cell clone was co-cultured with these transfected cells (right panel). Supernatants were harvested after 20-hour co-culture, and IFN- γ secretion was measured by ELISA. Data are presented as a percentage of INF- γ secretion compared to gp100, normalized to 100%. (average of 2 independent experiments)

C. A melanoma cell line (MelFB) and HLA-DR β 1*0701⁺- or *0701⁻-stimulated B lymphocytes (CD40-B) were electroporated with plasmids coding for gp100, gp/GFP+epit or tyrosinase, and a gp100-specific CD4⁺ T cell clone was co-cultured with these target cells. (representative of 2 independent experiments)

CHAPITRE 3. **Clonage du TCR d'un clone de lymphocyte T CD4⁺ spécifique à l'épitope gp100₁₇₀₋₁₉₀ présenté par HLA-DRβ1*0701**

Cette partie est un chapitre de résultats complémentaires au chapitre précédent, constitué de données non-publiées. Ce chapitre sera présenté sous la forme suivante:

- 3.1 Résumé
- 3.2 Matériel et Méthodes
- 3.3 Présentation et description des résultats

L'introduction et la recension de la littérature concernant ce chapitre sont intégrées dans le Chapitre 1 - Introduction.

3.1 Résumé

Les lymphocytes T ont une capacité limitée de prolifération, il peut donc s'avérer difficile de conserver leur stabilité et leur spécificité sur une longue période de temps. Le transfert de la spécificité d'un clone de lymphocytes T à une lignée de lymphocytes T immortalisés, comme les Jurkat, peut être une façon intéressante de prolonger la vie d'un clone spécifique. La quantité de cellules du clone de lymphocytes T CD4⁺ spécifique à gp100, utilisée tout au long de ce projet, ayant diminué dramatiquement, nous avons donc décidé de cloner le TCR spécifique pour le faire exprimer par un clone de cellules Jurkat qui n'exprime pas de TCR endogène.

De plus, le séquençage des gènes de notre TCR a permis d'identifier les segments géniques V_α26-2 et J_α54*01 pour la chaîne α (Figure 1-A) et V_β9, D_β2, J_β2.6 et C_β2 pour la chaîne β (Figure 1-B).

3.2 Matériel et Méthodes

Culture cellulaire

Le clone de lymphocytes T CD4⁺, spécifique à un épitope de gp100 présenté par HLA-DRβ1*0701, a été cultivé comme décrit précédemment (Lapointe et al., 2001) dans du milieu complet, c'est-à-dire du milieu AIM-V (Invitrogen; Carlsbad, CA) additionné de 5% de sérum humain AB (inactivé par la chaleur; Gemini Bio-Products; Calabasas, CA), 2 mM de L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline/streptomycine et 10 µg/ml de gentamicine (tous de Invitrogen), en présence de 300 UI/ml d'IL-2 recombinant (Chiron; Emeryville, CA). Les lymphocytes T ont été stimulés plusieurs fois par un protocole d'expansion rapide (REP) qui consiste à cultiver 1 à 5 X 10⁵ lymphocytes T en présence de 2,5 X 10⁷ cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC), irradiées, préparées à partir de 3 donneurs normaux (provenant de l'hôpital Royal Victoria, Montréal) et 30 ng/ml d'anti-CD3 (clone OKT3; Ortho-Biotech, Raritan, NJ) dans 25 ml de milieu complet. Une méthode alternative a aussi été utilisée, où l'anti-CD3 a été remplacé par 5 µg/ml de lectin-Phytohemagglutinine (PHA; Sigma, St-Louis, MO) et 300 UI/ml d'IL-2. Dans les 2 cas, 300 UI/ml d'IL-2 a été ajouté, au jour 2, et 20 ml de milieu a été remplacé par 20 ml de milieu frais et 300 UI/ml d'IL-2, au jour 5. À partir du 8^e jour, les lymphocytes sont comptés et maintenus à 1 X 10⁶ cellules/ml dans du milieu complet et 300 UI/ml d'IL-2. Une expansion par REP permet d'amplifier une population initiale jusqu'à près de 100 fois, soit de quelques centaines de milliers de lymphocytes T à quelques dizaines de millions de lymphocytes T, qui pourront éventuellement subir une seconde expansion par REP.

Clonage du TCR

Extraction d'ARN

Le clone de lymphocytes T CD4⁺, spécifique à un épitope de gp100 présenté par HLA-DRβ1*0701, a été cultivé pendant deux jours en présence de 300 UI/ml

d'IL-2, et l'ARN total a été préparé à l'aide du RNeasy Micro Kit (QIAGEN; Hilden, Allemagne).

Amplification PCR

L'amplification des gènes du TCR a été réalisée à l'aide du *BD SMART RACE (rapid amplification of cDNA ends) cDNA Amplification Kit* (BD Biosciences Clontech; Mississauga, ON) qui permet l'amplification d'un gène dont seule une des extrémités est connue. La technologie du BD SMART nous a permis de générer de l'ADNc par la transcription inverse (RT) en joignant un oligonucléotide BD SMART II à l'extrémité 5' de chacun des brins d'ADNc synthétisés. L'amplification PCR a donc pu être réalisée à l'aide d'une amorce universelle correspondant à la séquence du BD SMART II, et d'une amorce synthétisée à partir de l'extrémité 3' de la région constante de chacune des chaînes du TCR :

TCR C α : 5'-TCAGCTGGACCACAGCCGCAGCG-3'

TCR C β 1 : 5'-TCAGAAATCCTTTCTCTTGACC-3'

TCR C β 2 : 5'-CTAGCCTCTGGAATCCTTTCTC-3'

L'Amplification a été détectée par un marquage au bromure d'éthidium suivant la migration sur un gel d'agarose 1%.

Plasmides

L'amplification PCR des gènes du TCR a d'abord été insérées dans le vecteur PCR-Blunt-TOPO, selon les instructions du *Zero Blunt PCR Cloning Kit* (Invitrogen), pour permettre le séquençage. Le gène de la chaîne α a ensuite été cloné dans le vecteur d'expression pCDNA3.1 (Invitrogen), entre les sites de restriction: Hind III et Xho I, et celui de la chaîne β a été cloné dans le vecteur d'expression pBudCE4.1 (Invitrogen), entre les sites de restriction : Hind III et Xba I.

3.3 Présentation et description des résultats

3.3.1 Spécificité du récepteur des lymphocytes T

La caractérisation d'un clone ou d'une lignée de lymphocytes T spécifiques, permettant l'identification de nouveaux AT, nécessite un nombre considérable de cellules spécifiques. Toutefois, il peut parfois arriver que le nombre de lymphocytes T spécifiques disponibles soit critique et constitue un obstacle majeur au clonage ou à l'identification de nouveaux AT. Afin d'y remédier, certains groupes ont développé une approche pour isoler la spécificité d'un clone de lymphocytes T, en transférant le TCR spécifique à des lymphocytes T du sang périphérique (Clay et al., 1999) ou à une lignée de lymphocytes T immortalisés, comme les Jurkat (Aarnoudse et al., 2002). Ainsi, une source presque illimitée de lymphocytes T spécifiques peut être obtenue, facilitant ainsi l'identification de nouveaux AT. Le transfert de la spécificité antigénique du TCR de lymphocytes T spécifiques a également été exploité comme nouvelle approche thérapeutique anti-tumorale (Kessels et al., 2001; Schumacher, 2002; Hughes et al., 2005).

Tous les résultats du chapitre précédent, sur la présentation de gp100 par les molécules du CMH de classe II, ont été générés à l'aide d'un clone de lymphocytes T CD4⁺ spécifique pour l'épitope gp100₁₇₀₋₁₉₀ présenté par HLA-DRβ1*0701. Par contre, la quantité de cellules disponibles a fini par devenir plus limitée. Nous souhaitons donc isoler, amplifier et identifier les gènes spécifiques des chaînes α et β de ce TCR, dans le but de les transférer dans une lignée immortalisée.

3.3.2 Isolement des gènes du TCR

La diversité de la région variable des chaînes α et β du TCR complique le clonage des gènes de chacune de ces chaînes. Ainsi, l'amplification des gènes du TCR a été réalisée par un RACE en 5', tel que mentionné dans la section *Matériels et*

Méthodes. Cette approche ne requiert qu'une seule amorce spécifique correspondant à l'extrémité 3' de la région constante de chacune des chaînes du TCR.

La famille des gènes codant pour la chaîne α est constituée d'un seul segment génique C_α , codant pour le domaine constant, mais celles des gènes de la chaîne β est constituée de 2 segments géniques C_β légèrement différents. Nous avons donc utilisé 2 amorces spécifiques pour chacun des segments géniques C_β . Une seule de ces amorces nous a permis d'amplifier un gène spécifique au TCR $_\beta$ (Figure 1), dont le domaine constant correspondait au segment génique C_β 2.

3.3.3 Séquences des régions variables

Les amplifications PCR des 2 chaînes du TCR ont ensuite été insérées directement dans un vecteur TOPO, pour permettre le séquençage de ces gènes.

Pour la chaîne α , nous avons fait séquencer 4 clones, dont 2 étaient identiques et dont la séquence correspondait à un gène du TCR. La famille des gènes codant pour la chaîne α est constituée de plusieurs segments géniques V_α et J_α , codant pour les différentes régions du domaine variable. Les différents segments géniques de la chaîne α de notre TCR sont illustrés et décrits à la Figure 2-A. Le domaine variable de la chaîne α est constitué des segments géniques V_α 26-2 et J_α 54*01.

Pour la chaîne β , nous avons fait séquencer 2 clones, qui étaient identiques et dont la séquence correspondait à un gène du TCR. La famille de gènes des chaînes β est également constituée de plusieurs segments géniques V_β et de 2 séries répétitives de segments géniques D, J et C, contenant chacune 1 D_β , quelques J_β et 1 C_β . Les différents segments géniques de la chaîne β de notre TCR sont illustrés et décrits à la Figure 2-B. Le domaine variable de la chaîne β est constitué du segment génique V_β 9 (selon la nouvelle nomenclature proposé par Marie-Paule Lefranc (Folch et al., 2000)), et des segments géniques D_β 2 et J_β 2.6.

En identifiant les différentes régions du domaine variable des chaînes α et β de notre TCR, nous avons remarqué quelques séquences additionnelles. En effet, il se produit une addition de nucléotides entre les différents segments géniques lors du réarrangement des gènes du TCR, tel qu'observé dans les séquences des chaînes α et β (acides aminés représentés en noir dans la Figure 2), ce qui accentue davantage la diversité des TCR (Oltz, 2001; Nikolich-Zugich et al., 2004).

Finalement, les 2 gènes du TCR ont été clonés dans 2 vecteurs d'expression différents. Ces vecteurs pourront ensuite être introduits dans des cellules Jurkat déficientes en TCR, pour ainsi permettre l'expression de notre TCR d'intérêt.

