

Université de Montréal

**L'Immunodominance Résulte d'une Compétition entre  
les Populations Lymphocytaires T CD8<sup>+</sup> Reconnaisant  
Différents Antigènes**

par

**Guillaume Roy-Proulx**

Département de Médecine  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de **Philosophiæ Doctor (Ph.D.)**  
**en Sciences Biomédicales**

Décembre 2006

© Guillaume Roy-Proulx, 2006



W

4

U58

2007

V-011

10/10

## 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.

## **PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY**

---

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

### **L'Immunodominance Résulte d'une Compétition entre les Populations Lymphocytaires T CD8<sup>+</sup> Reconnaisant Différents Antigènes**

présentée par :

**Guillaume Roy-Proulx**

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Nathalie Labrecque  
*président-rapporteur*

Claude Perreault  
*directeur de recherche*

Hugo Soudeyns  
*membre du jury*

Sylvie Fournier  
*examineur externe*

Jean-François Gauchat  
*représentant du doyen de la FES*

## RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS

---

Parmi les milliers de peptides associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) et présentés aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, seulement une faible proportion générera une réponse cytotoxique. Ces épitopes, dits *immunodominants*, sont reconnus pour entraîner les plus fortes réponses cytotoxiques *in vivo* ainsi que pour inhiber les réponses contre d'autres épitopes dits *non-dominants* lorsqu'ils sont présentés simultanément sur des cellules présentatrices d'antigènes (*Antigen Presenting Cell*, APC). Cette hiérarchie relative des épitopes entre eux est dictée par le processus d'immunodomination qui implique la suppression de la réponse contre les épitopes non-dominants.

Comme plusieurs modèles indiquent que la dominance disparaît lorsque les épitopes sont présentés sur des APC différentes ou en très large excès, il est actuellement établi que le processus de domination résulterait d'une compétition entre clones T pour les ressources que représentent les APC. Bien que quelques modèles suggèrent que l'enjeu déterminant de cette compétition serait l'élimination des APC par les clonotypes de la réponse dominante, les mécanismes impliqués restent obscurs.

Comme les antigènes mineurs d'histocompatibilité (AgMiH) H7<sup>a</sup> et HY<sub>(Uty)</sub> sont situés aux antipodes de l'échelle de la dominance, la comparaison des réponses T CD8<sup>+</sup> qui leurs sont spécifiques s'est révélée très instructive dans l'étude du processus de domination. Nous avons d'abord démontré, dans notre première série de travaux, que ce processus supprime l'expansion clonale des cellules T dirigées contre un déterminant non-dominant. Nos résultats indiquent également que ce processus est contrôlé par le

ratio cellules T/APC, démontrant la nature compétitive de ce processus. De plus, la mesure d'expression de molécules cytolytiques, supérieure chez les populations spécifiques à H7<sup>a</sup>, indique que les fonctions effectrices représentent un avantage concurrentiel dans l'élimination des APC.

Pour sa part, notre seconde série de travaux a contribué à faire la lumière sur d'autres facteurs associés à l'établissement de la hiérarchie de dominance. La découverte de la protéine source de H7<sup>a</sup>, ainsi que de son allèle nous ont mené à définir la diversité du répertoire impliqué dans la réponse contre H7<sup>a</sup>. Nos résultats démontrent que la réponse à H7<sup>a</sup> est fortement restreinte aux familles V $\alpha$ 8/V $\beta$ 8 du TCR et l'analyse des régions hypervariables a révélé l'implication d'un TCR hautement conservé et même public. Ces résultats illustrent bien qu'une grande diversité de clonotypes n'est pas nécessaire à l'établissement de la dominance comme plusieurs le soupçonnaient.

Les fréquences de clones spécifiques à H7<sup>a</sup> et HY se sont révélées similaires dans un répertoire pré-immun, indiquant que ce paramètre ne constitue pas un avantage compétitif significatif contribuant au processus de domination.

Nous avons également étudié l'implication de la reconnaissance du soi dans les processus d'activation susceptibles de contribuer à la dominance. Nos résultats suggèrent que les cellules spécifiques à H7<sup>a</sup> ne bénéficient pas d'une stimulation homéostatique par les antigènes du soi supérieure à celle d'autres cellules T dirigées contre un épitope non-dominant.

En effet, les mesures de niveaux de CD5 à la surface de cellules T naïves ont apporté des évidences indirectes contre l'idée que la force du signal TCR avec les complexes CMH-peptide du soi, retrouvés en périphérie, pourrait être impliquée dans le processus de dominance.

L'exploration des propriétés cinétiques des interactions H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup> et HY/D<sup>b</sup> avec leurs TCR respectifs, nous a permis d'observer que les deux populations de cellules T se dissociaient de leur antigène cible avec une cinétique semblable. Par contre, l'association des T anti-H7<sup>a</sup> avec leur antigène est significativement plus rapide que dans le cas de HY suggérant que des événements, tel que la formation de la synapse ou de processus moléculaires précoces, constituent vraisemblablement un avantage dans l'activation de certains clonotypes en particuliers.

Par conséquent, l'ensemble de nos données supporte un modèle selon lequel les cellules T exerçant l'immunodomination deviennent fonctionnellement actives plus rapidement que celles dirigées contre un épitope non-dominant et conséquemment limitent la présentation antigénique par l'élimination ou l'inactivation des APC. Ces nouvelles données sur les mécanismes de la dominance pourraient permettre de déterminer plus adéquatement des cibles immunothérapeutiques efficaces impliquées dans des traitements anti-tumoraux dont nous en donnons d'ailleurs la preuve par l'éradication de cellules néoplasiques suite à la stimulation par H7<sup>a</sup> dans un contexte de transfert adoptif dans un modèle murin.

**Mots clés:**

*Lymphocyte T CD8<sup>+</sup>, antigènes/épitopes, immunodominance, immunodomination, compétition interclonale, cytotoxicité, cellules présentatrices d'antigènes, récepteur de cellule T, diversité du répertoire, interaction TCR-ligand, cible immunothérapeutique.*

## **ABSTRACT AND KEY WORDS**

---

The presence of dominant epitopes suppresses the generation of CD8<sup>+</sup> T cell cytotoxic activity towards other non-dominant immunogenic epitopes found on the same antigen-presenting cell (APC). Our model antigens, H7<sup>a</sup> and HY minor antigens, elicit CTL responses of similar amplitude, but H7<sup>a</sup> totally abrogates response to HY when both antigens are presented on the same APC. This phenomenon, termed immunodomination, drastically restricts the diversity of the repertoire of cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses and results from CD8 T cell competition for APC resources.

To decipher the mechanisms involved in this interclonal competition, we investigated not only the process by which only some specific clonotypes proliferate and develop their functional activity, but also the factors that influence this outcome. We showed that immunodomination abrogates expansion rather than differentiation of CTLs specific for non-dominant epitopes, and that it is regulated by the CTL/APC ratio. We also provided evidence that the essence of immunodomination could be related to the level of effector function of CTLs specific for the various epitopes.

The next series of experiments allowed us to shed light on the role of key features of the antigen-specific repertoire in immunodomination. Thus the discovery of the H7<sup>a</sup> source protein as well as its allelic product allowed us to investigate the repertoire diversity of this dominant response. We showed that the response to H7<sup>a</sup> is restricted to the V $\alpha$ 8/V $\beta$ 8 T cell receptor (TCR) families. CDR3 sequencing of anti-H7<sup>a</sup> T cells



revealed the implication of a highly conserved TCR indicating that a broad diversity is not necessary to the establishment of the domination process.

The frequencies of clonotypes specific to H7<sup>a</sup> and HY appeared similar in the naïve repertoire, indicating that this quantitative factor does not have a significant role in the domination process.

We also investigated the implication of self-recognition in the activation process and its contribution to immunodominance. Assessment of CD5 levels at the surface of naïve T cells, used as a surrogate marker, provided indirect evidence against the idea that the strength of TCR interactions with self MHC-peptide complexes shapes the immunodomination hierarchy.

Comparison of the kinetic properties of the interactions of D<sup>b</sup>/H7<sup>a</sup> and D<sup>b</sup>/HY tetramers with their cognate TCRs showed similar off-rate for the two T-cell populations, but a much more rapid on-rate for anti-H7<sup>a</sup> T cells. Overall, our data support a model where the T cells that exert immunodomination become functionally active more quickly than those directed against a non-dominant epitope. This would then limit the duration of antigen presentation by elimination or inactivation of APC. These new data could be instrumental in selection of effective immunotherapeutic targets involved in antitumor treatments or vaccines development.

**Key words:**

*CD8<sup>+</sup> T lymphocyte, antigens/epitopes, immunodominance, immunodomination, interclonal competition, cytotoxicity, antigen-presenting cell, T cell receptor, repertoire diversity, TCR-ligand interaction, immunotherapeutic target.*

## **TABLE DES MATIÈRES**

---

<i>Page d'identification du jury</i>	<i>ii</i>
<i>Résumé et mots clés</i>	<i>iii</i>
<i>Abstract and key words</i>	<i>vi</i>
<i>Table des matières</i>	<i>viii</i>
<i>Liste des tables et figures</i>	<i>xi</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>xiii</i>
<i>Dédicace</i>	<i>xiv</i>
<i>Notice</i>	<i>xv</i>
<i>Liste des Travaux publiés</i>	<i>xvi</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xvii</i>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
1. Notions de base de la reconnaissance antigénique par les lymphocytes T	2
2. Concept d'immunodominance	4
2.1. L'Immunodominance et le contexte évolutif	6
3. Immunodomination : racines de la dominance	8
4. Immunodomination : reflet d'une compétition	9
5. Élimination des APC : L'enjeu d'une compétition	11
5.1. Mécanismes de suppression des APC et IFN- $\gamma$	12
5.2. Inactivation des APC	14
6. Facteurs associés au processus de compétition-suppression	14
6.1. Facteurs associés à la présentation	15
6.1.1. Accès à la surface des APC	15
6.1.2. Densité des épitopes	18
6.1.3. Affinité de l'interaction TCR - ligand	19
6.1.4. Implications structurales des l'interaction TCR-ligand	20

6.2. Facteurs associés aux répondants naïfs	22
6.2.1. Fréquence de précurseurs	22
6.2.2. Diversité du répertoire	24
6.2.3. Cellules mémoires et altération de la hiérarchie de dominance	28
7. Contexte et modèle d'étude du processus d'immunodomination	29
7.1. Première série de travaux	30
7.2. Seconde série de travaux	32
7.3. Série de travaux complémentaires	34
<b>Premier article</b>	37
« Immunodomination results from functional differences between competing CTLs »	
<b>Préface au second article</b>	60
<b>Second article</b>	61
“ CD8 T-Cell Ability to Exert Immunodomination Correlates with T-Cell Receptor : Epitope Association Rate ”	
<b>Préface aux articles complémentaires</b>	88
<b>Articles complémentaires</b>	
“Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease ”	89
“Tissue distribution of target antigen has a decisive influence on the outcome of adoptive cancer immunotherapy ”	96
<b>Travaux non publiés</b>	102
Implication de l'expansion homéostatique dans le processus d'immunodomination	

<b>Discussion</b>	105
1. Compétition pour les APC	106
2. Influence de la fréquence de précurseurs	108
3. Influence de la diversité du répertoire	112
3.1. TCR hautement conservé et réactivité	116
3.2. Particularités de structure	118
4. Cinétique de développement	120
4.1. Durée de contact T-APC	122
4.2. Interruption du contact T-APC	123
5. Reconnaissance périphérique et conséquences fonctionnelles	124
6. Interaction TCR-ligand	126
6.1. Cinétique de dissociation	127
6.2. Cinétique d'association	129
6.3. Cinétique d'association, synapse et dimérisation des TCR	130
6.4. Cinétique d'association et énergie d'adaptation structurale	130
6.5. Dissociation / Association et Affinité intrinsèque	132
7. De l'activation aux fonctions effectrices	133
7.1. Développement fonctionnel l'expression des gènes impliqués	135
8. Implications Immunothérapeutiques	136
8.1. Preuves de l'efficacité thérapeutique de la réponse dominante	137
8.2. Réalité du transfert adoptif	139
8.3. Autre perspective immunothérapeutique	140
<b>Conclusion</b>	142
Vision globale et perspectives	143
<b>Références</b>	146

## **LISTE DES TABLES ET FIGURES**

---

### ***Figures uniquement retrouvées dans la thèse***

**Figure 1.** Réponses aux épitopes dominants et non-dominants.

**Figure 2 :** Implication de la compétition interclonale des cellules T CD8<sup>+</sup> pour les ressources stimulatrices.

**Figure 3.** Modèle de « *sélection-avidité* »

**Figure 4 :** Représentation schématique de tétramères de CMH de classe I.

**Tableau I :** Corrélation entre diversité du répertoire et dominance

**Figure 5.** Schéma de la stratégie de mise en évidence d'une expansion homéostatique CMH-peptide spécifique différentielle entre les cellules T CD8<sup>+</sup> dirigées contre H7<sup>a</sup> et dirigées contre HY

**Figure 6.** Devis expérimental d'expansion homéostatique CMH-peptide spécifique.

**Figure 7.** Structure (*backbone*) de H7<sup>a</sup> et de son allèle H7<sup>b</sup>

**Figure 8.** Schéma proposé de l'interface et des interactions probables du TCR consensus et spécifique au ligand H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup>.

**Figure 9.** Schéma hypothétique de la cinétique de développement des fonctions effectrices de réponse dominante et non-dominantes.

**Figure 10.** Schéma récapitulatif hypothétique de l'ensemble du processus d'immunodomination menant à la dominance.

***Figures du premier article***

**Figure 1.** Staining of splenocytes and antigen-specific cell lines with H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup> and HY/D<sup>b</sup> tetramers.

**Figure 2.** Recognition of B6<sup>dom1</sup> prevents expansion of HY-specific CD8<sup>+</sup> T cells.

**Figure 3.** Expansion of B6<sup>dom1</sup>- and HY-specific CD8<sup>+</sup> T cells after adoptive transfer to irradiated recipients.

**Figure 4.** Expression of cell surface O-glycan epitopes and intracellular perforin content.

**Figure 5.** Immunodomination prevails in perforin-deficient mice.

***Figures du second article***

**Figure 1.** Anti-H7<sup>a</sup> and anti-HY CD8 T cell precursors exhibit similar frequencies and CD5 expression levels in naïve B10.H7<sup>b</sup> mice.

**Figure 2.** H7<sup>a</sup> (KAPDNRETLT) and its allelic peptide H7<sup>b</sup> (KAPDNRDTL) are not cross-reactive at the TCR level.