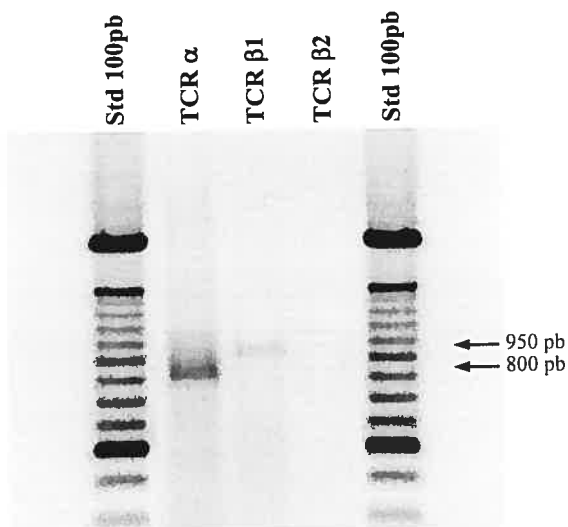


Figure 1 Isolement des gènes du TCR par PCR

L'amplification des gènes du TCR a été réalisée à l'aide du *BD SMART RACE cDNA Amplification Kit*, tel que mentionné dans la section *Matériels et Méthodes*, avec une amorce universelle correspondant à la séquence du BD SMART II et une amorce synthétisée à partir de l'extrémité 3' de la région constante de chacune des chaînes du TCR : TCR C_α, TCR C_β 1 et C_β 2. Les amorces pour la chaîne α du TCR a permis d'amplifier un fragment d'environ 800 pb, alors qu'une seule des amorces pour la chaîne β, a permis d'amplifier un fragment d'environ 950 pb, correspondant au gène C_β 2.

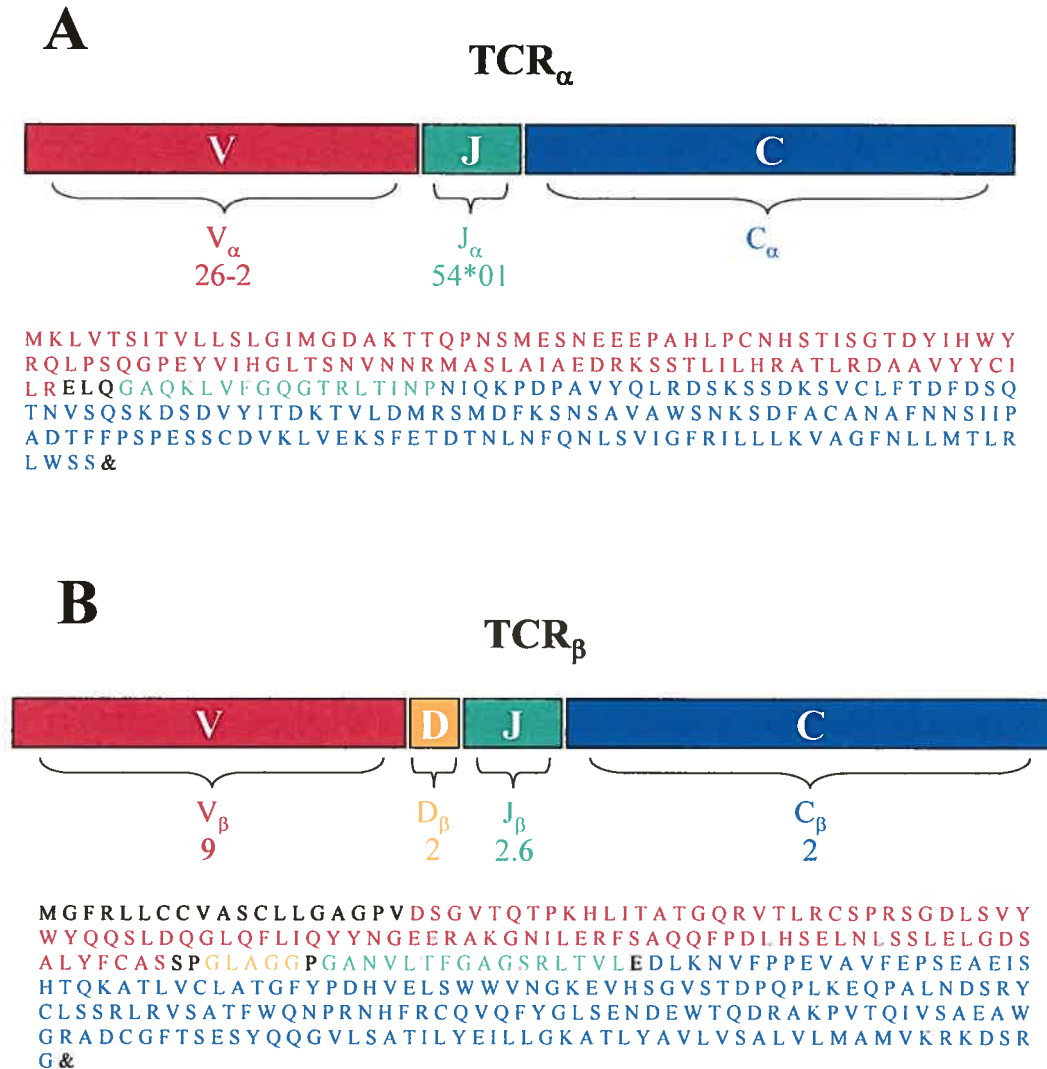


Figure 2 Structure et séquence des gènes du TCR

A. Représentation schématique des gènes de la chaîne α du TCR, identification des segments géniques V_{α} 26-2 et J_{α} 54*01 du domaine variable et séquence complète correspondant à la protéine.

B. Représentation schématique des gènes de la chaîne β du TCR, identification des segments géniques V_{β} 9, D_{β} 2 et J_{β} 2.6 du domaine variable et C_{β} 2 du domaine constant et séquence complète correspondant à la protéine.

CHAPITRE 4. DISCUSSION

4.1 Sommaire des résultats et pertinence du projet par rapport au domaine de l'immunothérapie

L'immunothérapie consiste en la stimulation du système immunitaire pour cibler et éliminer les cellules tumorales. Le principe est basé sur le fait que les cellules tumorales expriment des AT qui sont absents ou faiblement exprimés dans les tissus normaux. Ces AT peuvent être présentés aux lymphocytes T CD8⁺ par les molécules du CMH de classe I, ainsi qu'aux lymphocytes T CD4⁺ par les molécules du CMH de classe II.

Plusieurs études ont démontré que la présentation par les molécules du CMH de classe II jouait un rôle critique dans l'immunité anti-tumorale (Velders et al., 2003; Gerloni and Zanetti M., 2005). Il a aussi été démontré que certaines protéines endogènes pouvaient atteindre les compartiments de la voie endocytaire et les MIIC, et ainsi être présentées par les molécules du CMH de classe II, de façon similaire aux protéines exogènes (Nuchtern et al., 1990; Jaraquemada et al., 1990). D'ailleurs, des études précédentes ont suggéré que gp100 endogène pouvait être présenté par les molécules du CMH de classe II et ainsi stimuler des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques (Lapointe et al., 2001; Lapointe et al., 2004).

Lors de mon projet de maîtrise, je me suis donc intéressée à la présentation de gp100 endogène par les molécules du CMH de classe II, ainsi qu'à sa mobilisation vers les compartiments de la voie endocytaire et les MIIC. Plus spécifiquement, le principal objectif de mon projet consistait à identifier des séquences dans gp100 qui permettent cette mobilisation et cette présentation. Nous avons donc confirmé la présentation de gp100 par les molécules du CMH de classe II et sa mobilisation vers les MIIC, lorsqu'il est exprimé de façon endogène. Puis, nous avons identifié certaines séquences de gp100 qui étaient importantes pour la mobilisation vers les MIIC et la présentation par les molécules du CMH de classe II. Finalement, nous

avons confirmé leur fonction en fusionnant ces séquences à la GFP et à des épitopes de classe I et de classe II.

Ces travaux nous ont donc permis d'identifier des séquences de mobilisation vers les endosomes/MIIC, favorisant ainsi la présentation par les molécules du CMH de classe II, qui pourront éventuellement être exploitées dans de futures stratégies d'immunothérapie.

4.2 Présentation par les molécules du CMH de classe II

4.2.1 Présentation des antigènes du mélanome

La présentation de protéines endogènes par des molécules du CMH de classe II a déjà été évoquée, spécialement dans le mélanome. D'ailleurs, il a été démontré qu'entre 20 et 50% des mélanomes expriment des molécules du CMH de classe II (Lopez-Nevot et al., 1988; Brocker et al., 1984; Bernsen et al., 2003). De plus, plusieurs groupes ont identifié des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques aux antigènes du mélanome, tel que la protéine tyrosinase (Topalian et al., 1994a; Yee et al., 1996; Kobayashi et al., 1998). Des épitopes présentés par les molécules du CMH de classe II et reconnus par des lymphocytes T CD4⁺ ont aussi été identifiés chez d'autres protéines des mélanosomes, dont gp100 (Touloukian et al., 2000; Lapointe et al., 2001), TRP-1 et TRP-2 (Robbins et al., 2002). Ces études indiquent que la présentation de ces protéines par les molécules du CMH de classe II est possible, et suggèrent donc une mobilisation de ces protéines vers la voie d'apprêtement endocytaire et les MIIC.

Les antigènes du mélanome sont essentiellement retrouvés dans les mélanosomes. Puisque les endosomes/lysosomes, les MIIC et les mélanosomes sont des compartiments qui ont des caractéristiques très similaires (Raposo and Marks, 2002; Zhou et al., 1993), il pourrait donc être possible que ces antigènes puissent atteindre les MIIC par la voie des endosomes et ainsi être présentés par les molécules

du CMH de classe II. Par contre, il est aussi possible que ces antigènes soient présentés par des CPA qui auraient phagocyté des cellules de mélanomes. Toutefois, nous avons clairement démontré que des cellules qui exprimaient gp100 de façon endogène pouvaient présenter des peptides par les molécules du CMH de classe II (Chapitre 2 : Figure 1). De plus, nos résultats démontrent la mobilisation de gp100 endogène vers les endosomes et les MIIC (Chapitre 2 : Figures 2 et 5).

La protéine tyrosinase est aussi connue pour atteindre les compartiments de la voie des endosomes/lysosomes (Calvo et al., 1999; Simmen et al., 1999). Puisque qu'il est possible de générer des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques à tyrosinase, il est donc envisageable que la protéine tyrosinase endogène soit aussi apprêtée pour la présentation par les molécules du CMH de classe II. Lors d'une étude précédente, le Dr Réjean Lapointe a généré 2 clones de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques, pour 2 différents épitopes de tyrosinase, en utilisant un lysat d'une lignée de mélanome chargé sur des CD40-B (Lapointe et al., 2003). Donc, au cours de mon projet, nous avons utilisé ces clones pour évaluer la présentation de la protéine tyrosinase par les molécules du CMH de classe II. Nos résultats ont suggéré que la protéine tyrosinase endogène ne serait pas apprêtée de façon naturelle pour la présentation par les molécules du CMH de classe II. En effet, contrairement au clone de lymphocytes T CD4⁺ spécifique pour gp100, les clones spécifiques à tyrosinase étaient incapable de reconnaître des cellules cibles qui exprimaient la protéine tyrosinase de façon endogène (résultats non présentés).

Cette distinction pourrait avoir plusieurs explications possibles, dont une différence au niveau de la glycosylation de ces protéines, modifiant ainsi leur mobilisation intracellulaire. D'ailleurs, une étude du groupe du Dr Suzanne Topalian a démontré que certaines glycosylations de la protéine tyrosinase étaient nécessaires à l'apprêtement de peptides exogènes pour la présentation par les molécules du CMH de classe II (Housseau et al., 2001). Puisque les protéines exogènes et endogènes ne semblent pas emprunter les mêmes voies pour leur apprêtement par les molécules du CMH de classe II, il est donc probable que les glycosylations de la protéine

tyrosinase puissent nuire à son apprêtement pour la présentation par les molécules du CMH de classe II, lorsqu'elle est exprimée de façon endogène.

Il a également été démontré par certaines études sur la mobilisation des protéines des mélanosomes, que gp100 semblait atteindre les prémélanosomes selon une voie et un mécanisme distinct de la protéine tyrosinase et des autres protéines des mélanosomes (Vijayasaradhi, 2000). Cette mobilisation différente de gp100 peut possiblement expliquer son apprêtement par les molécules du CMH de classe II, et peut-être aussi son expression en surface, qui ne semble pas possible pour les autres protéines des mélanosomes, telle que la protéine tyrosinase.

Nous avons aussi tenté de favoriser la mobilisation de la protéine tyrosinase vers les MIIC par une fusion avec les séquences de mobilisation de gp100, en espérant ainsi favoriser sa présentation par les molécules du CMH de classe II. Malheureusement, le résultat s'est avéré négatif (résultat non présenté).

4.2.2 Voies de mobilisation vers les MIIC

De façon générale, on peut décrire 2 voies majeures par lesquelles les protéines peuvent atteindre les compartiments de la voie d'apprêtement endocytaire et les MIIC, pour être apprêtées par les molécules du CMH de classe II : une voie exogène et une voie endogène.

La voie exogène est la voie classique qui implique l'endocytose ou la phagocytose de protéines exogènes, par les CPA. Une fois internalisées, les protéines sont dirigées vers les compartiments de la voie d'apprêtement endocytaire et les MIIC, où elles sont apprêtées par les molécules du CMH de classe II.

Toutefois, des études portant sur différentes protéines virales ont aussi permis de définir une seconde voie impliquant l'apprêtement de protéines membranaires synthétisées de façon endogène (Eisenlohr and Hackett, 1989; Polydefkis et al.,

1990). Ces études ont d'ailleurs démontré que ces protéines membranaires atteignaient les compartiments de la voie endocytaire par une internalisation de la surface cellulaire. Il semble que les peptides dérivant de ces protéines seraient principalement chargés sur des molécules du CMH de classe II récupérées de la surface cellulaire. Puisque nous avons démontré que gp100 était exprimé à la surface (Chapitre 2 : Figure 3-E), il est donc possible que gp100 puisse atteindre les MIIC par cette même voie. D'autres expériences pourraient donc être envisagées, en bloquant d'abord la récupération des protéines de la surface cellulaire.

4.3 Mobilisation de gp100

Jusqu'à maintenant, l'expression de gp100 a principalement été retrouvée dans les prémélanosomes stade I et stade II (Raposo et al., 2001; Kushimoto et al., 2001; Watabe et al., 2004), et certaines études ont aussi démontré sa présence dans les compartiments de la voie endocytaire (Raposo et al., 2001). La présence de gp100 dans les endosomes a d'ailleurs déjà été rapportée précédemment comme une évidence que gp100 emprunte la voie des endosomes pour atteindre les prémélanosomes stade I (Berson et al., 2001; Raposo and Marks, 2002). Une étude plus récente démontre que gp100 subit une glycosylation dans le RE et est ensuite transporté à travers le golgi vers la voie des endosomes, pour atteindre les prémélanosomes stade I (Yasumoto et al., 2004). Donc, gp100 pourrait aussi possiblement accéder aux compartiments de la voie d'apprêtement endocytaire et les MIIC, par une voie similaire. Cependant, d'autres études ont émis des hypothèses différentes, en évoquant la possibilité que gp100 passe directement du RE aux prémélanosomes stade I (Kushimoto et al., 2001). L'utilisation de différents anticorps spécifiques à gp100 ciblant différentes régions de la protéine (Adema et al., 1994; Adema et al., 1996), peut possiblement expliquer les données contradictoires concernant la mobilisation intracellulaire de gp100.

Par ailleurs, nous avons démontré, par nos résultats, que gp100 pouvait aussi être exprimé à la surface, suggérant ainsi que gp100 pourrait atteindre les

compartiments de la voie d'apprêtement endocytaire et les MIIC, par une internalisation de la surface cellulaire. En effet, nous avons observé une expression de gp100 à la surface cellulaire, en cytométrie de flux, dans des cellules 293T transfectées par gp100 (Chapitre 2 : Figure 3-E), en utilisant un anticorps ciblant apparemment un épitope de gp100 exposé à la surface (NK1; partiellement confirmé par (Yasumoto et al., 2004)). Le Dr Graça Raposo a d'ailleurs déjà évoqué la possibilité d'une transition de gp100 par la surface cellulaire pour permettre son internalisation dans la voie des endosomes (Raposo et al., 2001; Raposo and Marks, 2002). De plus, nous avons observé une corrélation entre l'expression en surface de certains mutants de gp100 et leur présentation par les molécules du CMH de classe II (Chapitre 2 : Figure 3-B), suggérant que la mobilisation de gp100 à la surface cellulaire pourrait avoir un rôle dans sa présentation par les molécules du CMH de classe II. Nous avons aussi démontré que cette expression de gp100 en surface n'était pas due à une surexpression de gp100, causée par la transfection, puisque plusieurs lignées de mélanomes que nous avons aussi analysées exprimaient gp100 à la surface (Chapitre 2 : Figure 4).

Nos résultats suggèrent donc que gp100 peut atteindre les MIIC, en empruntant la voie des endosomes, soit en transitant par le golgi, soit en transitant par la surface cellulaire.

4.4 Motifs de gp100

L'étude de la séquence de gp100 nous a permis d'identifier certains motifs ou séquences qui pouvaient sembler importants pour la mobilisation de gp100 et sa présentation par les molécules du CMH de classe II.

4.4.1 Domaine transmembranaire

Gp100 est une protéine transmembranaire des mélanosomes constituée d'un domaine transmembranaire, se situant en carboxy-terminal de la protéine. Il semble

donc évident que le domaine transmembranaire joue un rôle essentiel dans la localisation de la protéine. En effet, nous avons démontré qu'il était essentiel à la localisation dans les endosomes, puisque sans domaine transmembranaire, gp100 ne semble pas avoir de localisation précise dans la cellule (Chapitre 2 : Figure 5-A), mais qu'il était également essentiel à la présentation par les molécules du CMH de classe II (Chapitre 2 : Figure 3-A).

Ces résultats semblaient d'abord suggérer que le domaine transmembranaire de gp100 pouvait contenir des motifs particuliers qui permettaient la mobilisation de la protéine, non seulement vers les mélanosomes, mais aussi vers les endosomes et les MIIC pour permettre la présentation par les molécules du CMH de classe II. Cependant, la substitution du domaine transmembranaire de gp100 par celui d'une autre protéine membranaire, soit la protéine CD8 (gp100-CD8), n'affectait ni la présentation par les molécules du CMH de classe II (Chapitre 2 : Figure 3-A), ni la mobilisation vers les endosomes (Chapitre 2 : Figure 5-A). Donc, ces résultats pourraient plutôt suggérer que la présence d'un simple domaine transmembranaire serait suffisante pour médier la mobilisation de gp100 vers la voie d'apprêtement endocytaire. Par contre, si le domaine transmembranaire était le seul responsable de ce processus, toutes les protéines membranaires pourraient être présentées par les molécules du CMH de classe II, lorsqu'elles sont exprimées de façon endogène; ce qui ne semble pas être le cas.

Nous avons donc analysé d'autres séquences dans la région proximale du domaine transmembranaire, en carboxy-terminal de la protéine, dont un motif di-leucine potentiel.

4.4.2 Motif di-leucine potentiel

En plus du domaine transmembranaire, la région en carboxy-terminal de gp100 contient une courte séquence (ENSPLL) pouvant s'apparenter à un motif di-leucine de signallement lysosomal, retrouvé chez certaines glycoprotéines des

mélanosomes, dont la protéine tyrosinase (EKQPLL) (Simmen et al., 1999; Calvo et al., 1999) et TRP-1 (EANQPLL) (Vijayasradhi et al., 1995). Ce motif di-leucine a été décrit comme étant impliqué dans la mobilisation de certaines protéines vers les mélanosomes, mais aussi vers la voie d'apprêtement endocytaire et les MIIC (Wang et al., 1999). Par contre, le motif di-leucine potentiel de gp100 n'a jamais vraiment été étudié.

Les études précédentes sur le motif di-leucine pourraient suggérer qu'une délétion du motif similaire dans gp100 pouvait empêcher la mobilisation de la protéine vers les endosomes/MIIC et ainsi diminuer sa présentation par les molécules du CMH de classe II. Cependant, les résultats présentés aux Figures 3 et 5 du chapitre 2 démontrent le contraire. En effet, la protéine gp100- Δ LL semble être aussi bien mobilisée vers les endosomes que le gp100 sauvage, et être présentée par les molécules du CMH de classe II, de façon similaire. Nos résultats pourraient donc suggérer que ce motif ne serait pas fonctionnel chez gp100, malgré le fait qu'il corresponde à la séquence consensus du motif di-leucine (Vijayasradhi et al., 1995).

Toutefois, la région entourant le motif di-leucine de gp100 ne cadre pas tout à fait avec la région entourant le motif di-leucine caractérisé chez les protéines tyrosinase et TRP-1, qui est précédé d'une région basique, riche en arginine, et suivi d'une région contenant des résidus acides et des résidus tyrosine, qui semblent avoir leur importance (Calvo et al., 1999). En effet, ces régions ne se retrouvent pas chez gp100. De plus, contrairement aux autres motifs di-leucine, celui de gp100 est situé complètement à l'extrémité de la région en carboxy-terminal de la protéine. En considérant ces informations et nos résultats, nous pouvons donc considérer que le présumé motif di-leucine de gp100 n'est pas critique ni pour la mobilisation vers les endosomes/MIIC, ni pour la présentation par les molécules du CMH de classe II, de gp100 endogène.

Par contre la délétion du motif di-leucine de gp100 semble augmenter l'expression de la protéine à la surface cellulaire. En effet, les images en microscopie

confocal révèlent une plus grande quantité de gp100- Δ LL à la surface. De plus, les analyses en cytométrie de flux semblent démontrer une augmentation de l'expression de gp100- Δ LL en surface, par rapport au gp100 sauvage, puisque le pourcentage de cellules positives pour l'expression de gp100 en surface est supérieur. Ces résultats pourraient, entre autres, suggérer que gp100- Δ LL pourrait transiter davantage par la surface cellulaire pour atteindre les MIIC, plutôt qu'en empruntant directement la voie des endosomes/lysosomes. Nous n'avons malheureusement pas investigué davantage cette hypothèse. Cependant, nos résultats pourraient potentiellement suggérer que le motif di-leucine de gp100 agirait davantage en signal de rétention endosomiale plutôt qu'en signal de mobilisation endosomiale.

4.4.3 Signaux de mobilisation vers les MIIC

En analysant plus en détail la séquence en carboxy-terminal de gp100, plus particulièrement les résidus à proximité du domaine transmembranaire, nous y avons retrouvé d'autres motifs ou séquences qui ont des similarités avec certains signaux de mobilisation connus chez d'autres protéines. D'ailleurs, les résidus situés immédiatement après le domaine transmembranaire (inclus dans la séquence YV délétée dans le mutant gp100- Δ YV) semblaient plus susceptibles d'avoir un rôle critique. En effet, cette séquence contient un résidu tyrosine, qui semble avoir une importance dans les signaux de mobilisation vers les lysosomes chez certaines protéines lysosomiales, dont LAMP-1 (Williams and Fukuda, 1990; Peters et al., 1990). Plus spécifiquement, ce signal de mobilisation lysosomiale forme le motif Y-X-X-résidu hydrophobique, retrouvé dans la queue cytoplasmique de la protéine (Guarnieri et al., 1993). Ce signal de mobilisation a d'ailleurs déjà été utilisé pour diriger une protéine cytoplasmique vers les compartiments de la voie endocytaire, et conséquemment favoriser la présentation de peptides par les molécules du CMH de classe II et la stimulation de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques (Wu et al., 1995).