**Figure 3.** H7<sup>a</sup>-tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells use mainly TCR V $\alpha$ 8<sup>+</sup> and V $\beta$ 8<sup>+</sup> chains.

**Table I.** Amino acid and nucleotide sequences of the TCRalpha and beta chain hypervariable regions of H7<sup>a</sup> tetramers<sup>+</sup>/V $\alpha$ 8<sup>+</sup>/V $\beta$ 8<sup>+</sup>/CD8 T cells.

**Figure 4.** TCR:pepMHC dissociation and association rates for H7<sup>a</sup>- and HY-specific CD8 T cells harvested at the time of primary response.

**Figure 5.** Kinetics of CD8 T-cell responses against H7<sup>a</sup> and HY. B10.H7<sup>b</sup> female mice were immunized with B10 or B10.H7<sup>b</sup> male cells to evaluate the kinetic of CD8 T-cell response against H7<sup>a</sup> and HY, respectively.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

Ag	Antigène, Antigen
APC	Antigen Presenting Cell, Cellule Présentatrice d'Antigènes
AgMiH	Antigène Mineur d'Histocompatibilité
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
TCR	T Cell Receptor, Récepteur de Cellules T
IFN- $\gamma$	Interféron-gamma
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte, Cellule T Cytotoxique
LCMV	Lymphocytic ChorioMeningitis Virus
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
PKO	Perforine 'knock-out'
GKO	Interféron-gamma 'knock-out'
EBV	Epstein-Barr Virus
SPR	Surface Plasmon Resonance
TAA	Tumor Associated Antigen

H7<sup>a</sup> = B6<sup>dom1</sup>

## DÉDICACE

---

*« Si le même espace est occupé par d'autres individus cherchant à se gratifier avec les mêmes objets et les mêmes êtres, il en résultera de la compétition, lutte, hiérarchies et, éventuellement, l'établissement d'une dominance. »*

-Henri Laborit

*« Du Biologique au Sociologique, 1990 »*



## NOTICE

---

Comme le premier article publié et inséré dans cette thèse a également été impliqué dans dans les travaux de maîtrise, il nous a paru important d'apporter des précisions sur les raisons qui ont motivé la reprise de ce document.

Les travaux présentés dans le cadre du premier article ont nécessité le développement de la technologie des tétramères de complexes majeurs d'histocompatibilité. Cette technologie mise au point lors du stage de maîtrise n'en était qu'à ses premiers balbutiements à l'époque et a nécessité nombre d'explorations fastidieuses et complexes dont les travaux ont constitué la majorité des expérimentations du stage de maîtrise. La réalisation et la « maîtrise » de cette technologie ce sont non seulement révélés indispensable à la majeure partie de travaux réalisés et présentés dans cette thèse, mais ce sont non révélés aussi indispensable à bon nombre d'expérimentations réalisées dans le cadre des autres projets de l'équipe du Dr Perreault. Par conséquent une majeure partie du mémoire de maîtrise fut consacrée à cette technologie et son élaboration,

Bien que les concepts d'immunodominance furent concisement traités dans ce mémoire, la reprise de ces travaux dans cette thèse apporte une perspective plus profonde, complète et surtout complémentaire aux autres résultats présentés dans ce document; offrant ainsi au lecteur une synthèse cohérente du sujet étudié ces dernières années.

Bref, en aucune façon ce présent document n'implique la copie complète ou partielle du mémoire en question et cette situation fut préalablement convenue et discuté avec les membres du Jury et le Directeur de recherche avant la soumission finale de cette thèse.

## **LISTE DES TRAVAUX PUBLIÉS**

---

### ***Travaux exposés dans leur intégralité et directement reliés au sujet de cette thèse***

- Roy-Proulx G, Meunier MC, Lanteigne AM, Brochu S, Perreault C.  
Immunodomination results from functional differences between competing CTL.  
*Eur J Immunol. 2001 Aug;31(8):2284-92.*
- Roy-Proulx G, Baron C, Perreault C. Related Articles, Links  
CD8 T-cell ability to exert immunodomination correlates with T-cell receptor :  
epitope association rate.  
*Biol Blood Marrow Transplant. 2005 Apr;11(4):260-71.*

### ***Travaux complémentaires***

- Meunier MC, Roy-Proulx G, Labrecque N, Perreault C.  
Tissue distribution of target antigen has a decisive influence on the outcome of  
adoptive cancer immunotherapy.  
*Blood. 2003 Jan 15;101(2):766-70.*
- Fontaine P, Roy-Proulx G, Knafo L, Baron C, Roy DC, Perreault C. Adoptive  
transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates  
leukemia cells without causing graft-versus-host disease.  
*Nat Med. 2001 July;7(7):789-94.*

### ***Travaux avec contribution mineure***

#### ***(Ces travaux ne sont pas présentés et discutés dans la thèse)***

- Blais ME, Gerard G, Martinic MM, Roy-Proulx G, Zinkernagel RM, Perreault C.  
Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar  
immune responses?  
*Blood. 2004 April 15;103(8):3102-10.*

## REMERCIEMENTS

---

*Comme ce projet de recherche a impliqué une grande diversité de concepts et d'expérimentations, de nombreuses personnes y ont contribué par leur aide parfois indispensable. Je tiens ainsi à les remercier.*

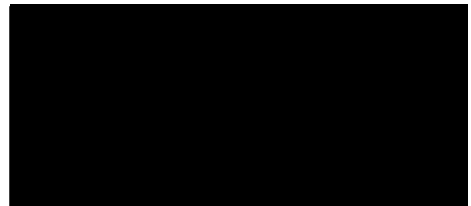
*Je remercie Sylvie Brochu et Pierre Fontaines pour leur aide indispensable, respectivement pour son aide au tout début, et pour la collaboration de travaux exceptionnels retrouvés dans les premiers travaux complémentaires. Je n'oublie pas également Anne-Marie Lanteigne et Marie-Christine Meunier qui ont participé à certaines expérimentations retrouvées dans mes premiers travaux et surtout Marie-Christine notamment pour m'avoir permis de contribuer à la seconde partie des travaux complémentaires discutés dans le présent document.*

*Je tiens à remercier spécialement Chantal Baron, qui par sa présence, sa compréhension, ses bons conseils techniques et logistiques, qui m'ont permis de passer au dessus de moments plus difficiles et complexes.*

*Aussi, j'aimerais remercier tous mes collègues qui ont contribué, par leurs encouragements et leur support, à me donner la force de continuer dans l'adversité. Je pense particulièrement à Étienne Caron, Isabelle Louis, Rafik Terra, Renée Charbonneau, Caroline Coté, Marie-Ève Blais et Marie-Christine Meunier.*

*Il est également important de souligner l'appui de l'Institut Nationale du Cancer du Canada dont l'aide financière a contribué significativement à mon cheminement.*

*Et en terminant, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Claude Perreault, pour son apport intellectuel constant dans le projet, ses excellentes idées, sa patience, sa compréhension et sa grande diplomatie. Mentor pendant ces quelques années et qui, Claude m'a procuré une formation académique rigoureuse et une discipline exemplaire dont je lui en serai éternellement reconnaissant.*



## INTRODUCTION

---

Plongés depuis quelques années dans le développement de traitements immunothérapeutiques, différents membres de notre laboratoire ont étudié une cible des plus prometteuses. Cette cible, autrefois désignée B6<sup>dom1</sup> et récemment rebaptisée H7<sup>a</sup> a mérité une caractérisation approfondie, compte tenu du potentiel immunothérapeutique qu'elle présente. Parmi l'ensemble des données établies sur cette cible, la plus remarquable demeure sans doute sa grande immunogénicité qui en fait un épitope hautement immunodominant. Caractéristique fondamentale de la réponse lymphocytaire T CD8<sup>+</sup>, la dominance peut être mise en évidence lorsque plusieurs déterminants antigéniques sont présentés à la surface de la même cellule. Aujourd'hui, la dominance des antigènes est considérée comme un paramètre incontournable en vaccinologie. De plus, la compréhension de ses mécanismes implique une revue globale de l'ensemble de la réponse adaptative des lymphocytes T, tant au niveau moléculaire que cellulaire.

Cette thèse se propose ainsi d'être la suite des études antérieures, réalisées par notre équipe sur les éléments qui caractérisent les réponses immunodominantes. Les deux séries de travaux publiés et retrouvés dans cet ouvrage présentent des éléments à la fois surprenants et importants qui auront, non seulement approfondi nos connaissances immunobiologiques, mais qui seront aussi, je l'espère, mis à profit lors de futurs développements immunothérapeutiques.

## *1. Notions de base de la reconnaissance antigénique par les lymphocytes T*

---

Les différents pathogènes qui traversent les barrières naturelles de l'organisme ne sont pas instantanément reconnus par notre système lymphocytaire et ce n'est généralement que suite à la pénétration cellulaire que les protéines d'origines pathogéniques sont apprêtées par le protéasome, puis transportées dans le réticulum endoplasmique par le transporteur TAP. Une fois dans le RE et résultant du passage par le protéasome ou l'immunoprotéasome, les peptides composés de 8 à 10 acides aminés se lient de façon non-covalente mais stable dans la niche peptidique qui sera alors formée de concert avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I impliquant une chaîne lourde transmembranaire et une chaîne légère, la  $\beta_2$ -microglobuline<sup>1;2</sup>. Une fois formé, le complexe trimoléculaire ( $\beta_2$ -microglobuline/chaîne lourde du CMH classe I/peptide) s'évade du RE et migre à la surface cellulaire où, ancré par la portion transmembranaire de la chaîne lourde, il présente le fragment peptidique au monde extracellulaire où ce dernier pourra être reconnu par un récepteur de cellule T (*T Cell Receptor*, TCR) complémentaire<sup>3</sup>. Hétérodimères composés d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ , les TCR sont retrouvés à près de 30,000 copies par cellules T et criblent littéralement ces dernières. Les deux chaînes sont liées ensemble par un pont disulfure et associées aux 6 chaînes transmembranaires CD3 $\zeta$  ayant comme fonction la transmission intracellulaire du signal de reconnaissance<sup>4;5</sup>. L'interaction d'un TCR spécifique avec son ligand respectif, soit : un fragment peptidique (aussi être appelé épitope) et combiné à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et présenté à la surface

d'une cellule présentatrice d'antigène (*Antigen Presenting Cell*, APC) entraîne généralement l'activation du processus prolifératif d'une cellule T CD8<sup>+</sup> ou d'une cellule T CD4<sup>+</sup> (selon une présentation par le CMH-I ou CMH-II respectivement) et la cellule naïve ainsi activée peut mener au développement d'une réponse dite primaire dont l'amplitude est généralement relative à l'immunogénicité de l'Ag présenté<sup>6</sup>. L'activation est caractérisée par une expansion clonale des cellules T spécifiques et le niveau de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques à un Ag donné peut passer d'indétectable à près de 2% des cellules T CD8<sup>+</sup> spléniques pour certains Ag bactériens et peut atteindre des niveaux aussi impressionnants que 40-50% des cellules T CD8<sup>+</sup> spléniques dans le cas de certains virus très immunogènes<sup>7,8</sup>. Généralement l'amplitude de l'expansion lymphocytaire atteint un sommet 7-15 jours après la reconnaissance, puis diminue pour atteindre un niveau inférieur à 5% de l'expansion initiale. Ces cellules T résiduelles alors dites « mémoires » peuvent rester présentes pour la vie de l'hôte et ont la particularité de répondre rapidement à la réapparition de l'Ag en question<sup>8</sup>. L'activation d'une cellule T entraîne également, en général, le développement de caractéristiques de natures effectrices qui se traduisent par la libération de cytokines notamment l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ), le facteur de nécrose tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF) ainsi que des chemokines destinées au recrutement et à l'activation de systèmes de défense connexes<sup>6</sup>. Le rôle effecteur principal des cellules T CD8<sup>+</sup> reste toutefois leur capacité à détruire les APC cibles d'où leur désignation de cellules T cytotoxiques à ce stade de développement (*Cytotoxic T Lymphocyte*, CTL). La lyse des APC est régulée par deux grandes voies moléculaires, notamment la voie perforine/granzyme et la voie fas/fas-ligand qui induit la mort cellulaire programmée<sup>9,10</sup>.

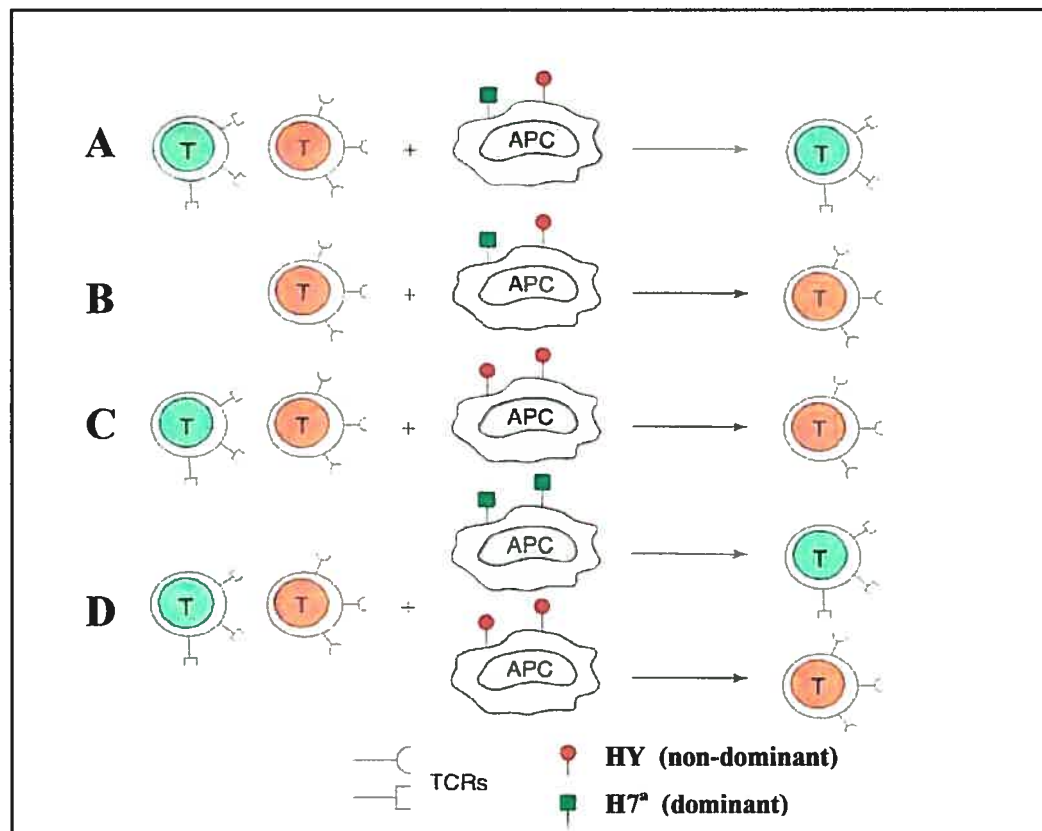
## 2. Concept d'immunodominance

---

Parmi les milliers de peptides encodés dans les protéines étrangères et qui ont le potentiel d'être présentés aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> circulants, seule une infime fraction mènera à la génération de réponses cytotoxiques. Toutefois, les contraintes n'en restent pas là. En effet, malgré la présence simultanée de plusieurs peptides immunogènes adéquatement présentés, seul un nombre restreint de clonotypes s'activeront, proliféreront et engageront leurs fonctions effectrices dans le but d'éliminer les APC impliquées. Ce fut d'ailleurs avec surprise, lors d'expérimentations sur la reconnaissance d'Ag du soi impliquant différentes lignées murines, qu'il fut observé que les réponses générées se limitaient à un nombre extrêmement faible de déterminants<sup>11</sup>. Cette observation est d'autant plus surprenante comme il a près d'une quarantaine d'AgMiHs différents connus peuvent être présentées simultanément<sup>12,13</sup>. Cette restriction de la réponse à un nombre très limité d'épitopes antigéniques résulte de ce qui est connu comme l'« *l'immunodominance* ».