Gp100 contient aussi une séquence similaire à ce motif. En effet, le résidu tyrosine, suivant le domaine transmembranaire, est suivi de 3 résidus arginines

consécutifs, suivi d'un résidu hydrophobique, une leucine (Y-R-R-R-L). Cependant, la délétion de cette séquence (gp100 Δ YV) n'affecte pas la présentation de gp100 par les molécules du CMH de classe II (Chapitre 2 : Figure 3-A).

Donc, la séquence YV contient une série de 3 arginines consécutives. Un motif similaire (RXR) a été identifié dans certaines études comme étant un signal de rétention dans le RE (Schutze et al., 1994; Standley et al., 2000), mais aussi connu pour jouer un rôle important dans la mobilisation de plusieurs protéines membranaires vers la surface cellulaire (Xia et al., 2001). En fait, l'inactivation de ce signal permet le passage de ces protéines vers le golgi, et donc l'accès à la membrane. Puisque gp100 peut être exprimé à la surface cellulaire, il est possible que ce motif particulier joue un rôle dans la mobilisation de gp100 en surface. Cependant, nos résultats démontrent que la délétion de ce motif n'affecte pas la mobilisation de gp100 (Chapitre 2 : Figure 3-B).

En fait, la délétion de la séquence YV, ne semble pas avoir d'effet, ni sur la mobilisation de gp100 vers les endosomes (Chapitre 2 : Figure 5-A), ni sur sa présentation par les molécules du CMH de classe II (Chapitre 2 : Figure 3-A). Par contre, la délétion de cette séquence, associée avec la substitution du domaine transmembranaire par celui de CD8 (gp100- Δ YVCD8), bloque la mobilisation de gp100 vers les endosomes (Chapitre 2 : Figure 5-A) et diminue considérablement sa présentation par les molécules du CMH de classe II (Chapitre 2 : Figure 3-A). Le défaut dans la mobilisation de la protéine gp100- Δ YVCD8 et dans sa présentation par les molécules du CMH de classe II pourrait possiblement être causé par un repliement inapproprié de la protéine. Par contre, ceci pourrait aussi suggérer l'implication de certains résidus importants dans la séquence YV (les résidus 616 à 627) de gp100 qui pourraient avoir un rôle avec le domaine transmembranaire spécifique de gp100 dans la présentation de la protéine endogène par les molécules du CMH de classe II. Cependant, ces deux séquences ne sembleraient pas absolument requises simultanément, pour permettre la présentation par les molécules du CMH de classe II.

D'autres protéines des compartiments de la voie endocytaire ont aussi été étudiées, dont la chaîne invariante (Ii). La Ii est une protéine qui s'associe avec les molécules du CMH de classe II pour prévenir la fixation prématurée de peptides et diriger le complexe vers les MIIC (Cresswell, 1994; Cresswell, 1996). Plusieurs études ont donc été effectuées sur la mobilisation de la Ii vers les MIIC et sur les signaux responsables de cette mobilisation (Freisewinkel et al., 1993; Bijlmakers et al., 1994; Romagnoli and Germain, 1994; Sanderson et al., 1995), et plusieurs signaux ont d'ailleurs été identifiés. L'ensemble de ces études semble ainsi proposer que la mobilisation vers les MIIC pourrait dépendre de plusieurs séquences spécifiques en amino-terminal de la Ii.

C'est aussi ce que nous semblons observer pour gp100. En effet, nos résultats suggèrent fortement la possibilité que plus d'une séquence pourraient avoir un rôle à jouer dans la mobilisation de gp100 vers les MIIC.

4.5 Conclusions

Notre principal objectif était d'identifier des séquences de gp100 permettant la mobilisation vers les endosomes/MIIC de gp100 endogène et sa présentation par les molécules du CMH de classe II.

Nous avons d'abord confirmé que gp100 exogène et endogène pouvait être présentés par les molécules du CMH de classe II. Nous avons aussi démontré que gp100 endogène pouvait atteindre les endosomes/MIIC LAMP-1⁺/HLA-DR⁺ afin d'être apprêté pour la présentation par les molécules du CMH de classe II. Nos résultats démontrent que la séquence signal en amino-terminal ainsi que les 70 derniers résidus en carboxy-terminal, incluant le domaine transmembranaire, étaient essentiels pour la mobilisation vers les endosomes et les MIIC et pour la présentation par les molécules du CMH de classe II, de gp100 endogène. Nous avons aussi démontré que l'expression en surface de gp100 corrélait avec sa présentation par les molécules du CMH de classe II, suggérant une transition par la surface cellulaire

précédant une internalisation vers les compartiments de la voie d'apprêtement endocytaire.

Finalement nous avons utilisé les séquences de mobilisation de gp100 pour mobiliser GFP, comme modèle de protéine endogène, vers les endosomes. Nous avons aussi utilisé ces séquences afin de favoriser la présentation d'épitopes de gp100 par les molécules du CMH de classe II et de classe I, par des cellules de mélanomes, des CPA et des cellules non présentatrices.

Conséquemment, nous espérons avoir contribué à la caractérisation de la présentation de protéines endogènes par les molécules du CMH de classe II, ainsi que la mobilisation vers les endosomes/MIIC menant à cette présentation.

4.6 Perspectives et potentiel d'exploitation

4.6.1 Caractérisation d'antigènes

Nous avons démontré que les séquences de mobilisation de gp100 pouvaient cibler un antigène endogène, soit GFP, dans les endosomes et permettre la présentation d'épitopes, à la fois par les molécules du CMH de classe I et II.

À court terme, il serait intéressant d'utiliser ces séquences avec d'autres AT qui ne sont pas présentés par les molécules du CMH de classe II, soit pour identifier des épitopes reconnus par des lymphocytes T CD4⁺, soit pour promouvoir la stimulation de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, *in vitro*. D'ailleurs, un des principaux objectifs de notre laboratoire est d'identifier de nouveaux AT potentiels pour l'immunothérapie tumorale pour le cancer du sein, du rein et du poumon. Une des méthodes utilisées est de stimuler la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques, en présence de CD40-B chargées avec du lysat tumoral. Une fois qu'un antigène spécifique sera identifié, les séquences de gp100 pourront donc être greffées à différentes régions de cet antigène pour favoriser la présentation de peptides de ces régions, par les molécules du CMH de classe II. De plus, cette méthode permettra

d'effectuer l'identification d'épitopes de façon beaucoup moins coûteuse que la synthèse de peptide.

4.6.2 Vaccination

À long terme, les séquences de mobilisation de gp100 pourront aussi être exploitées en clinique, pour optimiser les réponses des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dirigées contre des antigènes tumoraux et viraux, et pour l'amélioration des vecteurs d'expression utilisés en immunothérapie. Par exemple, ces séquences pourraient être incluses dans des cassettes d'expression pour des vaccins d'ADN ou fusionnées directement à des protéines, et ainsi optimiser la présentation d'antigènes par les molécules du CMH de classe I et de classe II.

4.6.3 Présence de gp100 à la surface

Nous avons aussi démontré que gp100 était exprimé à la surface cellulaire de certaines lignées de mélanomes. Il serait donc intéressant d'analyser cette expression de gp100 en surface dans des échantillons cliniques, et d'en comparer l'expression avec des mélanocytes normaux. Si, effectivement, gp100 est exprimé à la surface des cellules tumorales, mais pas des cellules normales, de nouvelles possibilités de traitements pourraient être envisageables, entre autres, des stratégies thérapeutiques impliquant des anticorps spécifiques ciblant des épitopes de gp100 exprimés en surface. De plus, il serait intéressant de pouvoir comparer l'expression de gp100 en surface et sa présentation par les molécules du CMH de classe II, dans des lignées de mélanomes et dans des échantillons cliniques.

CHAPITRE 5. BIBLIOGRAPHIE

1. **Aarnoudse, C. A., Krüse, M., Konopitzky, R., Brouwenstijn, N., and Schrier, P. I.** (2002). TCR reconstitution in Jurkat reporter cells facilitates the identification of novel tumor antigens by cDNA expression cloning. *Int.J.Cancer* *99*, 7-13.
2. **Ackerman, A. L. and Cresswell, P.** (2004). Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat.Immunol.* *5*, 678-684.
3. **Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampe, R., and Cresswell, P.** (2003). Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross-presentation of exogenous antigens. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.* *100*, 12889-12894.
4. **Adema, G. J., Bakker, A. B. H., de Boer, A. J., Hohenstein, P., and Figdor, C. G.** (1996). pMel17 is recognised by monoclonal antibodies NKI-beteb, HMB-45 and HMB-50 and by anti-melanoma CTL. *Br.J.Cancer* *73*, 1044-1048.
5. **Adema, G. J., de Boer, A. J., Vogel, A. M., Loenen, W. A. M., and Figdor, C. G.** (1994). Molecular characterization of the melanocyte lineage-specific antigen gp100. *J.Biol.Chem.* *269*, 20126-20133.
6. **Albert, M. L., Sauter, B., and Bhardwaj, N.** (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* *392*, 86-89.
7. **Albino, A. P. and Houghton, A. N.** (1985). Cell surface antigens of melanocytes and melanoma. *Cancer Surv.* *4*, 185-211.
8. **Almeida, A. R. M., Legrand, N., Papiernik, M., and Freitas, A. A.** (2002). Homeostasis of peripheral CD4(+) T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4(+) T cell numbers. *J.Immunol.* *169*, 4850-4860.
9. **Annacker, O., Pimenta-Araujo, R., Burlen-Defranoux, O., Barbosa, T. C., Cumano, A., and Bandeira, A.** (2001). CD25(+) CD4(+) T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J.Immunol.* *166*, 3008-3018.
10. **Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J., and Hafler, D. A.** (2001). CD4+CD25(high) regulatory cells in human peripheral blood. *J.Immunol.* *167*, 1245-1253.

11. **Bakker, A. B., Schreurs, M. W., de Boer, A. J., Kawakami, Y., Rosenberg, S. A., Adema, G. J., and Figdor, C. G.** (1994). Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J.Exp.Med.* *179*, 1005-1009.
12. **Bakker, A. B. H., Schreurs, M. W. J., Tafazzul, G., Deboer, A. J., Kawakami, Y., Adema, G. J., and Figdor, C. G.** (1995). Identification of a novel peptide derived from the melanocyte-specific gp100 antigen as the dominant epitope recognized by an HLA-A2.1-restricted anti-melanoma CTL line. *Int.J.Cancer* *62*, 97-102.
13. **Beck, S. and Trowsdale, J.** (2000). The human major histocompatibility complex: Lessons from the DNA sequence. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* *1*, 117-137.
14. **Benlalam, H., Labarriere, N., Linard, B., Derre, L., Diez, E., Pandolfino, M. C., Bonneville, M., and Jotereau, F.** (2001). Comprehensive analysis of the frequency of recognition of melanoma-associated antigen (MAA) by CD8 melanoma infiltrating lymphocytes (TIL): implications for immunotherapy. *Eur.J.Immunol.* *31*, 2007-2015.
15. **Bernsen, M. R., Hakansson, L., Gustafsson, B., Krysanter, L., Rettrup, B., Ruiter, D., and Hakansson, A.** (2003). On the biological relevance of MHC class II and B7 expression by tumour cells in melanoma metastases. *Br.J.Cancer* *88*, 424-431.
16. **Berson, J. F., Harper, D. C., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M. S.** (2001). Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Mol.Biol.Cell* *12*, 3451-3464.
17. **Berson, J. F., Theos, A. C., Harper, D. C., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M. S.** (2003). Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J.Cell Biol.* *161*, 521-533.
18. **Bevan, M. J.** (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.
19. **Bhatnagar, V., Anjiah, S., Puri, N., Darshanam, B. N. A., and Ramaiah, A.** (1993). pH of melanosomes of B-16 murine melanoma is acidic: Its physiological importance in the regulation of melanin biosynthesis. *Arch.Biochem.Biophys.* *307*, 183-192.
20. **Bijlmakers, M. J. E., Benaroch, P., and Ploegh, H. L.** (1994). Mapping functional regions in the luminal domain of the class II-associated invariant chain. *J.Exp.Med.* *180*, 623-629.

21. **Blankenstein, T.** (2005). The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. *Curr.Opin.Immunol.* 17, 180-186.
22. **Boon, T.** (1993). Tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes: present perspectives for specific immunotherapy. *Int.J.Cancer* 54, 177-180.
23. **Boon, T., Coulie, P. G., and Van Den Eynde, B.** (1997). Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol.Today* 18, 267-268.
24. **Boon, T. and Van Der Bruggen, P.** (1996). Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 183, 725-729.
25. **Brocker, E. B., Suter, L., and Sorg, C.** (1984). HLA-DR antigen expression in primary melanomas of the skin. *J.Invest.Dermatol.* 82, 244-247.
26. **Butcher, E. C. and Picker, L. J.** (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272, 60-66.
27. **Bystryrn, J. C., Darrell, R., Friedman, R. J., and Kopf, A.** (1987). Prognostic significance of hypopigmentation in malignant melanoma. *Arch.Dermatol.* 123, 1053-1055.
28. **Calvo, P. A., Frank, D. W., Bieler, B. M., Berson, J. F., and Marks, M. S.** (1999). A cytoplasmic sequence in human tyrosinase defines a second class of di-leucine-based sorting signals for late endosomal and lysosomal delivery. *J.Biol.Chem.* 274, 12780-12789.
29. **Castelli, C., Rivoltini, L., Andreola, G., Carrabba, M., Renkvist, N., and Parmiani, G.** (2000). T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *J.Cell.Physiol.* 182, 323-331.
30. **Castelli, C., Tarsini, P., Mazzocchi, A., Rini, F., Rivoltini, L., Ravagnani, F., Gallino, F., Belli, F., and Parmiani, G.** (1999). Novel HLA-Cw8-restricted T cell epitopes derived from tyrosinase-related protein-2 and gp100 melanoma antigens. *J.Immunol.* 162, 1739-1748.
31. **Chaperot, L., Delfau-Larue, M. H., Jacob, M. C., Molens, J. P., Roussel, B., Agrawal, S., Farcet, J. P., Gressin, R., Sotto, J. J., Bensa, J. C., and Plumas, J.** (1999). Differentiation of antitumor-specific cytotoxic T lymphocytes from autologous tumor infiltrating lymphocytes in non-Hodgkin's lymphomas. *Exp.Hematol.* 27, 1185-1193.
32. **Chaux, P., Vantomme, V., Coulie, P., Boon, T., and Van Der Bruggen, P.** (1998). Estimation of the frequencies of anti-MAGE-3 cytolytic T-lymphocyte precursors in blood from individuals without cancer. *Int.J.Cancer* 77, 538-542.

33. **Chen, P. W., Ullrich, S. E., and Ananthaswamy, H. N.** (1994). Presentation of endogenous tumor antigens to CD4+ T lymphocytes by murine melanoma cells transfected with major histocompatibility complex class II genes. *J.Leuk.Biol.* 56, 469-474.
34. **Chen, X. J. and Jensen, P. E.** (2004). The expression of HLA-DO (H2-0) in B lymphocytes. *Immunol.Res.* 29, 19-28.
35. **Chicz, R. M., Urban, R. G., Gorga, J. C., Vignali, D. A., Lane, W. S., and Strominger, J. L.** (1993). Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J.Exp.Med.* 178, 27-47.
36. **Clay, T. M., Custer, M., Sachs, J., Hwu, P., Rosenberg, S. A., and Nishimura, M.** (1999). Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. *J.Immunol.* 163, 507-513.
37. **Clemente, C. G., Mihm, M. G., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., and Cascinelli, N.** (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77, 1303-1310.
38. **Coley, W. B.** (1991). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of 10 original cases. 1893. *Clin.Orthop.Relat.Res.* Jan, 3-11.
39. **Colucci, F., Di Santo, J. P., and Leibson, P. J.** (2002). Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? *Nat.Immunol.* 3, 807-813.
40. **Cormier, J. N., Hijazi, Y. M., Abati, A., Fetsch, P., Bettinotti, M., Steinberg, S. M., Rosenberg, S. A., and Marincola, F. M.** (1998). Heterogeneous expression of melanoma-associated antigens and HLA-A2 in metastatic melanoma in vivo. *Int.J.Cancer* 75, 517-524.
41. **Corthay, A., Skovseth, D. K., Lundin, K. U., Rosjo, E., Omholt, H., Hofgaard, P. O., Haraldsen, G., and Bogen, B.** (2005). Primary antitumor immune response mediated by CD4(+) T cells. *Immunity* 22, 371-383.
42. **Cox, A. L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R. A., Darrow, T. L., Shabanowitz, J., Engelhard, V. H., Hunt, D. F., and Slingsluff, C. L.** (1994). Identification of a peptide recognized by 5 melanoma-specific human cytotoxic T-cell lines. *Science* 264, 716-719.
43. **Cresswell, P.** (1994). Assembly, transport, and function of MHC class-II molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 12, 259-293.

44. **Cresswell, P.** (1996). Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84, 505-507.
45. **Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T., and Diedrich, G.** (1999). The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol.Rev.* 172, 21-28.
46. **De Plaen, E., Lurquin, C., Van Pel, A., Mariamé, B., Szikora, J. P., Wölfel, T., Sibille, C., Chomez, P., and Boon, T.** (1988). Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.* 85, 2274-2278.
47. **Denzin, L. K. and Cresswell, P.** (1995). HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82, 155-165.
48. **Denzin, L. K., Sant'Angelo, D. B., Hammond, C., Surman, M. J., and Cresswell, P.** (1997). Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing. *Science* 278, 106-109.
49. **Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hübicki, A. M., Robinson, M. R., Raffeld, M., Duray, P., Seipp, C. A., Rogers-Freezer, L., Morton, K. E., Mavroukakis, S. A., White, D. E., and Rosenberg, S. A.** (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854.
50. **Eberlein, T. J., Rosenstein, M., Spiess, P. J., and Rosenberg, S. A.** (1982). Generation of long term T-lymphoid cell lines with specific cytotoxic reactivity for a syngeneic murine lymphoma. *J.Natl Cancer Inst.* 69, 109-116.
51. **Eisenlohr, L. C. and Hackett, C. J.** (1989). Class II major histocompatibility complex-restricted T cells specific for a virion structural protein that do not recognize exogenous influenza virus: Evidence that presentation of labile T cell determinants is favored by endogenous antigen synthesis. *J.Exp.Med.* 169, 921-931.
52. **Folch, G., Scaviner, D., Contet, V., and Lefranc, M. P.** (2000). Protein displays of the human T cell receptor alpha, beta, gamma and delta variable and joining regions. *Exp.Clin.Immunogenet.* 17, 205-215.
53. **Freisewinkel, I. M., Schenck, K., and Koch, N.** (1993). The segment of invariant chain that is critical for association with major histocompatibility complex class-II molecules contains the sequence of a peptide eluted from class-II polypeptides. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.* 90, 9703-9706.
54. **Garcia, K. C., Teyton, L., and Wilson, L. A.** (1999). Structural basis of T cell recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 17, 369-397.

55. **Gerloni, M. and Zanetti M.** (2005). CD4 T cells in tumor immunity. *Springer Semin.Immunopathol.* 27, 37-48.
56. **Germain, R. N.** (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76, 287-299.
57. **Goldsby,R.A., Kindt,T.J., and Osborne,B.A.** (2001). *Immunologie : Le cours de Janis Kuby* (Paris: Dunod).
58. **Griffin, J. P., Chu, R., and Harding, C. V.** (1997). Early endosomes and a late endocytic compartment generate different peptide-class II MHC complexes via distinct processing mechanisms. *J.Immunol.* 158, 1523-1532.
59. **Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z., and Rosenberg, S. A.** (1982). The lymphokine activated killer cell phenomenon: Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2- activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J.Exp.Med.* 155, 1823-1841.
60. **Guarnieri, F. G., Arterburn, L. M., Penno, M. B., Cha, Y., and August, J. T.** (1993). The motif Tyr-X-X-Hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein-1. *J.Biol.Chem.* 268, 1941-1946.
61. **Guermontprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., van Endert, P., and Amigorena, S.** (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397-402.
62. **Guilloux, Y., Lucas, S., Brichard, V. G., Van Pel, A., Viret, C., De Plaen, E., Bresseur, F., Lethe, B., Jotereau, F., and Boon, T.** (1996). A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *J.Exp.Med.* 183, 1173-1183.
63. **Halder, T., Pawelec, G., Kirkin, A. F., Zeuthen, J., Meyer, H. E., Kun, L., and Kalbacher, H.** (1997). Isolation of novel HLA-DR restricted potential tumor-associated antigens from the melanoma cell line FM3. *Cancer Res.* 57, 3238-3244.
64. **Hearing, V. J. and Tsukamoto, K.** (1991). Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* 5, 2902-2909.
65. **Hedrick, S. M., Cohen, D. I., Nielsen, E. A., and Davis, M. M.** (1984). Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* 308, 149-153.

66. **Hoshino, T., Seki, N., Kikuchi, M., Kuramoto, T., Iwamoto, O., Kodama, I., Koufuji, K., Takeda, J., and Itoh, K.** (1997). HLA class-I-restricted and tumor-specific CTL in tumor-infiltrating lymphocytes of patients with gastric cancer. *Int.J.Cancer* *70*, 631-638.
67. **Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D., and Desjardins, M.** (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* *425*, 402-406.
68. **Housseau, F., Moorthy, A., Langer, D. A., Robbins, P. F., Gonzales, M. I., and Topalian, S. L.** (2001). N-linked carbohydrates in tyrosinase are required for its recognition by human MHC class II-restricted CD4(+) T cells. *Eur.J.Immunol.* *31*, 2690-2701.
69. **Huang, A. Y. C., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D., and Levitsky, H.** (1994). Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* *264*, 961-965.
70. **Hughes, M. S., Yu, Y. Y., Dudley, M. E., Zheng, Z., Robbins, P. F., Li, Y., Wunderlich, J., Hawley, R. G., Moayeri, M., Rosenberg, S. A., and Morgan, R. A.** (2005). Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. *Hum.Gene Ther.* *16*, 457-472.
71. **Hunt, D. F., Henderson, R. A., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Michel, H., Sevilir, N., Cox, A. L., Appella, E., and Engelhard, V. H.** (1992). Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* *255*, 1261-1263.
72. **Hwang, L. Y., Lieu, P. T., Peterson, P. A., and Yang, Y.** (2001). Functional regulation of immunoproteasomes and transporter associated with antigen processing. *Immunol.Res.* *24*, 245-272.
73. **Itoh, K., Platsoucas, D. C., and Balch, C. M.** (1988). Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas: activation by interleukin 2 and autologous tumor cells and involvement of the T cell receptor. *J.Exp.Med.* *168*, 1419-1441.
74. **Jacobs, S. K., Wilson, D. J., Kornblith, P. L., and Grimm, E. A.** (1986). Interleukin-2 or autologous lymphokine-activated killer cell treatment of malignant glioma: phase I trial. *Cancer Res.* *46*, 2101-2104.
75. **Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G., and Schoenberger, S. P.** (2003). CD4(+) T cells are required for secondary expansion and memory in CD8(+) T lymphocytes. *Nature* *421*, 852-856.