Les antigènes dits « *immunodominants* » se définissent actuellement par deux grandes caractéristiques dans la réponse qu'ils génèrent. Ils sont ceux qui génèrent les plus fortes réponses *in vivo*, c'est-à-dire qu'ils confèrent le meilleur niveau de protection contre les pathogènes d'où originent ces épitopes<sup>12</sup>. En second lieu, les épitopes immunodominants sont aussi reconnus pour leur capacité à diminuer ou littéralement supprimer la réponse à d'autres épitopes dits « *non-dominants* » ou « *sous-dominants* » lorsqu'ils sont présentés simultanément à la surface de la même APC. Ces épitopes immunogènes, plus faibles dans l'échelle de la dominance, sont tout de même capables

de générer une réponse T d'amplitude similaire aux Ag dominants lorsque présentés seuls, mais il reste qu'ils n'entraîneront qu'une réponse faible à indétectable lorsque co-présentés avec des antigènes dominants. Bref, l'immunodominance est un phénomène relatif de dominance qui implique l'existence d'une structure hiérarchique parmi les réponses et une position de dominance relative des antigènes entre eux (Figure 1).



**Figure 1** : Réponses aux épitopes dominants et non-dominants. Lorsque H7<sup>a</sup> et HY sont présents simultanément sur la même APC, seules les cellules T CD8<sup>+</sup> reconnaissant le dominant H7<sup>a</sup> proliféreront (A). Toutefois, il n'est possible d'observer une réponse cytotoxique contre l'épitope non-dominant HY que lorsque ce dernier est présenté seul (C) ou lors de l'absence de cellules T spécifiques à H7<sup>a</sup> (B) ou encore lorsque les deux épitopes sont présentés sur des APC différentes (D). (Modifiée d'après la Figure 1 de Perreault et Fortin<sup>14</sup>)



De plus, la dominance est reconnue comme étant une caractéristique restreinte aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> même si quelques études ont observé un phénomène semblable dans le cas des cellules T CD4<sup>+</sup><sup>15-17</sup>. En effet, pour les épitopes restreints aux molécules du CMH de classe II, la « dominance » observée est davantage associée aux différences d'immunogénicité parmi les déterminants et n'implique généralement pas la suppression de réponses aux autres Ag<sup>18;19</sup>.

### ***2.1. L'Immunodominance et le contexte évolutif***

Le fait de ne pas répondre à tous les épitopes étrangers qui peuvent être présentés simultanément par une cellule tumorale ou infectée peut à première vue paraître risqué pour l'hôte. Cette situation est d'autant plus dangereuse en raison des mutations qui peuvent survenir chez les épitopes à l'origine de la réponse dominante contre un pathogène. Ces mutations résultantes de la pression sélective exercée par les CTL peuvent non seulement rendre inefficace la reconnaissance par le TCR dirigé contre eux, mais elles peuvent aussi permettre aux pathogènes de passer inaperçus; les CTL recherchant une cible devenue désuète. Ainsi, dans plusieurs réponses d'origines virales (influenza, LCMV, HCV, EBV) on retrouve des exemples d'observation d'évasion immune due au phénomène de la dominance impliquant la pression sélective par les CTL<sup>20-23</sup>. Un bon exemple de ce type de phénomène au niveau viral est d'ailleurs rapporté par des travaux de Koenig *et al.* dont les travaux indiquent que des cellules CTL transférés et dirigés contre *nef*, un épitope du VIH, entraîne la mutation du déterminant antigénique d'origine et par conséquent la perte de la cible visée au départ

provoquant une augmentation de la charge virale et une délétion encore plus importantes de cellules CD4<sup>+</sup><sup>21</sup>.

Le phénomène de l'évasion immune peut-être également observé dans la réponse aux cellules tumorales, qui peuvent, conséquemment à la pression des CTL, échapper aux mécanismes d'immunosurveillance et poursuivre leur progression<sup>24</sup>. Malgré tout, dans un contexte de réplication pathogénique rapide, il semble que la dominance représente tout de même une stratégie vitale par laquelle le système immunitaire capitalise sur le développement des lymphocytes les plus prolifératifs et plus agressifs dans le but ultime d'éliminer le plus rapidement et efficacement possible les cellules infectées<sup>25:26</sup>. D'un point de vue stratégique, l'immunodominance permet ainsi de concentrer la réponse contre les « meilleurs » épitopes tout en minimisant le risque d'auto-immunité par réaction croisée par des réponses autoimmunes aléatoires<sup>25:27</sup>.

Cette « *stratégie* » que le système adaptatif aurait de concentrer la réponse sur un nombre très limité d'épitopes s'inscrit bien dans le concept associé au design de vaccin. Dans ce contexte, le but principal de l'élaboration efficace d'un vaccin est de générer, chez l'hôte, un bassin de cellules mémoires suffisamment efficace contre d'éventuelles rencontres pathogéniques et la recherche des cibles optimales prend alors une perspective fondamentale impliquant la nécessité à comprendre les mécanismes de la dominance.

### 3. Immunodomination : racines de la dominance

Une des facettes les plus caractéristiques de la dominance est sans doute la suppression de la réponse dirigée contre les épitopes moins dominants. Parmi les épitopes non-dominants, on retrouve ceux qui sont intrinsèquement moins immunogènes, mais également ceux qui sont immunogènes lorsque présentés seuls comme c'est d'ailleurs le cas de l'épitope  $\text{HY}_{(\text{Uty})}$ <sup>28</sup>.

Ce qui fut autrefois considéré comme un phénomène « d'interférence » des réponses lymphocytaires entre elles est maintenant reconnu comme le processus « d'immunodomination ». L'immunodomination correspond à l'inhibition qu'une réponse dominante exerce sur une réponse non-dominante. Phénomène causal de l'immunodominance, ce processus est considéré comme une caractéristique centrale de la réponse cytotoxique. Les chercheurs qui étudient le processus de l'immunodominance, récemment désignés comme des « immunodominologistes »<sup>29</sup> par Jonathan Yewdell, redirigent ainsi depuis quelques années leurs questionnements, non tant sur les facteurs qui influencent l'immunogénicité mais plutôt vers les facteurs qui contribuent à la génération de populations cytotoxiques à l'exclusion d'autres, pour lesquelles l'antigène respectif est pourtant et de façon surprenante parfois tout aussi immunogène<sup>30</sup>.

#### 4. Immunodomination : reflet d'une compétition

La compétition parmi les différentes populations de cellules immunes est connue depuis maintenant plusieurs années. Toutefois, l'idée que des cellules T CD8<sup>+</sup> compétitionnent entre elles, découle de l'observation de réponses lymphocytaires obtenues contre des AgMiHs dans un contexte de transplantation de cellules hématopoïétiques<sup>31</sup>. Parmi les évidences qui supportent l'existence d'une compétition interclonale, notons le fait que le processus de domination menant à l'immunodominance, par conséquent l'immunodominance, est inexistant lorsque les épitopes sont présentés sur différentes APC et disparaît également lors d'une surabondance de ces dernières<sup>19,28,32,33</sup>. D'ailleurs, les travaux de notre équipe ont démontré, à l'aide des AgMiHs HY et H7<sup>a</sup>, que la dominance disparaissait lorsque les épitopes se retrouvaient présentés sur des APC différentes et cette disparition était aussi observée lors du transfert de charges croissantes ou même extrêmes d'APC. Ces observations ont, dès lors, fortement suggéré l'implication d'une compétition pour les cellules présentatrices<sup>28</sup>.

Ces observations furent également supportées par des expériences de transfert de cellules OT-1 (spécifiques à SIINFEKL, épitope dominant de l'ovalbumine) qui ont permis de mettre en évidence une compétition intraclonale (cellules endogènes vs transgéniques) ainsi qu'une compétition interclonale. Ces résultats démontrent que la compétition peut prendre place non seulement entre des cellules T ayant des spécificités différentes, mais aussi identiques<sup>32</sup>.

Par contre, une autre étude indique des conclusions différentes en ce qui concerne la compétition parmi des cellules de spécificités différentes. Par transfert de cellules P14 (spécifique au peptide gp<sub>33-41</sub> du LCMV), des travaux ont en effet permis d'observer une inhibition de la réponse endogène à gp<sub>33-41</sub> alors qu'aucune inhibition n'a été observée contre les réponses endogènes générées par gp<sub>34</sub> et gp<sub>276</sub>, deux autres épitopes de LCMV. Les auteurs concluent que la compétition entre cellules T de spécificité différentes seraient négligeables ou encore non applicable aux réponses antivirales<sup>34</sup>. Les contradictions entre ces deux séries de travaux peuvent toutefois s'expliquer par le mode d'activation utilisé. En effet, l'équipe de Kedl *et al.*<sup>32</sup> a utilisé des cellules dendritiques qui ont été « manuellement » chargées de peptides, alors que l'équipe de Probst *et al.*<sup>34</sup> a utilisé des cellules dendritiques qui produisent les Ags de manière endogène. Dans cette dernière étude, la densité de présentation du complexe peptide-CMH-I serait, selon les auteurs, physiologiquement plus adéquat, car les APC présenteront continuellement des Ag et de façon plus stable, contrairement au chargement des peptides par incubation.

En résumé, certaines études ont suggéré que la compétition entre les cellules T CD8<sup>+</sup> de différentes spécificités pouvait être présente *in vivo*<sup>32:35:36</sup> alors que d'autres supportent l'idée que la compétition prend place principalement entre cellules de même spécificité<sup>34:37</sup>.

## 5. Élimination des APC : L'enjeu d'une compétition

De précédents travaux ont en ce sens émis l'hypothèse que le succès de la concurrence serait associé à la destruction même des APC<sup>28</sup>. Cette hypothèse implique que la suppression des APC par les CTL dirigées contre un épitope dominant bloquerait du même coup l'activation de clonotypes dirigés contre des épitopes sous-dominants<sup>26:28:38</sup>. L'élimination rapide des APC par une population cytotoxique serait ainsi une étape clé du processus de domination.

Pour supporter cette idée, les travaux de Wong et Pamer démontrent d'ailleurs que l'élimination des APC par les CTL se produit avant la disparition complète du pathogène, soit *Listeria monocytogenes*, dans leur modèle expérimental<sup>39</sup>. Bien que ces travaux indiquent par conséquent l'existence d'une fenêtre temporelle d'activation limitant des activations subséquentes. Par ailleurs, les auteurs soutiennent que l'élimination rapide des APC et l'arrêt de stimulations subséquentes représenteraient un mécanisme de *feedback* négatif destiné notamment à limiter l'accumulation excessive d'APC dans les ganglions ainsi que de limiter leurs activités présentatrices prévenant des risques immunopathologiques<sup>39:40</sup>; une raison d'être qui s'harmonise avec celle de la dominance<sup>25</sup>. Néanmoins pour supporter ce modèle de domination, la cinétique d'élimination des APC devrait se révéler différente selon l'antigène cible (dominant vs non-dominant).

En ce sens, des travaux précédemment effectués par notre équipe supportent l'idée que les APC ne présentant qu'un épitope non-dominant (HY) sont éliminés moins

rapidement que lors d'une co-présentation avec un épitope dominant (H7<sup>a</sup>)<sup>41</sup>. En accord avec ces derniers résultats, les travaux de Wong et Pamer<sup>39</sup> via leur modèle d'épitopes originant de *L. monocytogenes*, ont démontré que l'élimination d'APC présentant l'épitope LLO<sub>91-99</sub> (dominant) se produit plus rapidement que les APC présentant l'épitope p60<sub>449-457</sub> (sous-dominant)<sup>39</sup>.

### ***5.1. Mécanismes de suppression des APC et IFN- $\gamma$***

Des expériences réalisées chez des souris déficientes en perforine (PKO) ont également mis en évidence l'influence que peuvent avoir les délais d'élimination des APC. En effet, l'augmentation de l'amplitude de la réponse spécifique à *L. monocytogenes* chez ces souris illustre bien que la persistance des APC augmente la durée de stimulation et, par conséquent, le recrutement de cellules T naïves de même ou de diverses spécificités<sup>42</sup>.

Bien que chez les souris PKO, un retard de disparition des APC est également observé<sup>41</sup>, il existe outre la cytotoxicité perforine-granzyme, d'autres mécanismes de suppression qui sont susceptibles d'être impliqués dans le processus de domination; notamment la sécrétion d'IFN- $\gamma$ . En effet, des études de la réponse à *L. monocytogenes* menées chez des souris PKO et GKO (déficiente en IFN- $\gamma$ ) ont permis d'observer que non seulement l'amplitude des réponses CD8<sup>+</sup> augmente chez ces souris mais aussi que la hiérarchie de dominance est altérée<sup>42,43</sup>. Ces travaux précisent qu'en absence de perforine, la réponse cytotoxique aux différents épitopes est uniformément augmentée alors qu'en absence d'IFN- $\gamma$ , l'effet porte sélectivement sur certains épitopes, altérant

ainsi la hiérarchie de dominance. L'IFN- $\gamma$  n'agirait pas sur le développement fonctionnel, ni sur la survie des clonotypes impliqués mais a permis d'observer une augmentation de l'amplitude de la réponse des clonotypes activés<sup>44</sup>. Il est proposé que l'IFN- $\gamma$  agit directement sur la cellule T CD8<sup>+</sup> elle-même productrice ou sur les autres cellules environnantes, augmentant conséquemment leur abondance globale. Néanmoins, comme l'abondance de cellules T CD8<sup>+</sup> est déterminée par la balance entre la prolifération et la mort de clonotypes, principalement médiée par l'apoptose, il est aussi proposé que l'IFN- $\gamma$  permettrait d'augmenter les niveaux de protéines anti-apoptotiques dans les cellules T CD8<sup>+</sup> impliquées, contribuant d'une autre façon à augmenter leur abondance<sup>44</sup>. L'implication précise de l'IFN- $\gamma$  reste encore à élucider, mais il est important de considérer que cette cytokine est rapidement sécrétée à l'interface T/APC dans les minutes qui suivent le contact entre le TCR et son ligand. L'influence de cette cytokine et son implication au contact T/APC pourraient éventuellement être considérées déterminante dans la participation de l'IFN- $\gamma$  au processus de domination<sup>45-47</sup>.

Les difficultés que soulèvent l'étude de l'implication de cette cytokine sont notamment dues au fait que les effets biologiques de nombreuses cytokines diffèrent dépendamment du temps à lequel elles sont exprimées. D'ailleurs, l'IFN- $\gamma$  peut augmenter la réponse T et peut aussi induire l'apoptose. Il est possible que les effets de l'IFN- $\gamma$  changent au cours d'une réponse en développement, les premiers effets étant stimuloire et les suivants étant davantage d'une nature suppressive.



## ***5.2. Inactivation des APC***

Dans un autre ordre d'idée, certaines évidences ont également proposé que l'inactivation des APC pourrait être une alternative à la cytolysse des APC dans le blocage d'activations subséquentes. D'ailleurs, 30-40 heures après la maturation des APC, ces dernières deviennent 'épuisées' et diminuent radicalement l'expression de leurs molécules de co-stimulation<sup>48</sup>. Suite à cette diminution, les contacts avec les cellules T ne deviennent que courts et intermittents ne permettant pas d'activations subséquentes efficaces.

Parmi les mécanismes d'inactivation des APC notons également la modulation à la baisse de l'expression des complexes CMH-peptide leur surface. Ce phénomène qui perturbe la stimulation efficace des T naïfs est d'autant plus important qu'il fut observé lors de compétitions entre cellules T de spécificités différentes<sup>49</sup>.

## **6. Facteurs associés au processus de compétition-suppression**

De façon similaire aux facteurs influençant l'immunogénicité, ceux contribuant à l'activation plus rapide de certains clonotypes plutôt que d'autres, sont regroupés en deux principaux axes : les facteurs associés à la présentation des épitopes et ceux associés à la reconnaissance de ces épitopes.

Parmi les facteurs associés à la présentation des épitopes, notons la disponibilité de la surface des APC. La disponibilité des cytokines et des molécules accessoires; la

stabilité de l'Ag pour sa molécule de CMH, la densité de complexes CMH/p-Ag et la nature de l'interaction entre le CMH-peptide et son TCR respectif. Bien que ces facteurs sont connus pour influencer le processus de domination et par conséquent la hiérarchie de dominance, leurs contributions relatives restent encore imprécises.

## ***6.1. Facteurs associés à la présentation***

---

Certaines études du processus d'immunodomination évoquent les conséquences que peuvent avoir la monopolisation des ressources par certains clonotypes plutôt que d'autres dans l'activation de cellules T<sup>28,38</sup>.

### ***6.1.1. Accès à la surface des APC***

Des études de compétition entre cellules T ayant des spécificités identiques ou différentes soutiennent que l'accès à la surface de l'APC (accès aux molécules de surface, cytokines et molécules de co-stimulation) serait déterminant dans la formation d'une synapse efficace et que l'accumulation de cellules naïves à la surface de l'APC nuirait à l'activation de certains clonotypes<sup>32</sup>

Cette hypothèse est également supportée par Freitas et Rocha<sup>50</sup> qui soulignent, par analogie aux principes écologiques, que l'exclusion physique due à un espace limité s'inscrit bien dans le processus de compétition-immunodomination. Grufman *et al.*<sup>38</sup> émet quant à lui l'hypothèse qu'il serait possible que cette monopolisation de la surface des APC par un clonotype particulier, puisse entraîner une forme de monopolisation des

molécules accessoires de surface (co-stimulation et adhésion) (Figure 2). Cette hypothèse vérifiée par Chen *et al.*<sup>51</sup> au niveau des molécules de co-stimulation B7(CD80), démontre toutefois que l'absence de B7(CD80) n'a aucune d'influence sur le processus de domination. L'implication d'autres molécules accessoires mériterait peut-être d'être vérifiée.

Mis à part l'accès physique à la surface des APC, la monopolisation des cytokines retrouvées dans le microenvironnement des APC est également proposée pour contribuer au succès de rivalités intercellulaires<sup>38</sup> (Figure 2).

La réponse à l'épitope H60 est en ce sens exemplaire. H60 est un AgMiH murin provenant de la glycoprotéine membre de la famille Rae1 et ligand à NKG2D. Mise à part la fréquence de précurseurs élevée impliquée dans le processus de domination cette réponse (exposé plus loin), la réponse à cet épitope illustre bien cette notion d'aide que peut apporter l'implication des cellules CD4<sup>+</sup>. Dans ce cas, l'aide procuré par les cellules CD4<sup>+</sup> peut non seulement être effective via les APC (CD40) mais également via l'IL-2 produite par les cellules T CD4<sup>+</sup> en réponse à l'épitope H3<sup>b</sup>, un autre AgMiH de classe II présenté conjointement avec H60, mais par un CMH de classe II. Mis à part la contribution de la fréquence de cellules naïves spécifiques à H60, les auteurs démontrent bien que la présence de cellules T CD4<sup>+</sup> est indispensable, dans ce cas, à l'établissement de la la hiérarchie de dominance<sup>52</sup>.



### 6.1.2. Densité des épitopes

La formation du tricomplexe moléculaire ( $\beta_2$ -microglobuline/chaîne lourde du CMH classe I/peptide) détermine le niveau d'expression d'un épitope à la surface cellulaire. D'ailleurs, plusieurs études ont démontré que la séquence protéique originelle, la machinerie protéolytique et les mécanismes de transport y jouent des rôles majeurs<sup>26:37:54-56</sup>. De plus, il fut démontré que les différentes formes de la machinerie protéolytique (protéasome vs immunoprotéasome) pouvaient même influencer directement la hiérarchie de dominance de certains épitopes<sup>57</sup>.

Comme le nombre d'interactions TCR–ligand est un facteur important dans la formation du signal menant à l'activation, la densité des épitopes présentés est souvent corrélée à l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup><sup>26:58</sup>.

Néanmoins, l'importance de ce paramètre varie dans les études dédiées à l'immunodominance. Les travaux de Eisen *et al.* furent d'ailleurs parmi les premiers à souligner que même de faibles densités d'épitopes pouvaient tout de même générer de fortes réponses. Seulement trois complexes CMH-peptide peuvent même être suffisants pour entraîner une réponse cytotoxique !<sup>59</sup>.

Des études sur la présentation antigénique de cellules infectées par *L. monocytogenes* ont en ce sens démontré que la réponse T CD8<sup>+</sup> prédominante est générée par un des épitopes les moins présentés (LLO<sub>91-99</sub> est présenté à 600 copies/cellule) alors que l'épitope le plus présenté (p60<sub>449-457</sub>, 10 000 copies/cellule)

n'entraîne qu'une faible réponse sous-dominante<sup>60</sup>. Les travaux de cette même équipe démontrent également, par la mutation d'un épitope présenté, que l'augmentation de l'efficacité de présentation n'a qu'un impact négligeable sur la réponse T et la dominance<sup>61</sup>.

Parmi les plus beaux exemples notons également l'AgMiH H60 présenté à 5-15 copies/cellule et considéré parmi les épitopes du soi les plus dominant<sup>52</sup> connu encore jusqu'à maintenant. Même l'épitope d'EBV RRIYDLIEL génère chez l'humain une réponse dominante alors qu'il n'est présenté qu'à une seule copie par cellule<sup>62</sup>.

Ces dernières évidences démontrent clairement que ce facteur, bien qu'il puisse sembler déterminant, n'implique pas de corrélation simple entre l'abondance d'un épitope donné et son caractère dominant<sup>30</sup>. La densité serait un paramètre davantage associé à l'immunogénicité et l'amplitude de la réponse plutôt qu'au processus de domination<sup>63</sup>.

### ***6.1.3. Affinité de l'interaction TCR - ligand***

Complémentaire à la densité des épitopes, l'interaction du TCR avec son ligand est également reconnue comme un paramètre important du processus de domination. Certaines études soutiennent même que l'habileté des cellules T à générer de fortes réponses cytotoxiques résiderait dans l'affinité du TCR pour son ligand, procurant un

avantage compétitif important vis-à-vis d'autres clonotypes<sup>36:64-66</sup>. Par ailleurs, les travaux de biologie théoriques de De Boer et Perelson indiquent qu'il existerait, parmi les différents clonotypes en compétition, un principe d'exclusion qui favoriserait l'activation des clones qui présentent la plus forte avidité<sup>67</sup>. Les travaux du duo Kappler-Marrack indiquent en ce sens que l'efficacité de compétition est relative à l'affinité des TCR des clonotypes impliqués : les clonotypes présentant les plus fortes affinités étant favorisées. Bien que les conclusions de ces derniers travaux furent surtout tirées d'expérimentations de compétitions intraclonales (spécificité identique : cellules T transgéniques vs cellules T endogènes), des résultats semblables furent observés au niveau interclonal<sup>32:49</sup>.

Cependant, bien qu'il puisse s'agir d'exceptions, certains cas, comme celui du TCR humain hyperconservé LC13 indiquent que l'affinité TCR-ligand (mesure du  $K_d$  global seulement) n'est aucunement impliquée dans la forte dominance de l'épitope cible<sup>68</sup>. Le TCR LC13 fut cloné de CTL spécifiques à un épitope d'EBV et dont les CTL en question présentaient des séquences qui utilisaient dans la quasi-totalité des réponses, les mêmes chaînes TCR- $\alpha$  et - $\beta$  dérivées de régions hypervariables identiques, caractérisant d'ailleurs le TCR LC13 comme un récepteur hyperconservé.

#### **6.1.4. Implications structurales des l'interactions TCR-ligand**

Les auteurs des travaux portant sur la dominance de la réponse du TCR LC13 (Kjer-Nielsen *et al.*)<sup>68</sup> suggèrent une relation possible entre « hyperconservation » d'un

TCR » et l'immunodominance d'une réponse. Les auteurs proposent toutefois une implication structurale comme solution à cette énigme. Les données sur cette réponse dominante indiquent qu'aucun des paramètres actuellement soupçonnés comme contributeur potentiel à la dominance (fréquence de précurseur, densité de l'épitope présenté, etc.) ne semble associé à la nature dominante de cette réponse menant même les auteurs proposer (par un raisonnement obscur) que les TCR des clonotypes impliqués pourraient présenter une dimérisation favorable lors des processus précoces d'activation. Cette caractéristique leur conférerait un avantage concurrentiel notable lors des événements précoces de l'activation, contribuant par conséquent au processus de domination<sup>69</sup>. Néanmoins, encore aujourd'hui aucune évidence ne permet d'affirmer que ce facteur constitue directement un avantage compétitif dans le processus de domination.

Dans une perspective semblable, les travaux de Stewart-Jones *et al.* proposent, quant à eux, que le TCR JM22 hautement conservé et impliqué dans la réponse dominante à l'influenza, présenterait une structure particulièrement adaptée à son ligand<sup>70</sup>. Non seulement, cette complémentarité particulière limiterait le nombre de clonotypes capables de reconnaître le déterminant, elle impliquerait également un engagement structural quelconque procurant une activation plus efficace constituant un avantage compétitif notable sur les clonotypes d'autres spécificités<sup>70:71</sup>.



## 6.2. *Facteurs associés aux répondants naïfs*

---

Depuis les vingt dernières années, de nombreuses études ont permis d'identifier bon nombre de facteurs associés à la présentation des épitopes. Mais depuis peu, ce sont les caractéristiques intrinsèques des cellules naïves notamment la fréquence de précurseurs spécifiques et la diversité du répertoire qui font l'objet des recherches les plus intrigantes sur les processus associés à l'immunodominance. Bien que récemment reconnus pour influencer la hiérarchie de dominance, ces facteurs présentent parfois des contributions contradictoires, selon les contextes expérimentaux.

### 6.2.1. *Fréquence de précurseurs*

Une des avenues les plus quantitatives pour expliquer le succès compétitif d'une situation d'immunodomination est sans doute la fréquence élevée de cellules T naïves spécifiques qui circulent en périphérie. En ce sens, les réflexions de Yewdell et Bennink relatives à l'importance que peut avoir le nombre de clonotypes de départ vis-à-vis la vitesse de prolifération, (« *Size vs Speed* ») suggèrent qu'une population numériquement plus importante peut constituer un avantage concurrentiel imposant<sup>30</sup> et certaines évidences appuient d'ailleurs cette hypothèse.

En effet dans un modèle de souris naïves transgéniques pour la chaîne TCR- $\beta$  réarrangée (spécifique à HEL<sub>85</sub>/I-E<sup>k</sup> et combinée à diverses chaînes  $\alpha$ ) il fut observé que la réponse à HEL<sub>85</sub> est dominante avec l'implication d'une fréquence de clonotypes spécifiques de 1/28 000 CD8<sup>+</sup>. Toutefois, cette réponse à HEL<sub>85</sub> se révèle être non-

dominante chez une souris normale dont la fréquence clonotypique impliquée est de un clone spécifique par 300 000 CD8<sup>+</sup> <sup>72</sup>. Les mêmes travaux montrent également qu'une diminution de la fréquence de précurseurs contre les épitopes HEL<sub>13</sub> et HEL<sub>46</sub> change le caractère dominant de la réponse à celui de non-dominant. Les auteurs suggèrent que le processus de domination prendrait alors forme dans la monopolisation de l'accès physique aux APC ainsi que pour les autres ressources <sup>72</sup>.

Un cas plus physiologique : l'épitope tumoral humain melan-A/MART-1. La fréquence de ses précurseurs spécifiques est très élevée (près de 1 clone/5000 CD8<sup>+</sup> due à une forte production intra-thymique <sup>73</sup>) et serait responsable du caractère dominant de la réponse impliquée <sup>74:75</sup>.

Autre cas important, celui de l'épitope H60 dont la dominance serait presque exclusivement la conséquence de la fréquence physiologique « anormalement » élevée de clonotypes naïfs spécifiques (1/20 000 CD8<sup>+</sup>) <sup>52</sup>. Dans ce dernier cas, les auteurs soutiennent que la fréquence de précurseurs est un facteur indispensable au processus de domination.