76. **Jaraquemada, D., Marti, M., and Long, E. O.** (1990). An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II restricted T cells. *J.Exp.Med.* *172*, 947-954.
77. **Javia, L. R. and Rosenberg, S. A.** (2003). CD4(+)CD25(+) suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J.Immunother.* *26*, 85-93.
78. **Kang, X., Kawakami, Y., el-Gamil, M., Wang, R., Sakaguchi, K., Yannelli, J. R., Appella, E., Rosenberg, S. A., and Robbins, P. F.** (1995). Identification of a tyrosinase epitope recognized by HLA-A24- restricted, tumor-infiltrating lymphocytes. *J.Immunol.* *155*, 1343-1348.
79. **Kawakami, Y.** (1996). Human melanoma antigens recognized by T lymphocytes. *Keio.J.Med.* *45*, 100-108.
80. **Kawakami, Y.** (1998). The use of melanosomal proteins in the immunotherapy of melanoma. *J.Immunother.* *21*, 237-246.
81. **Kawakami, Y., Battles, J. K., Kobayashi, T., Ennis, W., Wang, X., Tupesis, J. P., Marincola, F. M., Robbins, P. F., Hearing, V. J., Gonda, M. A., and Rosenberg, S. A.** (1997). Production of recombinant MART-1 proteins and specific antiMART-1 polyclonal and monoclonal antibodies: use in the characterization of the human melanoma antigen MART-1. *J.Immunol.Methods.* *202*, 13-25.
82. **Kawakami, Y., Dang, N., Wang, X., Tupesis, J., Robbins, P. F., Wang, R. F., Wunderlich, J. R., Yannelli, J. R., and Rosenberg, S. A.** (2000a). Recognition of shared melanoma antigens in association with major HLA-A alleles by tumor infiltrating T lymphocytes from 123 patients with melanoma. *J.Immunother.* *23*, 17-27.
83. **Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C. H., Robbins, P. F., Rivoltini, L., Topalian, S. L., Miki, T., and Rosenberg, S. A.** (1994a). Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.* *91*, 3515-3519.
84. **Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C. H., Robbins, P. F., Sakaguchi, K., Appella, E., Yannelli, J. R., Adema, G. J., Miki, T., and Rosenberg, S. A.** (1994b). Identification of a melanoma antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.* *91*, 6458-6462.
85. **Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K., Kang, X., Southwood, S., Robbins, P. F., Sette, A., Appella, E., and Rosenberg, S. A.** (1995). Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J.Immunol.* *154*, 3961-3968.

86. **Kawakami, Y., Robbins, P. F., Wang, X., Tupesis, J. P., Parkhurst, M. R., Kang, X. Q., Sakaguchi, K., Appella, E., and Rosenberg, S. A.** (1998). Identification of new melanoma epitopes on melanosomal proteins recognized by tumor infiltrating T lymphocytes restricted by HLA-A1, -A2, and -A3 alleles. *J.Immunol.* *161*, 6985-6992.
87. **Kawakami, Y. and Rosenberg, S. A.** (1996). T-cell recognition of self peptides as tumor rejection antigens. *Immunol.Res.* *15*, 179-190.
88. **Kawakami, Y., Suzuki, Y., Shofuda, T., Kiniwa, Y., Inozume, T., Dan, K., Sakurai, T., and Fujita, T.** (2000b). T cell immune responses against melanoma and melanocytes in cancer and autoimmunity. *Pigment Cell Res.* *13*, 163-169.
89. **Kawashima, I., Hudson, S. J., Tsai, V., Southwood, S., Takesako, K., Appella, E., Sette, A., and Celis, E.** (1998). The multi-epitope approach for immunotherapy for cancer: Identification of several CTL epitopes from various tumor-associated antigens expressed on solid epithelial tumors. *Human Immunol.* *59*, 1-14.
90. **Kessels, H. W., Wolkers, M. C., van den Boom, M. D., van der Valk, M. A., and Schumacher, T. N. M.** (2001). Immunotherapy through TCR gene transfer. *Nat.Immunol.* *2*, 957-961.
91. **Kierstead, L. S., Ranieri, E., Brusic, V., Sette, A., Kasamon, Y. L., Slingluff, C. L., Kirkwood, J. M., and Storkus, W. J.** (2001). gp100/pm17 and tyrosinase encode multiple epitopes recognized by Th1-type CD4+T cells. *Br.J.Cancer* *85*, 1738-1745.
92. **King,R.A., Hearing,V.J., Creel,D.J., and Oetting,W.S.** (1995). Albinism. *In* The metabolic and molecular bases of inherited disease. C.R.Scriver, A.L.Beaudet, W.S.Sly, and D.Valle, editors. (New York: McGraw-Hill, Inc.), pp. 4353-4392.
93. **Kobayashi, H., Kokubo, T., Sato, K., Kimura, S., Asano, K., Takahashi, H., Iizuka, H., Miyokawa, N., and Katagiri, M.** (1998). CD4(+) T cells from peripheral blood of a melanoma patient recognize peptides derived from nonmutated tyrosinase. *Cancer Res.* *58*, 296-301.
94. **Kobayashi, T., Urabe, K., Orlow, S. J., Higashi, K., Imokawa, G., Kwon, B. S., Potterf, B., and Hearing, V. J.** (1994). The Pmel17 silver locus protein. Characterization and investigation of its melanogenic function. *J.Biol.Chem.* *269*, 29198-29205.
95. **Kovacsovics-Bankowski, M. and Rock, K. L.** (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class-I molecules. *Science* *267*, 243-246.

96. **Kradin, R. L., Kurnick, J. T., Lazzarus, D. S., Preffer, F. I., Dubinett, S. M., Pinto, C. E., Gifford, J., Davidson, E., Grove, B., and Callahan, R. J.** (1989). Tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in treatment of advanced cancer. *Lancet*. *1*, 577-580.
97. **Kurts, C., Heath, W. R., Carbone, F. R., Allison, J., Miller, J. F. A. P., and Kosaka, H.** (1996). Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J.Exp.Med.* *184*, 923-930.
98. **Kushimoto, T., Basrur, V., Valencia, J., Matsunaga, J., Vieira, W. D., Ferrans, V. J., Muller, J., Appella, E., and Hearing, V. J.** (2001). A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.* *98*, 10698-10703.
99. **Kwon, B. S.** (1993). Pigmentation genes: The tyrosinase gene family and the Pmel17 gene family. *J.Invest.Dermatol.* *100*, 134S-140S.
100. **Lapointe, R., Bellemare-Pelletier, A., Housseau, F., Thibodeau, J., and 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.
101. **Lapointe, R., Thibodeau, J., and Hwu, P.** (2004). Correspondence re R. Lapointe et al., CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. (*Cancer Res.* 2003;63:2836-2843). *Cancer Res.* *64*, 4056-4057.
102. **Lapointe, R., Royal, R. E., Reeves, M. E., Altomare, I., Robbins, P. F., and Hwu, P.** (2001). Retrovirally-transduced human dendritic cells can generate T cells recognizing multiple MHC class I and class II epitopes from the melanoma antigen gp100. *J.Immunol.* *167*, 4758-4764.
103. **Le Borgne, R., Planque, N., Martin, P., Dewitte, F., Saule, S., and Hoflack, B.** (2001). The AP-3-dependent targeting of the melanosomal glycoprotein QNR-71 requires a di-leucine-based sorting signal. *J.Cell Sci.* *114*, 2831-2841.
104. **Lee, S. P., Tierney, R. J., Thomas, W. A., Brooks, J. M., and Rickinson, A. B.** (1997). Conserved CTL epitopes within EBV latent membrane protein 2 - A potential target for CTL-based tumor therapy. *J.Immunol.* *158*, 3325-3334.
105. **Lee, Z. H., Hou, L., Moellmann, G., Kuklinska, E., Antol, K., Fraser, M., Halaban, R., and Kwon, B. S.** (1996). Characterization and subcellular localization of human Pmel17 silver, a 100-kDa (pre)melanosomal membrane protein associated with 5,6,-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) converting activity. *J.Invest.Dermatol.* *106*, 605-610.

106. **Lich, J. D., Elliott, J. F., and Blum, J. S.** (2000). Cytoplasmic processing is a prerequisite for presentation of an endogenous antigen by major histocompatibility complex class II proteins. *J.Exp.Med.* *191*, 1513-1523.
107. **Linsley, P. S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N. K., and Ledbetter, J. A.** (1991). Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin-2 mRNA accumulation. *J.Exp.Med.* *173*, 721-730.
108. **Lopez-Nevot, M. A., Garcia, E., Romero, C., Oliva, M. R., Serrano, S., and Garrido, F.** (1988). Phenotypic and genetic-analysis of HLA class-I and HLA-DR antigen expression on human melanomas. *Exp.Clin.Immunogenet.* *5*, 203-212.
109. **Mackay, C. R.** (1993). Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr.Opin.Immunol.* *5*, 423-427.
110. **Malnati, M. S., Ceman, S., Weston, M., DeMars, R., and Long, E. O.** (1993). Presentation of cytosolic antigen by HLA-DR requires a function encoded in the class II region of the MHC. *J.Immunol.* *151*, 6751-6756.
111. **Malnati, M. S., Marti, M., Lavaute, T., Jaraquemada, D., Biddison, W., DeMars, R., and Long, E. O.** (1992). Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. *Nature* *357*, 702-704.
112. **Marks, M. S. and Seabra, M. C.** (2001). The melanosome: Membrane dynamics in black and white. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* *2*, 738-748.
113. **Marks, M. S., Theos, A. C., and Raposo, G.** (2003). Melanosomes and MHC class II antigen-processing compartments: A tinted view of intracellular trafficking and immunity. *Immunol.Res.* *27*, 409-426.
114. **Marsh, S. G., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Erlich, H. A., Geraghty, D. E., Hansen, J. A., Hurley, C. K., Mach, B., Mayr, W. R., Parham, P., Petersdorf, E. W., Sasazuki, T., Schreuder, G. M., Strominger, J. L., Svejgaard, A., Terasaki, P. I., and Trowsdale, J.** (2005). Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens* *65*, 301-369.
115. **Meyer, J. P., Persad, R., and Gillatt, D. A.** (2002). Use of bacille Calmette-Guerin in superficial bladder cancer. *Postgraduate Medical Journal* *78*, 449-454.
116. **Michie, A. M. and Zuniga-Pflucker, J. C.** (2002). Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection. *Semin.Immunol.* *14*, 311-323.