Par contre, cette même équipe a, dans une étude précédente, démontré que l'augmentation de la fréquence de précurseurs spécifiques à l'épitope H13 ne renversait pas son caractère sous-dominant vis-à-vis H60, indiquant que la fréquence de précurseurs ne pouvait être uniquement considérée comme facteur de dominance <sup>76</sup>. Des conclusions semblables furent obtenues avec l'épitope HA<sub>518</sub> de l'influenza. Des injections de quantités croissantes et massives de clonotypes naïfs n'ont pas permis de renverser son caractère non-dominant <sup>35</sup>.

Dans un contexte de réponse antivirale, le transfert de quantités croissantes de clonotypes spécifiques à la LCMV a également démontré qu'une augmentation du nombre de précurseurs n'avait pratiquement aucun impact dans le contrôle viral et entraînait même des immunopathologies létales<sup>77</sup>. D'autres travaux ont également permis d'observer que même d'importantes fréquences de précurseurs (impliquant des transferts de clonotypes) n'influençaient que minimalement la reconnaissance à d'autres épitopes simultanément présentés<sup>34</sup> et même que de fortes fréquences de précurseurs ne permettent pas d'augmenter l'amplitude de la réponse<sup>78</sup>.

Les résultats contradictoires obtenus par transfert de cellules spécifiques ou dans un contexte physiologique plus « normal » (H60, Melan-A) démontre bien que l'intégration de ce facteur quantitatif dans le processus de domination reste incompris.

### **6.2.2. Diversité du répertoire**

Ce n'est que depuis peu de temps que les immunodominologistes se questionnent sur l'implication du répertoire dans le processus compétitif menant à la dominance. Les premières études ont d'abord mis en évidence que des lacunes (ou « trous ») retrouvées dans certains répertoires pouvaient nuire au développement de réponses normales démontrant l'influence potentielle sur la hiérarchie de dominance<sup>27,79-81</sup>.

L'implication de la diversité du répertoire dans les processus de domination reste toutefois complexe et est principalement basée sur l'idée qu'une grande diversité de

clonotypes est généralement bénéfique pour l'hôte<sup>82</sup>. Une grande diversité de clonotypes augmenterait ainsi la probabilité de retrouver des cellules spécifiques hautement efficaces, optimales et de haute affinité<sup>82</sup>.

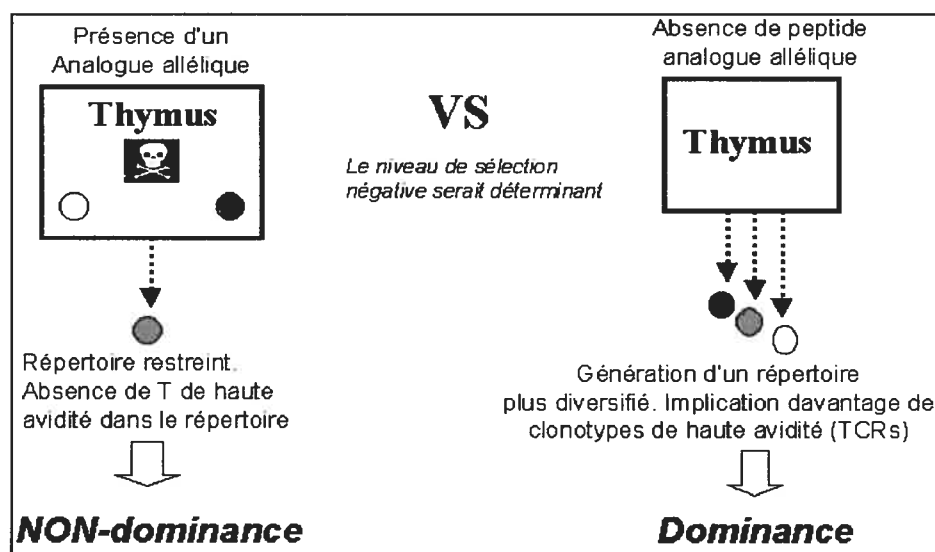
Or, la diversité du répertoire prend naissance par la sélection thymique et un modèle élaboré par l'équipe de Roopenian semble concilier le processus de sélection à celui de domination. Le modèle « *sélection-avidité* » décrit par Choi *et al.*<sup>76</sup>, propose que la dominance d'un épitope serait due à la grande diversité du répertoire qui lui est spécifique. Ce modèle suppose que l'expression d'un peptide du soi, hautement analogue à l'antigène donné (notamment un AgMiH), entraîne une forte sélection négative limitant la diversité du répertoire (concept précédemment proposé par Casanova *et al.*<sup>83</sup>).

Cependant, la génération d'un répertoire restreint limiterait les possibilités d'y retrouver des clonotypes optimaux de haute avidité et du même coup les possibilités de succès lors de compétition interclonale (Figure 1). Dans le cas opposé, l'absence de peptide allélique hautement analogue générerait un répertoire répondant hautement diversifié et présenterait davantage de possibilités d'y retrouver des clonotypes optimaux (Figure 1). En bref, ce modèle propose que la dominance d'un épitope serait due à l'absence d'expression de son produit allélique. Cette absence d'expression de produit allélique est également impliquée lors de réponse anti-virales ou anti-bactérienne où les variants alléliques du soi ne peuvent pas exister pour tous ces Ags.

Par ailleurs, au niveau de l'importance de la diversité du répertoire, les travaux de Messaoudi ont présenté des résultats qui s'inscrivent dans le modèle de *Sélection-*

*Avidité*<sup>84</sup>. L'utilisation de CMH K<sup>b</sup> mutants dans ces travaux démontre qu'un répertoire plus diversifié procure, non seulement une meilleure protection immunitaire, mais implique également des populations spécifiques qui présentent des affinités plus fortes au niveau de l'interaction TCR-ligand, démontrant ainsi qu'un large répertoire implique davantage de cellules optimales.

Ce modèle expliquerait ainsi la dominance de H60 et H28 dont le produit allélique est inexistant ou non exprimé<sup>76;85</sup>, ainsi que le caractère non-dominant de H13 et H47, pour qui des épitopes alléliques fortement analogues ont été identifiés<sup>86-88</sup>. En accord avec ce principe de diversité, plusieurs études soulignent l'importance de la grande diversité d'un répertoire dans l'établissement de la hiérarchie de dominance (Tableau I).



**Figure 3 :** Modèle de « *sélection-avidité* » élaboré par Choi *et al.*<sup>76</sup> pour expliquer l'immunodominance des AgMiHs.

**Tableau I :** Corrélation entre diversité du répertoire et dominance.

<i>Épitope - référence</i>	<i>Statut</i>	<i>Diversité de la réponse</i>
EBNA4 <sub>416</sub> (EBV) <sup>89</sup>	<b>dominant</b>	<b>très diversifiée</b>
EBNA4 <sub>399</sub> (EBV) <sup>89</sup>	sous-dominant	très restreinte
S510 (virus hépatique JHM) <sup>90</sup>	<b>dominant</b>	<b>très diversifiée</b>
S598 (virus hépatique JHM) <sup>90</sup>	sous-dominant	restreinte
NP <sub>324-332</sub> (virus Sendai) <sup>91</sup>	<b>dominant</b>	<b>très diversifiée</b>
LLO <sub>91-99</sub> ( <i>L. monocytogenes</i> ) <sup>92</sup>	<b>dominant</b>	<b>très diversifiée</b>

Cependant, malgré ces exemples de corrélation 'diversité-dominance', plusieurs évidences ne soutiennent pas le modèle de « *sélection-avidité* ». D'ailleurs, en contradiction directe avec ce modèle, l'AgMiH HY<sub>(Uty)</sub>, un des épitopes les moins dominants actuellement connus<sup>76</sup>, n'implique aucun produit allélique analogue et présente même un répertoire répondant hautement diversifié<sup>93</sup>.

Dans le même ordre d'idée, une analyse complète de la hiérarchie de dominance de cinq épitopes de l'influenza murin a démontré l'implication de réponses diversifiées à la fois chez des épitopes dominants et non-dominants<sup>35</sup> qui indiquent que la diversité n'est pas nécessairement associée aux processus menant à la dominance.

Mais parmi les évidences les plus importantes qui dissocient la diversité de la dominance, notons les cas extrêmes pour lesquelles les réponses restreintes impliquent des TCR hautement conservés comme dans le cas de réponses dominantes à EBV (TCR LC13) ou à l'influenza (TCR JM22)<sup>69:70</sup>

Encore une fois, ce facteur associé à la dominance présente des évidences contradictoires qui indiquent bien que l'implication de la diversité dans les processus de domination mérite éclaircissement.

### **6.2.3. Cellules mémoires et altération de la hiérarchie de dominance**

Bien que ce mécanisme implique des cellules mémoires qui ne présentent pas les caractéristiques étudiées dans le processus de domination (associé uniquement aux réponses primaires), l'équipe de Liisa Selin a mis en évidence que les rencontres antérieures avec différents pathogènes peuvent altérer les statuts de dominance de certains épitopes<sup>94</sup>. Ces réactions, appelées « *réactions hétérologues* », correspondent en fait à des réactions croisées entre différents épitopes analogues de différents pathogènes. Une réponse contre l'influenza pourra ainsi générer des cellules mémoires spécifiques à un autre déterminant viral auquel l'hôte n'a pourtant jamais répondu. Ce type de réaction peut ainsi changer radicalement une réponse initialement non-dominante en une réponse fortement dominante.

## 7. Contexte et modèle d'étude du processus d'immunodomination

Comme des dizaines de milliers de protéines sont synthétisées par les cellules de mammifères, les AgMiHs représentent un défi de discrimination complexe pour les CTL et constituent ainsi des modèles antigéniques exceptionnels dans l'étude des processus qui dictent la hiérarchie des réponses<sup>95</sup>.

D'ailleurs, tirant leurs origines des études de réactions du greffon contre l'hôte, nos deux AgMiHs modèles H7<sup>a</sup> (anciennement « B6<sup>dom1</sup> ») et HY<sub>(Uty)</sub> sont respectivement dominants et non-dominants et tous deux restreints par H2D<sup>b</sup>. Pour sa part, HY<sub>(Uty)</sub> (WMHHNMLDI) est encodé par le gène *Uty* du chromosome Y et n'est présenté qu'à 10 copies/cellule à la surface de splénocytes murins<sup>26</sup>. Comme la famille d'AgMiHs HY comprend des épitopes également présentés par des molécules de CMH de classe II, la réponse contre des cellules mâles implique l'aide des cellules CD4<sup>+</sup> simultanément activées. L'AgMiH H7<sup>a</sup> qui ne génère aucune réponse de la part des cellules CD4<sup>+</sup> est quant à lui, un nonapeptide (KAPDNRETL) encodé par le locus H7 de la partie terminale télomérique du chromosome 9 murin<sup>26:41:96</sup>. H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup> est retrouvé à la surface de splénocytes de souris C57BL/6 à près de 1000 copies/cellule, ce qui en fait un des AgMiHs restreints au CMH de classe I les plus abondants actuellement identifiés<sup>26:97</sup>.

Les épitopes HY<sub>(Uty)</sub> et H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup> présentent de nombreux avantages quant à l'étude de l'immunodominance. En effet, en se situant aux extrêmes hiérarchiques de la dominance, ils offrent la chance de mettre en évidence les différences les plus subtiles



que peut impliquer le processus de domination. Ces modèles antigéniques présentent également la particularité de ne pas impliquer de souris transgéniques, respectant ainsi les conditions physiologiques réelles de présentation antigénique. D'ailleurs, la disponibilité de souris congéniques aux épitopes étudiés représente un avantage majeur, permettant ainsi plusieurs combinaisons de réponses (souris H7<sup>a+</sup> vs H7<sup>b+</sup>; souris mâles vs femelles et combinaison de co-présentation).

Bien que les deux épitopes présentent des affinités de liaison stables et similaires pour la même molécule de classe I (demi-vie de près de 8h)<sup>28</sup>, le processus de domination de H7<sup>a</sup> sur HY déterminé sur des bases cytotoxiques<sup>28</sup> est complet. En fait, HY ne peut entraîner une réponse cytotoxique que lorsqu'il est le seul épitope immunogène présenté. Au contraire, dans plusieurs combinaisons, H7<sup>a</sup> est toujours dominant. Ceci implique qu'il génère toujours une réponse CTL spécifique, et ce, même lorsque co-présenté avec des centaines, voire des milliers d'autres Ags (AgMiHs C57BL vs cellules C3H.SW)<sup>28</sup>. Pris individuellement, le développement cytotoxique des clones dirigés contre H7<sup>a</sup> est plus rapide que HY et suggère que la vitesse de développement est déterminante dans ce cas d'immunodomination<sup>26</sup>. En ce sens, les travaux de Loyer démontrent aussi que la disparition des APC est retardée lorsque HY est présenté seul<sup>41</sup>.

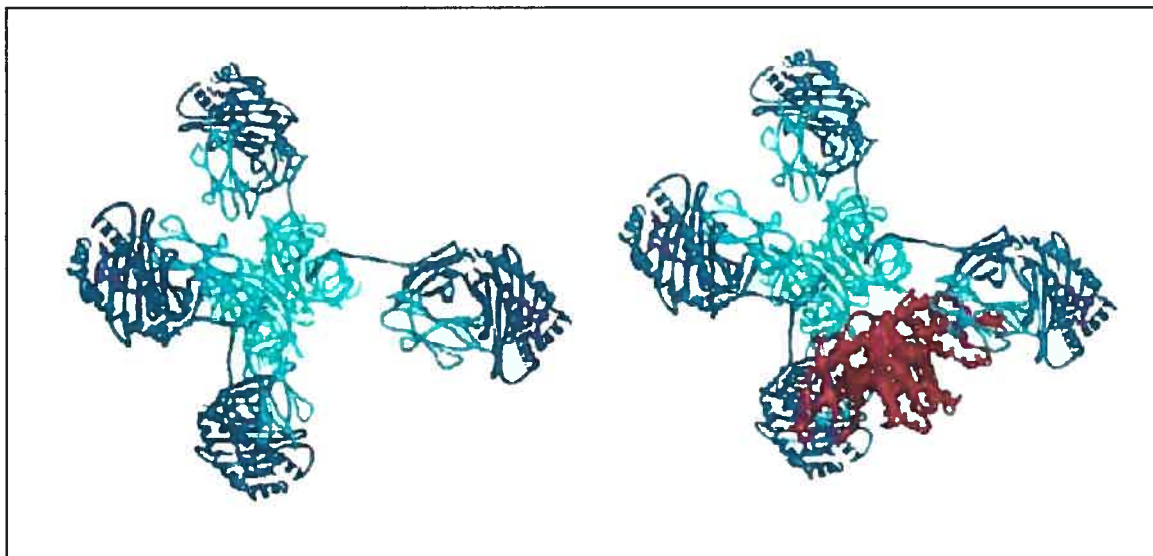
### ***7.1. Première série de travaux***

La plupart des résultats antérieurs indiquaient que dans le processus de domination, il y avait absence du développement des fonctions cytotoxiques des clones dirigés contre l'épitope non-dominant<sup>26,28</sup>. Toutefois, il fut démontré que le processus

d'activation *in vitro* peut entraîner plusieurs niveaux d'activation pouvant mener à l'expansion de cellules T CD8<sup>+</sup> qui ne présentent pourtant pas de fonctions effectrices ou encore qui produisent de l'IFN- $\gamma$  ou l'IL-2, sans toutefois être cytotoxiques<sup>98-100</sup>. Ainsi, bien que les résultats précédents aient permis de mettre en lumière d'importantes caractéristiques relativement à nos AgMiHs modèles, ils ne permettent pas d'affirmer si ce processus d'immunodomination implique soit un blocage dans la prolifération cellulaire ou s'il entraîne la prolifération de clones non-fonctionnels.

Ainsi, la grande question qui se présentait dès le début de l'ensemble de nos travaux : Est-ce que l'immunodominance résulte d'un blocage des fonctions effectrices ou encore d'un blocage de la prolifération des clonotypes associés à une réponse sous-dominante ? Aucun indices pouvait nous suggérer une réponse comme une autre à cette époque et mis-à-part des tests de dilutions limites pouvant indiquer indirectement une expansion clonale de cellules dirigés contre un épitope sous-dominant, une nouvelles technologie devenait indispensable à la résolution de cette énigme.

Toutefois, cette problématique, fut surmontée par l'arrivée de la technologie des tétramères de CMH-I (Figure 4), qui nous a permis d'entreprendre nos premiers travaux de la mesure directe de l'expansion clonale. De plus, cette première série de travaux s'était également donnée comme mandat de mettre en lumière les divers facteurs constituant un avantage compétitif pour les différentes populations T CD8<sup>+</sup> et qui contribueraient ainsi à l'établissement de la dominance.



**Figure 4 :** Représentation schématique de tétramères de CMH de classe I. En mauve, chaque peptide est retrouvé dans la niche peptidique de la chaîne lourde (bleu foncé), cette dernière étant associée à la  $\beta_2m$  (bleu). Les CMH-I sont associés à la streptavidine (turquoise) elle-même couplée à un fluorochrome, dans ce cas ci, la phycoérythrine (PE) (rouge). (Figure modifiée d'après la Figure 1 , Altman JD et al. sciences 1996)

## 7.2. *Seconde série de travaux*

Les travaux sur les origines protéiques de l'épitope H7<sup>a</sup> ont non seulement permis d'identifier la protéine source SIMP/STT3-B qui encode H7<sup>a</sup> en position 770-778, mais ces travaux ont également permis d'identifier un produit allélique de H7<sup>a</sup>. Cet épitope, nommé H7<sup>b</sup>, dont la séquence protéique ne diffère que par un groupement méthylène en position 7 (E→D) est également exprimé en périphérie et entraîne aussi une réponse dominante lors d'une réponse H7<sup>b</sup>→H7<sup>a</sup> <sup>101</sup>.

Ainsi, la dominance de H7<sup>a</sup> combiné à l'expression de l'allèle H7<sup>b</sup> (KAPDNRDTL) semble difficilement conciliable au modèle de dominance « *sélection-*

*avidité* » de Choi *et al.* <sup>76</sup>. En effet, ces auteurs proposent que seuls les épitopes dont leur produit allélique n'est pas exprimé à la surface cellulaire peuvent générer une réponse dominante. Il est d'ailleurs également difficile de concilier que l'immunodominance résulterait d'un répertoire hautement diversifié, compte tenu de la remarquable similarité de H7<sup>a</sup> et H7<sup>b</sup>, dont on peut supposer provoquer un *écatombe thymique*<sup>76,83</sup>. Ce paradoxe nous a longtemps tourmenté et a même entraîné la division du programme de recherche destiné entièrement à SIMP vers une autre branche destinée quant à elle aux racines de l'immunodominance et relativement à cause de deux principales questions qui nous tourmentaient.

Soit, 1) Est-ce que deux peptides aussi structuralement semblables peuvent être discriminés par un TCR ? et 2) Est-ce que l'expression d'allèle aussi semblables structuralement influence la diversité du répertoire ? Comme les études de la dominance suggéraient presque implicitement qu'une réponse immunodominante est associée à un répertoire hautement diversifié, il nous était impossible de concilier cette possibilité avec nos évidences sur l'existence de deux allèles aussi semblables sur le plan structural.

Comme la diversité du répertoire répondant représente la base du modèle en litige, nous avons ainsi tenté dans cette deuxième série de travaux, de mettre en lumière la diversité du répertoire répondant à H7<sup>a</sup> et d'analyser les diverses caractéristiques intrinsèques des clonotypes susceptibles d'être impliqués dans le processus de compétition menant à la domination.

L'ensemble des données obtenues jusqu'à ce jour sur le processus d'immunodomination a guidé nos visions nous menant à nous poser les questions fondamentales suivantes :

- Existe-t-il des différences parmi des cellules T CD8<sup>+</sup> naïves qui avantageraient ou désavantageraient leur activation lors d'un processus de compétition interclonale ?
- Ces différences seraient-elles intrinsèques aux cellules répondantes ou associées aux paramètres de présentation antigénique ?
- Existe-t-il une intégration de tous les paramètres connus et inconnus qui dicteraient le processus d'immunodomination ?

### ***7.3. Troisième série de travaux : Applications immunothérapeutiques***

Parmi les nombreuses avenues aujourd'hui disponibles pour éliminer des cellules tumorales émergentes, l'immunothérapie en représente une des plus prometteuses et des moins nocives quant aux effets secondaires impliqués<sup>102:103</sup>. Pouvant être utilisée également de concert avec d'autres thérapies anti-tumorales, cette stratégie témoigne que l'efficacité destructrice du système immunitaire et peut-être dirigée efficacement contre des cellules malignes conférant à l'hôte une résistance préventive à long terme qu'aucun autre traitement ne peut encore aujourd'hui procurer<sup>102:103</sup>.

Parmi les cibles potentielles sélectionnées lors d'immunothérapie anti-tumoral, on retrouve les épitopes associés aux cellules tumorales (*Tumor Associated Antigens*, TAA) qui proviennent principalement de protéines mutées ou d'épitopes normalement non

exprimés<sup>102</sup>. Ces épitopes semblent être des cibles de choix, mais comme la tolérance au soi peut représenter un obstacle indésirable car les réponses développées peuvent être mitigées par leurs origines du soi.

Les épitopes distincts de l'hôte, tels que les AgMiH impliqués lors de transplantation de cellules hématopoïétiques allogéniques représentent dans certains contextes une alternative de choix aux TAA. Pouvant également être retrouvées sur les cellules tumorales, ces cibles devenues étrangères suite au passage d'un donneur à un receveur ne sont pas soumises aux mêmes effets de la tolérance par le soi<sup>103</sup>. Comme l'étude de la dominance de H7<sup>a</sup> est née en partie d'observations faites lors d'expérimentations dédiées à l'élaboration de stratégies immunothérapeutiques destinées à traiter la leucémie<sup>103</sup>, l'implication du caractère dominant de cet Ag à nos essais nous a révélé que sa dominance est un paramètre crucial au succès de telles thérapies.

Notre troisième série de travaux axée sur l'étude d'essais immunothérapeutiques démontre dans nos modèles que seule la reconnaissance de l'épitope immunodominant H7<sup>a</sup> stimule suffisamment les cellules T pour permettre la survie des souris atteintes. Ces travaux sont par ailleurs réalisés conjointement avec de multiples TAA et AgMiH non-dominants.

Cette étude démontre également, par l'utilisation de tétramères H7<sup>a</sup> que le développement cinétique des réponses à H7<sup>a</sup> garde de grandes similitudes entre les réponses obtenues dans un contexte immunothérapeutique et celles obtenues dans un contexte d'immunisation plus « normale » (Figure 2, Articles 1). L'étude des cinétiques d'expansion dans différents contextes de stimulation immunothérapeutique par les

cellules EL4 nous a également permis d'obtenir d'importantes données relatives au développement de la réponse à H7<sup>a</sup> parallèlement à l'élimination de cellules tumorales.

Cette troisième série de travaux tirée de deux articles démontre que le caractère dominant de la réponse à H7<sup>a</sup> est indispensable au succès de telles stratégies thérapeutiques et représente un modèle dans l'élaboration de stratégie similaire.

**PREMIER ARTICLE**

---

**« Immunodomination results from functional  
differences between competing CTLs »**

**Eur. J. Immunol. 2001. 31: 2284–2284**

**Guillaume Roy-Proulx, Marie-Christine Meunier, Anne-Marie Lanteigne,  
Sylvie Brochu, et Claude Perreault**



**ABSTRACT**

The presence of dominant epitopes suppresses generation of CD8<sup>+</sup> T cell cytotoxic activity towards other non-dominant immunogenic epitopes found on the same antigen-presenting cell (APC). This phenomenon, termed immunodomination, drastically restricts the diversity of the repertoire of cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses. We show that immunodomination abrogates expansion rather than differentiation of CTLs specific for non-dominant epitopes, and that it is regulated by the CTL/APC ratio. Furthermore, we demonstrate that the essence of immunodomination is the level of effector function of CTLs specific for the various epitopes, as assessed on the basis of cell surface expression of O-glycan epitopes and intracellular perforin content, rather than the number of these CTLs. Based on our results, we deduce that APCs are either rapidly eliminated or become exhausted upon interaction with CTLs specific for dominant epitopes. Thereby they are unable to prime CTLs that recognize non-dominant epitopes. We conclude that following antigen priming CTL populations of similar size can display important differences in effector function, and that these functional differences are instrumental in shaping the repertoire and in determining the outcome of CTL responses.

*Abbreviation used in this paper:* MiHA, minor histocompatibility antigen.

## INTRODUCTION

The functioning of the adaptive immune system found in jawed vertebrates has been shaped by 450 million years of co-evolution with viruses and bacteria (1, 2). Recognition of MHC class I/peptide complexes by CD8<sup>+</sup> CTLs has emerged as a crucial and effective, effector mechanism against intracellular pathogens (3). For a peptide to be immunogenic, it must be efficiently processed and presented in association with MHC molecules to CTLs with a complementary T cell receptor. Remarkably, confrontation with complex pathogens usually results in the generation of cytotoxic activity focused on a single, or at most a few, epitopes (4-6). *A priori*, such limited diversity of CTL response repertoire appears hazardous for the host. Viruses, such as human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, influenza A virus and lymphocytic choriomeningitis virus may be initially controlled by CTLs but subsequently escape through mutation of the relevant epitope (7-11). Constraints related to antigen processing and to the availability of complementary TCRs are not sufficient to explain why, during the course of an immune response, the number of epitopes recognized by cytotoxic CD8<sup>+</sup> cells is so drastically restricted. Indeed, studies of CTL responses to viruses, tumor antigens, and minor histocompatibility antigens (MiHAs) have shown that the diversity of CTL response is further limited by immunodomination: the presence of some dominant epitopes suppresses generation of CTLs specific for other immunogenic non-dominant epitopes (12-16). Non-dominant epitopes elicit CTL responses when they are presented alone but they are neglected when presented with dominant epitopes.

Suppression of CTL cytotoxic response toward immunodominated epitopes is not due to competition for binding to MHC class I molecules. In fact, immunodomination is frequently observed between peptides that are presented by different class I allomorphs such as K<sup>b</sup> and D<sup>b</sup> on APCs (5). Moreover, immunodomination is not associated with decreased expression of non-dominant peptides at the cell surface in the presence of dominant peptides (12, 17). Implicit in the definition of immunodomination is the notion that whether or not an epitope will elicit a response depends on its own characteristics as well as on those of co-presented epitopes. Therefore, since epitope A may dominate B

but be dominated by C, its designation as dominant or not is relative and potentially ambiguous. Comparison of B6<sup>dom1</sup> and HY MiHAs has therefore been an instructive paradigm to study immunodomination (12, 14, 15, 18, 19). Indeed, these two epitopes lie at opposite ends on the dominance scale in H2<sup>b</sup> mice. HY elicits CD8 cytotoxic response when presented alone but not when presented with one or numerous autosomal MiHAs (12, 20). On the contrary, that B6<sup>dom1</sup> is always dominant means that it induces CD8 cytotoxic effectors when presented with hundreds of MiHAs (12, 15). Both B6<sup>dom1</sup> and HY are H2D<sup>b</sup>-associated nonapeptides. HY is encoded by the *Uty* gene whereas B6<sup>dom1</sup> is encoded by the *H7* locus at the telomeric end of chromosome 9 (15, 19, 21-23). Studies of CTL responses to B6<sup>dom1</sup> and HY showed that immunodomination is found only when both dominant (B6<sup>dom1</sup>) and non-dominant (HY) epitopes are presented on the same APC, and does not occur when they are presented concomitantly on separate APCs (12). This observation has been confirmed with other antigen combinations (17, 24) and it indicates that immunodomination results from competition between responding CTL populations that recognize epitopes on the same APC (14).

This work aims to decipher the mechanism of immunodomination: how the presence of a dominant epitope (B6<sup>dom1</sup>) prevents generation of a cytotoxic response to a non-dominant determinant (HY) presented on the same APC.

## METHODS

*Mice.* The following strains of mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and bred at the Guy-Bernier Research Center: C3H.SW, C57BL/6J (B6), C57BL/6-*Pfp<sup>tm1</sup> Arp* (B6.PKO), and C57BL/10J (B10). B10.C-*H7<sup>b</sup>(47N)/Sn* (B10.H7<sup>b</sup>) breeder mice were a kind gift of Dr. D. C. Roopenian (The Jackson Laboratory). Mice used between 6 and 16 weeks of age were maintained in specific pathogen-free conditions according to the standards of the Canadian Council on Animal Care.

*Immunization and adoptive transfer.* Mice were primed by i. p. injection of  $2 \times 10^7$  spleen cells. In adoptive transfer experiments, spleen cell suspensions containing  $5 \times 10^6$  CD8<sup>+</sup> T cells were injected via the tail vein in irradiated (10 Gy) recipients.