117. **Monach, P. A., Meredith, S. C., Siegel, C. T., and Schreiber, H.** (1995). A unique tumor antigen produced by a single amino acid substitution. *Immunity* 2, 45-59.
118. **Morgan, D. J., Kreuzel, H. T. C., and Sherman, L. A.** (1999). Antigen concentration and precursor frequency determine the rate of CD8(+) T cell tolerance to peripherally expressed antigens. *J.Immunol.* 163, 723-727.
119. **Mukherjee, P., Dani, A., Bhatia, S., Singh, N., Rudensky, A. Y., George, A., Bal, V., Mayor, S., and Rath, S.** (2001). Efficient presentation of both cytosolic and endogenous transmembrane protein antigens on MHC class II is dependent on cytoplasmic proteolysis. *J.Immunol.* 167, 2632-2641.
120. **Murakami, M., Sakamoto, A., Bender, J., Kappler, J., and Marrack, P.** (2002). CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.* 99, 8832-8837.
121. **Muul, L., Spiess, P., Director, E., and Rosenberg, S. A.** (1987). Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma. *J.Immunol.* 138, 989-995.
122. **Nakagawa T.Y. and Rudensky, A. Y.** (1999). The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol.Rev.* 172, 121-129.
123. **Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., and Schadendorf, D.** (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat.Med.* 4, 328-332.
124. **Nestle, F. O., Burg, G., and Dummer, R.** (1999). New perspectives on immunobiology and immunotherapy of melanoma. *Immunol.Today* 20, 5-7.
125. **Nikolich-Zugich, J., Slifka, M. K., and Messaoudi, I.** (2004). The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat.Rev.Immunol.* 4, 123-132.
126. **Nuchtern, J. G., Biddison, W. E., and Klausner, R. D.** (1990). Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature* 343, 74-76.
127. **Oltz, E. M.** (2001). Regulation of antigen receptor gene assembly in lymphocytes. *Immunol.Res.* 23, 121-133.
128. **Orlow, S. J.** (1995). Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J.Invest.Dermatol.* 105, 3-7.
129. **Orlow, S. J., Boissy, R. E., Moran, D. J., and Pifkohirst, S.** (1993). Subcellular distribution of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1: Implications for melanosomal biogenesis. *J.Invest.Dermatol.* 100, 55-64.

130. **Ostrand-Rosenberg, S.** (1994). Tumor immunotherapy: The tumor cell as an antigen-presenting cell. *Curr.Opin.Immunol.* *6*, 722-727.
131. **Otte, M., Zafrakas, M., Riethdorf, L., Pichlmeier, U., Loning, T., Janicke, F., and Pantel, K.** (2001). MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer. *Cancer Res.* *61*, 6682-6687.
132. **Overwijk, W. W. and Restifo, N. P.** (2000). Autoimmunity and the immunotherapy of cancer: targeting the "self" to destroy the "other". *Crit.Rev.Immunol.* *20*, 433-450.
133. **Pardoll, D. M. and Topalian, S. L.** (1998). The role of CD4(+) T cell responses in antitumor immunity. *Curr.Opin.Immunol.* *10*, 588-594.
134. **Parkhurst, M. R.** (1998). Identification of a shared HLA-A*0201-restricted T-cell epitope from the melanoma antigen tyrosinase-related protein 2. *Cancer Res.* *58*, 4895-4901.
135. **Parkhurst, M. R., Salgaller, M. L., Southwood, S., Robbins, P. F., Sette, A., Rosenberg, S. A., and Kawakami, Y.** (1996). Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J.Immunol.* *157*, 2539-2548.
136. **Peters, C., Braun, M., Weber, B., Wendland, M., Schmidt, B., Pohlmann, R., Waheed, A., and Vonfigura, K.** (1990). Targeting of a lysosomal membrane-protein - A tyrosine-containing endocytosis signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid-phosphatase is necessary and sufficient for targeting to lysosomes. *EMBO J.* *9*, 3497-3506.
137. **Peters, P. J., Neefjes, J. J., Oorschot, V., Ploegh, H. L., and Geuze, H. J.** (1991). Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* *349*, 669-675.
138. **Pfeifer, J. D., Wick, M. J., Roberts, R. L., Findlay, K., Normark, S. J., and Harding, C. V.** (1993). Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* *361*, 359-362.
139. **Phan, G. Q., Touloukian, C. E., Yang, J. C., Restifo, N. P., Sherry, R. M., Hwu, P., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Seipp, C. A., Freezer, L. J., Morton, K. E., Mavroukakis, S. A., White, D. E., and Rosenberg, S. A.** (2003). Immunization of patients with metastatic melanoma using both class I- and class II-restricted peptides from melanoma-associated antigens. *J.Immunother.* *26*, 349-356.
140. **Piccirillo, C. A. and Shevach, E. M.** (2001). Cutting edge: Control of CD8(+) T cell activation by CD4(+)CD25(+) immunoregulatory cells. *J.Immunol.* *167*, 1137-1140.

141. **Pieper, R., Christian, R. E., Gonzales, M. I., Nishimura, M. I., Gupta, G., Settlage, R. E., Shabanowitz, J., Rosenberg, S. A., Hunt, D. F., and Topalian, S. L.** (1999). Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells. *J.Exp.Med.* *189*, 757-765.
142. **Pieters, J.** (1997). MHC class II restricted antigen presentation. *Curr.Opin.Immunol.* *9*, 89-96.
143. **Polydefkis, M., Koenig, S., Flexner, C., Obah, E., Gebo, K., Chakrabarti, S., Earl, P. L., Moss, B., and Siliciano, R. F.** (1990). Anchor sequence-dependent endogenous processing of human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160 for CD4+ T cell recognition. *J.Exp.Med.* *171*, 875-887.
144. **Ramirez, M. C. and Sigal, L. J.** (2002). Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. *J.Immunol.* *169*, 6733-6742.
145. **Raposo, G., Fevrier, B., Stoorvogel, W., and Marks, M. S.** (2002). Lysosome-related organelles: a view from immunity and pigmentation. *Cell Struct.Fonct.* *27*, 443-456.
146. **Raposo, G. and Marks, M. S.** (2002). The dark side of lysosome-related organelles: Specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. *Traffic* *3*, 237-248.
147. **Raposo, G., Tenza, D., Murphy, D. M., Berson, J. F., and Marks, M. S.** (2001). Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J.Cell Biol.* *152*, 809-823.
148. **Rivoltini, L., Kawakami, Y., Sakaguchi, K., Southwood, S., Sette, A., Robbins, P. F., Marincola, F. M., Salgaller, M. L., Yannelli, J. R., and Appella, E.** (1995). Induction of tumor-reactive CTL from peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes of melanoma patients by in vitro stimulation with an immunodominant peptide of the human melanoma antigen MART-1. *J.Immunol.* *154*, 2257-2265.
149. **Robbins, P. F., el Gamil, M., Li, Y. F., Zeng, G., Dudley, M., and Rosenberg, S. A.** (2002). Multiple HLA class II-restricted melanocyte differentiation antigens are recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with melanoma. *J.Immunol.* *169*, 6036-6047.
150. **Robbins, P. F., el-Gamil, M., Kawakami, Y., Stevens, E., Yannelli, J. R., and Rosenberg, S. A.** (1994). Recognition of tyrosinase by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient responding to immunotherapy [published erratum appears in *Cancer Res* 1994 Jul 15;54(14):3952]. *Cancer Res.* *54*, 3124-3126.

151. **Robbins, P. F., ElGamil, M., Li, Y. F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., and Rosenberg, S. A.** (1996). A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J.Exp.Med.* 183, 1185-1192.
152. **Robinson, B. W., Lake, R. A., Nelson D.J., Scott B.A., and Marzo A.L.** (1999). Cross-presentation of tumour antigens: evaluation of threshold, duration, distribution and regulation. *Immunol.Cell Biol.* 77, 552-558.
153. **Romagnoli, P. and Germain, R. N.** (1994). The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class-II folding, transport, and peptide occupancy. *J.Exp.Med.* 180, 1107-1113.
154. **Rosenberg, S. A.** (1984). Immunotherapy of cancer by systemic administration of lymphoid cells plus interleukin-2. *J.Biol.Resp.Mod.* 3, 501-511.
155. **Rosenberg, S. A.** (1995). The Development of New Cancer Therapies Based on the Molecular Identification of Cancer Regression Antigens. *Cancer J.Sci.Am.* 1, 90-100.
156. **Rosenberg, S. A.** (1996). Development of cancer immunotherapies based on identification of the genes encoding cancer regression antigens. *J.Natl Cancer Inst.* 88, 1635-1644.
157. **Rosenberg, S. A.** (1998). Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann.Surg.* 228, 307-319.
158. **Rosenberg, S. A.** (1999). A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10, 281-287.
159. **Rosenberg, S. A.** (2001). Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411, 380-384.
160. **Rosenberg, S. A., Eberlein, T. J., Grimm, E. A., Lotze, M. T., Mazumder, A., and Rosenstein, M.** (1982). Development of long-term cell lines and lymphoid clones reactive against murine and human tumors: A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer. *Surgery* 92, 328-336.
161. **Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L., Chang, A., Avis, F., Leitman, S., Linehan, W. M., Robertson, G., Lee, R., Rubin, J., Seipp, C., Simpson, C., and White, D.** (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high dose interleukin-2 alone. *N.Engl.J.Med.* 316, 889-897.

162. **Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A. E., Ettinghausen, S. E., Matory, Y. L., Skibber, J. M., Shiloni, E., Vetto, J., Seipp, C. A., Simpson, C., and Reichert, C. M.** (1985). Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N.Engl.J.Med.* *313*, 1485-1492.
163. **Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A. E., Vetto, J. T., Seipp, C. A., and Simpson, C.** (1986). A new approach to the therapy of cancer based on the systemic administration of autologous lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2. *Surgery 100*, 262-272.
164. **Rosenberg, S. A. and White, D. E.** (1996). Vitiligo in patients with melanoma: Normal tissue antigens can be targets for cancer immunotherapy. *J.Immunother.* *19*, 81-84.
165. **Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzenuber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Dudley, M. E., Schwarz, S. L., Spiess, P. J., Wunderlich, J. R., Parkhurst, M. R., Kawakami, Y., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., and White, D. E.** (1998). Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat.Med.* *4*, 321-327.
166. **Rudensky, A. Y., Preston-Hurlburt, P., Hong, S. C., and et al.** (1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* *353*, 622
167. **Russo, V., Dalerba, P., Ricci, A., Bonazzi, C., Leone, B. E., Mangioni, C., Allavena, P., Bordignon, C., and Traversari, C.** (1996). MAGE, BAGE and GAGE genes expression in fresh epithelial ovarian carcinomas. *Int.J.Cancer* *67*, 457-460.
168. **Sachse, M., Ramm, G., Strous, G., and Klumperman, J.** (2002). Endosomes: multipurpose designs for integrating housekeeping and specialized tasks. *Histochem.Cell Biol.* *117*, 91-104.
169. **Sakai, C., Kawakami, Y., Law, L. W., Furumura, M., and Hearing, V. J.** (1997). Melanosomal proteins as melanoma-specific immune targets. *Melanoma Res.* *7*, 83-95.
170. **Salgaller, M. L., Afshar, A., Marincola, F. M., Rivoltini, L., Kawakami, Y., and Rosenberg, S. A.** (1995). Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by peripheral blood lymphocytes stimulated in vitro with synthetic peptides. *Cancer Res.* *55*, 4972-4979.