*Peptides.* B6<sup>dom1</sup> (AAPDNRETF) and HY (WMHHNMDLI) peptides were synthesized by the Sheldon Biotechnology Centre (Montreal, Canada). Purity, as determined by reversed phase-high performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis, was above 97%.

*MHC class I/peptide tetramers.* MHC class I (H2D<sup>b</sup>)/peptide (B6<sup>dom1</sup> or HY) tetramers were produced as previously described (25, 26). Recombinant  $\beta_2$ -microglobulin and the extracellular domain of the MHC class I heavy chain containing the BirA recognition sequence in-frame at its C terminus were overexpressed in *Escherichia coli* as insoluble aggregates that formed inclusion bodies. Purified inclusion bodies were solubilized in urea, and monomeric H2D<sup>b</sup> complexes were refolded around peptide by dilution of denaturing buffer. Monomeric complexes were recovered by anion exchange chromatography over a Mono Q HR column (Pharmacia, Uppsala, Sweden). H2D<sup>b</sup>/peptide complexes were biotinylated using BirA enzyme (Avidity, Denver, CO) as described (27). Tetramers were generated by mixing the biotinylated monomeric complexes with NeutrAvidin-PE (Molecular Probes, Eugene, OR) at a 6:1 molar ratio. Then, biotinylated tetramers were purified by gel filtration over a Superdex 200 HR column (Pharmacia). Purified tetramers were stored at 1 mg/ml at 4°C and were frequently tested on B6<sup>dom1</sup>- and HY-specific T cell lines to document maintenance of staining capacity and signal intensity. B6<sup>dom1</sup>- and HY-specific CD8<sup>+</sup> T cell lines have been previously described (22, 23).

*Cell staining and flow cytometry.* Cell suspensions were stained with allophycocyanin-conjugated anti-CD8 antibody (Pharmingen, Mississauga, Canada), sometimes with 1B11 antibody (Pharmingen), in PBS/BSA 0.1% for 25 min at 4°C, washed, and then incubated with 1 $\mu$ g PE-labeled tetramers at 37°C for 40 min. TCR expression was monitored for antigen specific T cell lines with FITC-conjugated anti-TCR $\alpha\beta$  antibody (Pharmingen). Cells were analyzed on a FACSCalibur™ (Becton Dickinson, Mountain View, CA) using CELLQuest™ software. Intracellular perforin labeling was performed as previously described (28). Briefly, splenocytes from mice primed *in vivo* against

either B6<sup>dom1</sup> or HY were incubated for 5 h with irradiated B10 male spleen cells in culture medium supplemented with 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  brefeldin A (Sigma, Oakville, Canada), washed and permeabilized with 0.1% saponin (Sigma), and stained with anti-perforin antibody (clone KM585; Kamiya Biomedical, Seattle, WA) (29). Results for group means were compared using Student's *t* test.

## RESULTS

*Recognition of B6<sup>dom1</sup> prevents expansion of HY-specific CD8<sup>+</sup> T cells.* *In vitro* studies have shown that T cell activation can elicit a diverse array of effector activities and that there is a hierarchy of thresholds to activate T cells for different functions (30, 31). In the case of naïve CTLs, induction of perforin-dependent cytotoxicity is the most stringently controlled function and is elicited only by strong agonists that induce optimal TCR signals. Thus, antigen presentation can result in expansion of CD8<sup>+</sup> T cells that display no effector function or that produce cytokines such as IL-2 and IFN $\gamma$  but are not cytotoxic (16, 29, 30, 32, 33). In previous studies of CTL immunodomination, the influence of dominant epitopes on response to non-dominant epitopes has been assessed essentially using cytotoxicity assays. Such estimations of cytotoxic activity allow no inference to be drawn as to whether immunodomination prevents expansion of CTLs specific for non-dominant antigens or whether it simply precludes development of cytotoxic activity by these CTLs. To address this fundamental issue, we used tetramer labeling to estimate expansion of B6<sup>dom1</sup>- (dominant) and HY- (non-dominant) specific T cells 5 to 30 days after priming with 20 x 10<sup>6</sup> spleen cells. Staining of B10 splenocytes as well as B6<sup>dom1</sup>- and HY-specific cell lines showed that B6<sup>dom1</sup>/D<sup>b</sup> and HY/D<sup>b</sup> tetramers were highly specific and sensitive reagents (Fig. 1).

Expansion of B6<sup>dom1</sup>- and HY-tetramer<sup>+</sup> cells was assessed in three combinations of priming cells/recipient mice which differed in i) HY, ii) HY and B6<sup>dom1</sup>, or iii) HY + B6<sup>dom1</sup> + numerous (more than 40) other MiHAs (Fig. 2). In mice primed solely against HY, we detected expansion of antigen-reactive CD8<sup>+</sup> T cells that peaked at about day 15 (Fig. 2). This indicated that there are no inherent constraints to the expansion of CD8<sup>+</sup> T cells specific for this non-dominant MHC class I-associated epitope. Results were strikingly different after priming with APCs expressing both HY and B6<sup>dom1</sup>. In that case, expansion of HY-specific CD8<sup>+</sup> T cells was almost totally abrogated ( $p = 0.03$ , HY alone versus HY with B6<sup>dom1</sup>). Expansion of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells was unaffected when numerous other MiHAs were present on the priming APCs, whereas in the latter case no expansion of HY-specific T cells was detected. Together, these data show that

immunodomination prevents expansion of CTLs that recognize the non-dominant epitope HY. This finding excludes the alternative hypothesis that immunodomination might result in a quantitatively normal expansion of functionally defective HY-specific CTLs. Furthermore, our data show that the presence of a single dominant epitope is sufficient to inhibit expansion of HY-specific CTLs, whereas the presence of more than 40 other epitopes does not affect expansion of B6<sup>dom1</sup>-specific CTLs.

*Immunodomination is regulated by the T cell/APC ratio.* Compelling evidence indicates that immunodomination results from competition between responding CTL populations that recognize dominant versus non-dominant epitopes. The essence of this competition however remains elusive. Recent studies using hematopoietic chimeras with variable frequency of antigen-specific T cells (TCR transgenic CD4 T cells specific for an I-E<sup>k</sup>-restricted pigeon cytochrome peptide) have demonstrated an inverse relationship between the abundance of antigen-specific T cells and their level of expansion after antigen priming (34). At low frequency almost all T cells proliferated but at higher frequency of antigen-specific T cells, the proportion of cycling cells decreased irrespective of the number of antigen-bearing APCs. This suggests that there may be homeostatic regulation or some limitation of the total number of effector T cells generated during the course of immune response. Accordingly, expansion of antigen-responsive T cells would cease when the number of effector T cells reaches a given threshold. This could theoretically restrict the diversity of the repertoire of CTL responses and be instrumental in immunodomination when several epitopes are presented simultaneously. Alternatively, the fact that immunodomination takes place only when the dominant and the non-dominant epitopes are present on the same APC suggests that the crux of immunodomination is competition for APC resources (12, 15, 24). To address this, we estimated expansion of antigen-specific T cells in a model where the number of APCs expressing HY and/or B6<sup>dom1</sup> was increased by several orders of magnitude. Splenocyte suspensions containing  $5 \times 10^6$  CD8<sup>+</sup> T cells were injected into irradiated recipients presenting selected MiHA differences, and the number of tetramer<sup>+</sup> cells was assessed on days 9 and 15 (Fig. 3). HY and B6<sup>dom1</sup> share the same tissue distribution profile. Both antigens are ubiquitous and well expressed on

hematopoietic APCs which have an essential role in priming of naïve CTLs (23, 35-37). Thus, in this model injected T cells were confronted with large quantities of antigen-positive APCs. Under these conditions, we found that the numbers of HY- and B6<sup>dom1</sup>-specific CD8<sup>+</sup> T cells were similar, regardless of whether their cognate antigens were presented alone, together, or with multiple MiHAs. Thus, when T cells encountered large numbers of APCs co-expressing HY and B6<sup>dom1</sup> no immunodomination was found. We conclude that immunodomination results from competition for APC resources.

*Effector function of CTLs specific for B6<sup>dom1</sup> and HY epitopes.* Why do T cells specific for B6<sup>dom1</sup> compete successfully for APCs when presented with epitopes such as HY? One possibility is that because they have high precursor frequency or because they proliferate rapidly, B6<sup>dom1</sup>-specific T cells simply outnumber HY-specific T cells at the APC surface. Results depicted in Fig. 2 and 3 argue against this. Indeed, when immunodomination was precluded because HY was presented alone or because high numbers of antigen-bearing APCs were present, the numbers of HY-specific T cells detected after antigen priming were similar to those of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells. Hence, if the difference between CD8<sup>+</sup> T cells recognizing B6<sup>dom1</sup> and HY is not quantitative, it is qualitative. Therefore, to determine whether B6<sup>dom1</sup>-specific T cells displayed superior effector function, we assessed expression of O-glycans recognized by the 1B11 antibody on tetramer<sup>+</sup> T cells 15 days after priming against either HY or B6<sup>dom1</sup>. 1B11 monoclonal antibody is specific for epitopes on CD43 and CD45RB glycoproteins expressed on effector CD8<sup>+</sup> T cells (38, 39). Expression of cell surface O-glycan epitopes is specifically upregulated on effector, as opposed to naïve and memory CTLs (40). Strikingly, when labeled with 1B11 antibody, the proportion of positive cells and the mean fluorescence intensity were ~ 77%/168 U for B6<sup>dom1</sup>-specific T cells, but only ~ 29%/74 U for HY-specific T cells. Furthermore, B6<sup>dom1</sup>-specific T cells had a much higher intracellular perforin content than HY-specific T cells (Fig. 4). These data support the idea that the critical issue involved in immunodomination is a question of CTL function rather than CTL numbers. CTLs that compete successfully for APC resources display superior effector function as evidenced by 1B11 labeling and perforin content.



*Immunodomination prevails in the absence of perforin-mediated killing.* Given the evidence that perforin-mediated killing is the main though not the sole mechanism responsible for elimination of APCs *in vivo* (19), and that CTLs responsible for immunodomination show greater intracellular perforin content (Fig. 4), we evaluated whether immunodomination would disappear in the absence of perforin. Here, the underlying assumption is that by killing APCs, CTLs specific for immunodominant determinants might reduce the duration of antigen presentation below a critical threshold and consequently impede the generation of CTL responses toward non-dominant antigens. This would be consistent with reports showing that the duration and/or the level of proliferation of antigen-reactive CTLs is increased in perforin-deficient mice (41, 42). To test our prediction we assessed expansion of HY-tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells under two conditions: when HY was presented alone to wild-type mice (B6 male cells into female B6 mice), and when HY was presented with numerous other MiHAs to either perforin-deficient (C3H.SW cells into B6.PKO) or wild-type mice (C3H.SW cells into B6 female mice). As expected, in wild-type mice, expansion of HY-specific T cells was observed only when HY was presented alone (Fig. 5). The key finding was that immunodomination was not abrogated in perforin-deficient animals. Thus, immunodomination cannot be accounted for solely on the basis of perforin-mediated killing of APCs.

## DISCUSSION

Our model has two noteworthy features. CD8<sup>+</sup> T cell responses were studied in naive mice with a normal T cell repertoire: they were not transgenic, and their T cell repertoire was not modified by passively transferred T cells. Besides, antigens used for priming were normal endogenous epitopes expressed at physiological levels: APCs were not transgenic, transfected, or peptide-coated. Our relatively uncontrived model suggests several points. When two or more MHC class I-associated epitopes are found on the same APCs, the presence of a single dominant antigen, B6<sup>dom1</sup>, is sufficient to cause immunodomination. Yet B6<sup>dom1</sup> itself is resistant to immunodomination when co-presented with more than 40 other epitopes. Immunodomination prevents expansion rather than differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells that recognize a non-dominant epitope, HY, and is regulated by the CTL/APC ratio. Of special interest, the key difference between T cells that recognize B6<sup>dom1</sup> and those recognizing HY is qualitative or functional rather than quantitative. The notable feature of T cells specific for B6<sup>dom1</sup> is that they show striking upregulation of molecules involved in CTL effector activity and not that they accumulate to particularly high levels (as assessed by tetramer staining).

One surprising finding was that, when immunodomination was precluded (Fig. 2 and 3), the rate of accumulation of HY-tetramer<sup>+</sup> T cells was similar to that of B6<sup>dom1</sup>-tetramer<sup>+</sup> T cells. Thus, the dominant status of B6<sup>dom1</sup> does not depend on an intrinsically higher proliferative activity of cognate CD8<sup>+</sup> T cells. The crucial difference between HY- and B6<sup>dom1</sup>-specific T cells relates to their CTL effector activity estimated on the basis of two parameters: the expression of O-glycans recognized by 1B11 antibody and the intracellular perforin content. Compared with B6<sup>dom1</sup>-tetramer<sup>+</sup> T cells, HY-tetramer<sup>+</sup> T cells can proliferate as vigorously, yet are defective in acquiring effector function. This observation is consistent with recent evidence that, although T cell proliferation and acquisition of effector function are often correlated, they are not mechanistically linked (34). Supporting this idea, activated CD8<sup>+</sup> T cells have been shown to vary in their lytic potential, a discrepancy determined by the nature of the epitope which they recognize (16, 33). Thus, even though HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells

can be present at very high frequencies in HIV infected subjects, these CTLs remain crippled in terms of cytotoxic activity relative to CMV-specific CTLs (29, 43). Our study suggests that, aside from its impact on eradication of intracellular pathogens, development of effector function by CTLs is responsible for immunodomination, and is thereby instrumental in shaping the repertoire of CTL responses. How does the nature of a given epitope regulate the development of effector function in cognate CTLs? Previous studies with B6<sup>dom1</sup> provide evidence that epitope density may be a key determinant because of its influence on the efficiency of TCR triggering (15). This contention is supported by the fact that while B6<sup>dom1</sup>/D<sup>b</sup> complexes do not interact with their respective TCR with higher affinity than HY/D<sup>b</sup> complexes, the former epitopes are much more abundant at the surface of APCs: 1000 versus 10 copies per cell for B6<sup>dom1</sup> and HY, respectively (15)

The fact that immunodomination is regulated by the CTL/APC ratio suggests that its essence is competition for APC resources (Fig. 3). This is consistent with studies of Kedl et al. (24) in a model based on immunization of mice with peptide-coated dendritic cells and adoptive transfer of TCR transgenic OT1 T cells specific for the dominant K<sup>b</sup>-associated ovalbumin peptide. These authors showed that injection of OT1 CD8<sup>+</sup> T cells inhibited the response of host antigen-specific T cells to two ovalbumin-derived peptides, and that this inhibition could be overcome by the injection of large numbers of antigen-pulsed dendritic cells. Our work extends these results in a non-transgenic model in which mice with a normal T cell repertoire were confronted with endogenous epitopes expressed at physiological levels.