171. **Sanderson, S., Frauwirth, K., and Shastri, N.** (1995). Expression of endogenous peptide major histocompatibility complex class-II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.* *92*, 7217-7221.
172. **Scarcella, D. L., Chow, C. W., Gonzales, M. F., Economou, C., Brasseur, F., and Ashley, D. M.** (1999). Expression of MAGE and GAGE in high-grade brain tumors: A potential target for specific immunotherapy and diagnostic markers. *Clin.Cancer Res.* *5*, 335-341.
173. **Schumacher, T. N.** (2002). T cell-receptor gene therapy. *Nat.Immunol.* *2*, 512-519.
174. **Schutze, M. P., Peterson, P. A., and Jackson, M. R.** (1994). An N-terminal double-arginine motif maintains type-II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* *13*, 1696-1705.
175. **Seiji, M., Fitzpatrick, T. B., Simpson, R. T., and Birbeck, M. S.** (1963). Chemical composition and terminology of specialized organelles (melanosomes and melanin granules) in mammalian melanocytes. *Nature* *197*, 1082-1084.
176. **Sharma, S., Wagh, S., and Govindarajan, R.** (2002). Melanosomal proteins: Role in melanin polymerization. *Pigment Cell Res.* *15*, 127-133.
177. **Shedlock, D. J. and Shen, H.** (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* *300*, 337-339.
178. **Sigal, L. J., Crotty, S., Andino, R., and Rock, K. L.** (1999). Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* *398*, 77-80.
179. **Simmen, T., Schmidt, A., Hunziker, W., and Beermann, F.** (1999). The tyrosinase tail mediates sorting to the lysosomal compartment in MDCK cells via a di-leucine and a tyrosine-based signal. *J.Cell Sci.* *112*, 45-53.
180. **Skipper, J. C., Hendrickson, R. C., Gulden, P. H., Brichard, V., Van Pel, A., Chen, Y., Shabanowitz, J., Wolfel, T., Slingluff, C. L. J., Boon, T., Hunt, D. F., and Engelhard, V. H.** (1996a). An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J.Exp.Med.* *183*, 527-534.
181. **Skipper, J. C. A., Kittlesen, D. J., Hendrickson, R. C., Deacon, D. D., Harthun, N. L., Wagner, S. N., Hunt, D. F., Engelhard, V. H., and Slingluff, C. L.** (1996b). Shared epitopes for HLA-A3-restricted melanoma-reactive human CTL include a naturally processed epitope from Pmel-17/gp100. *J.Immunol.* *157*, 5027-5033.

182. **Sloan, V. S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., and Zaller, D. M.** (1995). Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 375, 802-806.
183. **Société canadienne du cancer** (2005). Statistiques canadiennes sur le cancer 2005. Toronto, Canada
(http://www.cancer.ca/vgn/images/portal/cit_86751114/48/28/401594768cw_2005stats_en.pdf)
184. **Solheim J.C.** (1999). Class I MHC molecules: Assembly and antigen presentation. *Immunol.Rev.* 172, 11-19.
185. **Standley, S., Roche, K. W., McCallum, J., Sans, N., and Wenthold, R. J.** (2000). PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* 28, 887-898.
186. **Svennevig, J. L., Lovik, M., and Svaar, H.** (1979). Isolation and characterization of lymphocytes and macrophages from solid, malignant human tumors. *Int.J.Cancer* 23, 626-631.
187. **Svennevig, J. L. and Svaar, H.** (1979). Content and distribution of macrophages and lymphocytes in solid malignant human tumors. *Int.J.Cancer* 24, 754-758.
188. **Tewari, M. K., Sinnathamby, G., Rajagopal, D., and Eisenlohr, L. C.** (2005). A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nat.Immunol.* 6, 287-294.
189. **Ting, C. C. and Yang, S. S.** (1982). Effect of interleukin-2 on cytotoxic effectors: I. Short-term culture of the cytotoxic effectors and the *in vivo* anti-tumor activity of the cultured effectors isolated from tumor site. *Int.J.Cancer* 30, 625-632.
190. **Todd, R. W., Steele, J. C., Etherington, I., and Luesley, D. M.** (2004). Detection of CD8+ T cell responses to human papillomavirus type 16 antigens in women using imiquimod as a treatment for high-grade vulval intraepithelial neoplasia. *Gynecol.Oncol.* 92, 167-174.
191. **Toes, R. E. M., Ossendorp, F., Offringa, R., and Melief, C. J. M.** (1999). CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J.Exp.Med.* 189, 753-756.
192. **Topalian, S. L.** (1994). MHC class-II restricted tumor antigens and the role of CD4(+) T cells in cancer immunotherapy. *Curr.Opin.Immunol.* 6, 741-745.

193. **Topalian, S. L., Gonzales, M. I., Parkhurst, M., Li, Y. F., Southwood, S., Sette, A., Rosenberg, S. A., and Robbins, P. F.** (1996). Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *J.Exp.Med.* *183*, 1965-1971.
194. **Topalian, S. L., Muul, L. M., Solomon, D., and Rosenberg, S. A.** (1987). Expansion of human-tumor infiltrating lymphocytes for use in immunotherapy trials. *J.Immunol.Methods* *102*, 127-141.
195. **Topalian, S. L., Rivoltini, L., Mancini, M., Markus, N. R., Robbins, P. F., Kawakami, Y., and Rosenberg, S. A.** (1994a). Human CD4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.* *91*, 9461-9465.
196. **Topalian, S. L., Rivoltini, L., Mancini, M., Markus, N. R., Robbins, P. F., Kawakami, Y., and Rosenberg, S. A.** (1994b). Human CD4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.* *91*, 9461-9465.
197. **Topalian, S. L., Solomon, D., and Rosenberg, S. A.** (1989). Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J.Immunol.* *142*, 3714-3725.
198. **Touloukian, C. E., Leitner, W. W., Topalian, S. L., Li, Y. F., Robbins, P. F., Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P.** (2000). Identification of a MHC class II-restricted human gp100 epitope using DR4-IE transgenic mice. *J.Immunol.* *164*, 3535-3542.
199. **Townsend, A. and Bodmer, H.** (1989). Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu.Rev.Immunol.* *7*, 601-624.
200. **Traversari, C., Van Der Bruggen, P., Luescher, I. F., Lurquin, C., Chomez, P., Van Pel, A., De Plaen, E., Amar-Costesec, A., and Boon, T.** (1992). A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA- A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J.Exp.Med.* *176*, 1453-1457.
201. **Van Den Eynde, B., Peeters, O., De Backer, O., Gaugler, B., Lucas, S., and Boon, T.** (1995). A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J.Exp.Med.* *182*, 689-698.
202. **Van Der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van Den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T.** (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* *254*, 1643-1647.

203. **Velders, M. P., Markiewicz, M. A., Eiben, G. L., and Kast, W. M.** (2003). CD4(+) T cell matters in tumor immunity. *Int.Rev.Immunol.* 22, 113-140.
204. **Vijayasaradhi, S.** (2000). Sorting and targeting of melanosomal membrane proteins: Signals, pathways, and mechanisms. *Pigment Cell Res.* 13, 128-134.
205. **Vijayasaradhi, S., Xu, Y., Bouchard, B., and Houghton, A. N.** (1995). Intracellular sorting and targeting of melanosomal membrane proteins: identification of signals for sorting of the human brown locus protein, gp75. *J.Cell Biol.* 130, 807-820.
206. **Wagner, H. and Rollinghoff, M.** (1973). *In vitro* induction of tumor-specific immunity. I. Parameters of activation and cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells immunized *in vitro* against syngeneic and allogeneic plasma cell tumors. *J.Exp.Med.* 138, 1-15.
207. **Wang, H. Y., Lee, D. A., Peng, G. Y., Guo, Z., Li, Y. C., Kiniwa, Y., Shevach, E. M., and Wang, R. F.** (2004). Tumor-specific human CD4(+) regulatory T cells and their ligands: Implications for immunotherapy. *Immunity* 20, 107-118.
208. **Wang, R. F.** (2001). The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *Trends Immunol.* 22, 269-276.
209. **Wang, R. F., Appella, E., Kawakami, Y., Kang, X. Q., and Rosenberg, S. A.** (1996a). Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 184, 2207-2216.
210. **Wang, R. F., Parkhurst, M. R., Kawakami, Y., Robbins, P. F., and Rosenberg, S. A.** (1996b). Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. *J.Exp.Med.* 183, 1131-1140.
211. **Wang, R. F., Zeng, G., Johnston, S. F., Voo, K., and Ying, H.** (2002). T cell-mediated immune responses in melanoma: implications for immunotherapy. *Crit.Rev.Oncol.Hematol.* 43, 1-11.
212. **Wang, S., Bartido, S., Yang, G., Qin, J., Moroi, Y., Panageas, K. S., Lewis, J. J., and Houghton, A. N.** (1999). A role for a melanosome transport signal in accessing the MHC class II presentation pathway and in eliciting CD4+ T cell responses. *J.Immunol.* 163, 5820-5826.
213. **Watabe, H., Valencia, J. C., Yasumoto, K., Kushimoto, T., Ando, H., Muller, J., Vieira, W. D., Mizoguchi, M., Appella, E., and Hearing, V. J.** (2004). Regulation of tyrosinase processing and trafficking by organellar pH and by proteasome activity. *J.Biol.Chem.* 279, 7971-7981.

214. **Watts, C.** (2001). Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr.Opin.Immunol.* *13*, 26-31.
215. **Weaver, C. T. and Unanue, E. R.** (1990). The costimulatory function of antigen-presenting cells. *Immunol.Today* *11*, 49-55.
216. **Williams, M. A. and Fukuda, M.** (1990). Accumulation of membrane-glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *J.Cell Biol.* *111*, 955-966.
217. **Wong, R., Lau, R., Chang, J., Kuus-Reichel, T., Brichard, V., Bruck, C., and Weber, J.** (2004). Immune responses to a class II helper peptide epitope in patients with stage III/IV resected melanoma. *Clin.Cancer Res.* *10*, 5004-5013.
218. **Wu, T. C., Guarnieri, F. G., Staveley-O'Carroll, K. F., Viscidi, R. P., Levitsky, H. I., Hedrick, L., Cho, K. R., August, J. T., and Pardoll, D. M.** (1995). Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class-II presentation of antigens. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.* *92*, 11671-11675.
219. **Xia, H., Hornby, Z. D., and Malenka, R. C.** (2001). An ER retention signal explains differences in surface expression of NMDA and AMPA receptor subunits. *Neuropharmacology* *41*, 714-723.
220. **Yasumoto, K., Watabe, H., Valencia, J. C., Kushimoto, T., Kobayashi, T., Appella, E., and Hearing, V. J.** (2004). Epitope mapping of the melanosomal matrix protein gp100 (Pmel17): Rapid processing in the endoplasmic reticulum and glycosylation in the early Golgi compartment. *J.Biol.Chem.* *279*, 28330-28338.
221. **Yee, C., Gilbert, M. J., Riddell, S. R., Brichard, V. G., Fefer, A., Thompson, J. A., Boon, T., and Greenberg, P. D.** (1996). Isolation of tyrosinase-specific CD8(+) and CD4(+) T cell clones from the peripheral blood of melanoma patients following in vitro stimulation with recombinant vaccinia virus. *J.Immunol.* *157*, 4079-4086.
222. **Yewdell, J. W., Bennink, J. R., and Hosaka, Y.** (1988). Cells process exogenous proteins for recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Science* *239*, 637-640.
223. **York, I. A. and Rock, K. L.** (1996). Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu.Rev.Immunol.* *14*, 369-396.

224. **Zhou, B. K., Boissy, R. E., Pifko-Hirst, S., Moran, D. J., and Orlow, S. J.** (1993). Lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1) is the melanocyte vesicular membrane glycoprotein band II. *J.Invest.Dermatol.* *100*, 110-114.
225. **Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C.** (1979). MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv.Immunol.* *27*, 177