How does competition for APC resources lead to the selective expansion of CTL specific for dominant epitopes and to the neglect of non-dominant epitopes? We consider the following three observations. When immunodomination occurred, expansion of CTLs that recognize HY was aborted and not merely delayed (Fig. 2). Immunodomination was prevented when APCs were present in very high numbers (Fig. 3). CTLs specific for B6<sup>dom1</sup> displayed superior effector function (Fig. 4) but not a higher intrinsic proliferative potential (Fig. 3). These data argue against two proposed

mechanisms for CTL competition which hinge on the assumption that CTLs specific for dominant epitopes might simply monopolize access to the APC surface without impairing APC number or function (15, 24). First, it has been conjectured that, because of more rapid or extensive expansion, CTLs specific for dominant epitopes might simply outnumber other CTLs at the APC surface (15, 18). Clearly, the rate of expansion of CTL populations in our experiments was not consistent with the prediction that B6<sup>dom1</sup>-specific CTLs are endowed with a higher proliferative potential than their competitors. A second hypothesis was that by sticking to APCs, CTLs that recognize the dominant epitope could physically deny access by other CTLs to the APC surface or to APC molecules recruited at the site of the immunological synapse (24). However, it is hard to reconcile this premise with evidence that antigen-specific naïve T cells are rare, enter lymphoid organs asynchronously, and maintain vigorous migration upon cognate interactions with APCs (44). Since each T cell-APC encounter is short-lived, with a median duration between 6 to 12 min, it is difficult to imagine how CTLs specific for a given epitope could monopolize access to the surface of antigen-bearing APCs during a period of several days if the latter APCs remain functional.

We surmise that to abort the priming of competitor CTLs, B6<sup>dom1</sup>-specific CTLs must rapidly curtail the number or the function of antigen-bearing APCs. In doing this, because of their superior effector activity, they reduce the time of interaction between competent APCs and CTLs below the duration threshold required to prime CTLs that recognize non-dominant epitopes. First, this could be achieved by killing antigen-bearing APCs. Supporting reports demonstrate that some (19, 45), but not all (24), CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells rapidly eliminate antigen-bearing APCs *in vivo*. One report (24) made use of exogenous peptide-coated APCs where interactions with CTLs apparently had no influence on the fate of APCs. This approach may lead to an overestimation of APC survival since the half-life of peptide-MHC class I complexes at 37°C is usually a matter of a few hours (12, 15). Notably, we showed that CTLs specific for B6<sup>dom1</sup> rapidly eliminate APCs *in vivo* whereas CTLs specific for HY do not (19). Our demonstration that B6<sup>dom1</sup>-specific CTLs are endowed with superior effector activity (Fig. 4) provides a cogent explanation for this discrepancy. Nevertheless, here we furnish conclusive

evidence that perforin-mediated killing by itself is not required to cause immunodomination (Fig. 5). However, this observation should not be construed as a demonstration that immunodomination does not involve APC killing because other effector pathways such as involving ligands of the TNF family, might contribute to the rapid demise of antigen-bearing APCs *in vivo* (19). Second, CTLs specific for a dominant epitope could, because of their high effector activity, rapidly lead to exhaustion of APCs. This assumption is consistent with evidence that within 24 h after antigen presentation, naïve CD8<sup>+</sup> T cells are able to trigger dendritic cell maturation (46), a process that can rapidly lead to dendritic cell exhaustion within a few hours (47). The paradigm that immunodomination bears on the rapid physical or functional demise of antigen-bearing APCs leads to testable predictions that we are currently addressing.

Regardless of whether it is caused by APC killing or APC exhaustion, the main consequence of immunodomination is to restrict the diversity of the repertoire of CTL responses. Deng *et al.* raised the interesting possibility that the *raison d'être* of this limitation may be to lessen the risk of collateral autoimmune damage by crossreactive CTLs (13). Collectively, our data suggest that immunodomination entails selective expansion of CTLs with the best effector function, favoring quality over quantity, which is clearly wise strategy.

## REFERENCES

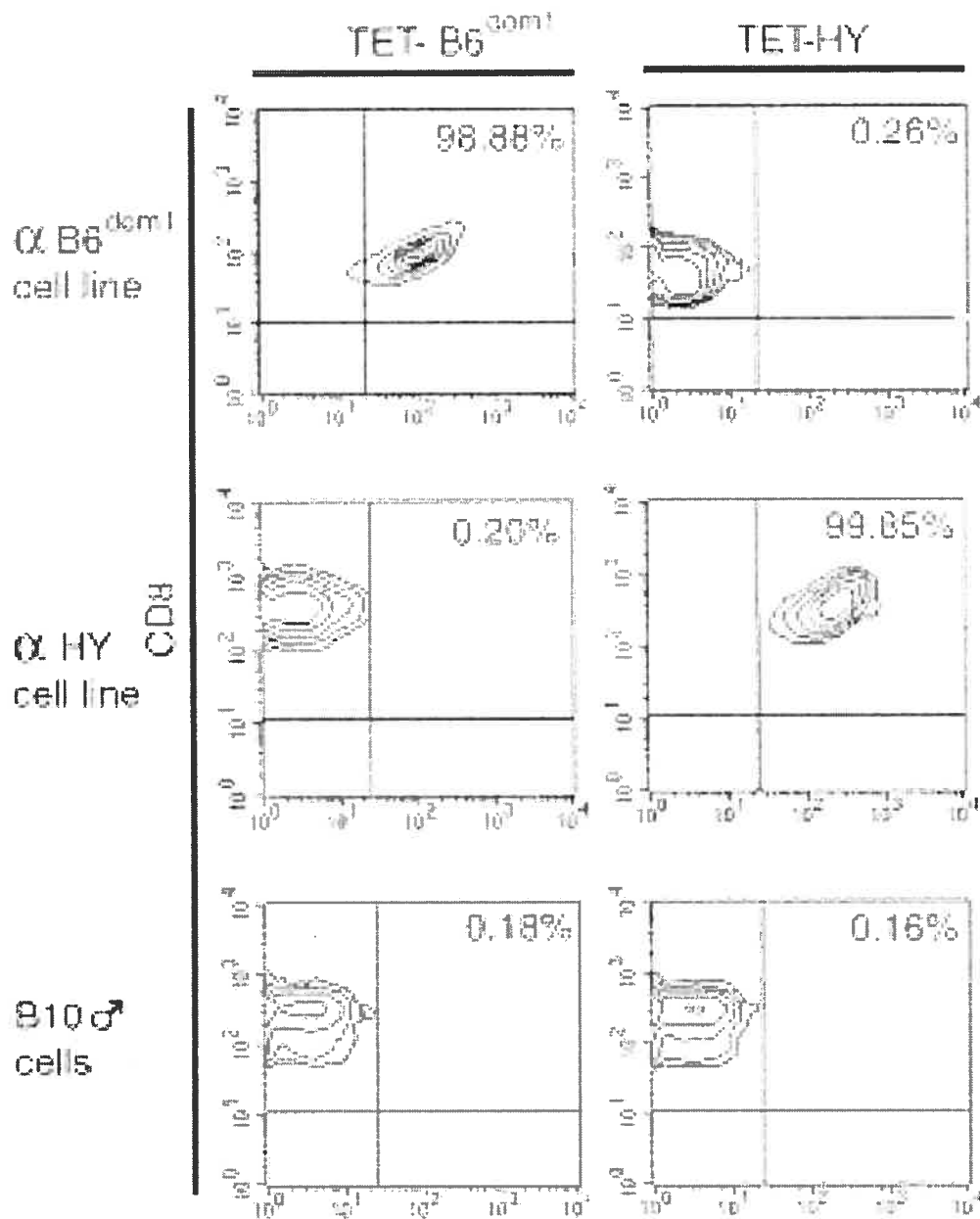
1. Zinkernagel, R.M. 1996. Immunology taught by viruses. *Science* 271:173-178.
2. Brodsky, F.M., L.Lem, A.Solache, and E.M.Bennett. 1999. Human pathogen subversion of antigen presentation. *Immunol.Rev.* 168:199-215.
3. Harty, J.T., A.R.Tvinnereim, and D.W.White. 2000. CD8<sup>+</sup> T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu.Rev.Immunol.* 18:275-308.
4. Weidt, G., O.Utermöhlen, J.Heukeshoven, F.Lehmann-Grube, and W.Deppert. 1998. Relationship among immunodominance of single CD8<sup>+</sup> T cell epitopes, virus load, and kinetics of primary antiviral CTL response. *J.Immunol.* 160:2923-2931.
5. Yewdell, J.W. and J.R.Bennink. 1999. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu.Rev.Immunol.* 17:51-88.
6. Wallace, M.E., R.Keating, W.R.Heath, and F.R.Carbone. 1999. The cytotoxic T-cell response to herpes simplex virus type 1 infection of C57BL/6 mice is almost entirely directed against a single immunodominant determinant. *J.Virol.* 73:7619-7626.
7. Borrow, P., H.Lewicki, X.Wei, M.S.Horwitz, N.Peffer, H.Meyers, J.A.Nelson, J.E.Gairin, B.H.Hahn, M.B.Oldstone, and G.M.Shaw. 1997. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat.Med.* 3:205-211.
8. Goulder, P.J., R.E.Phillips, R.A.Colbert, S.McAdam, G.Ogg, M.A.Nowak, P.Giangrande, G.Luzzi, B.Morgan, A.Edwards, A.J.McMichael, and S.Rowland-Jones. 1997. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat.Med.* 3:212-217.
9. Klenerman, P. and R.M.Zinkernagel. 1998. Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes. *Nature* 394:482-485.
10. Wang, H. and D.D.Eckels. 1999. Mutations in immunodominant T cell epitopes derived from the nonstructural 3 protein of hepatitis C virus have the potential for generating escape variants that may have important consequences for T cell recognition. *J.Immunol.* 162:4177-4183.
11. Price, G.E., R.Ou, H.Jiang, L.Huang, and D.Moskophidis. 2000. Viral escape by selection of cytotoxic T cell resistant variants in influenza A virus pneumonia. *J.Exp.Med.* 191:1853-1867.
12. Pion, S., P.Fontaine, M.Desaulniers, J.Jutras, J.G.Filep, and C.Perreault. 1997. On the mechanisms of immunodominance in cytotoxic T lymphocyte responses to minor histocompatibility antigens. *Eur.J.Immunol.* 27:421-430.
13. Deng, Y., J.W.Yewdell, L.C.Eisenlohr, and J.R.Bennink. 1997. MHC affinity, peptide liberation, T cell repertoire, and immunodominance all contribute to the paucity of MHC class I-restricted peptides recognized by antiviral CTL. *J.Immunol.* 158:1507-1515.
14. Perreault, C., D.C.Roy, and C.Fortin. 1998. Immunodominant minor histocompatibility antigens: the major ones. *Immunol.Today* 19:69-74.
15. Pion, S., G.J.Christianson, P.Fontaine, D.C.Roopenian, and C.Perreault. 1999. Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocyte responses: explanation for the immunodominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens. *Blood* 93:952-962.

16. Chen, W., L.C. Anton, J.R. Bennink, and J.W. Yewdell. 2000. Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity* 12:83-93.
17. Wolpert, E.Z., P. Grufman, J.K. Sandberg, A. Tegnesjö, and K. Kärre. 1998. Immunodominance in the CTL response against minor histocompatibility antigens: interference between responding T cells, rather than with presentation of epitopes. *J. Immunol.* 161:4499-4505.
18. Perreault, C., S. Pion, and D.C. Roy. 2000. Mechanisms and implications of immunodominance. *In Minor Histocompatibility Antigens: From the Laboratory to the Clinic.* D. Roopenian and E. Simpson, editors. Landes Bioscience, Georgetown. 71-78.
19. Loyer, V., P. Fontaine, S. Pion, F. Héту, D.C. Roy, and C. Perreault. 1999. The *in vivo* fate of APCs displaying minor H antigens and/or MHC differences is regulated by CTLs specific for immunodominant class I-associated epitopes. *J. Immunol.* 163:6462-6467.
20. Wettstein, P.J. 1986. Immunodominance in the T cell response to multiple non-H-2 histocompatibility antigens. III. Single histocompatibility antigens dominate the male antigen. *J. Immunol.* 137:2073-2079.
21. Perreault, C., J. Jutras, D.C. Roy, J.G. Filep, and S. Brochu. 1996. Identification of an immunodominant mouse minor histocompatibility antigen (MiHA). T cell response to a single dominant MiHA causes graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* 98:622-628.
22. Greenfield, A., D. Scott, D. Pennisi, I. Ehrmann, P. Ellis, L. Cooper, E. Simpson, and P. Koopman. 1996. An H-YD<sup>b</sup> epitope is encoded by a novel mouse Y chromosome gene. *Nat. Genet.* 14:474-478.
23. Eden, P.A., G.J. Christianson, P. Fontaine, P.J. Wettstein, C. Perreault, and D.C. Roopenian. 1999. Biochemical and immunogenetic analysis of an immunodominant peptide (B6<sup>dom1</sup>) encoded by the classical H7 minor histocompatibility locus. *J. Immunol.* 162:4502-4510.
24. Kedl, R.M., W.A. Rees, D.A. Hildeman, B. Schaefer, T. Mitchell, J. Kappler, and P. Marrack. 2000. T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* 192:1105-1114.
25. Altman, J.D., P.H. Moss, P.R. Goulder, D.H. Barouch, M.G. McHeyzer-Williams, J.I. Bell, A.J. McMichael, and M.M. Davis. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274:94-96.
26. Gallimore, A., A. Glithero, A. Godkin, A.C. Tissot, P.I. T. Elliott, H. Hengartner, and R. Zinkernagel. 1998. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J. Exp. Med.* 187:1383-1393.
27. Crawford, F., H. Kozono, J. White, P. Marrack, and J. Kappler. 1998. Detection of antigen-specific T cells with multivalent soluble class II MHC covalent peptide complexes. *Immunity* 8:675-682.
28. Slifka, M.K., F. Rodriguez, and J.L. Whitton. 1999. Rapid on/off cycling of cytokine production by virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Nature* 401:76-79.
29. Appay, V., D.F. Nixon, S.M. Donahoe, G.M. Gillespie, T. Dong, A. King, G.S. Ogg, H.M. Spiegel, C. Conlon, C.A. Spina, D.V. Havlir, D.D. Richman, A. Waters, P. Easterbrook, A.J. McMichael, and S.L. Rowland-Jones. 2000. HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J. Exp. Med.* 192:63-76.

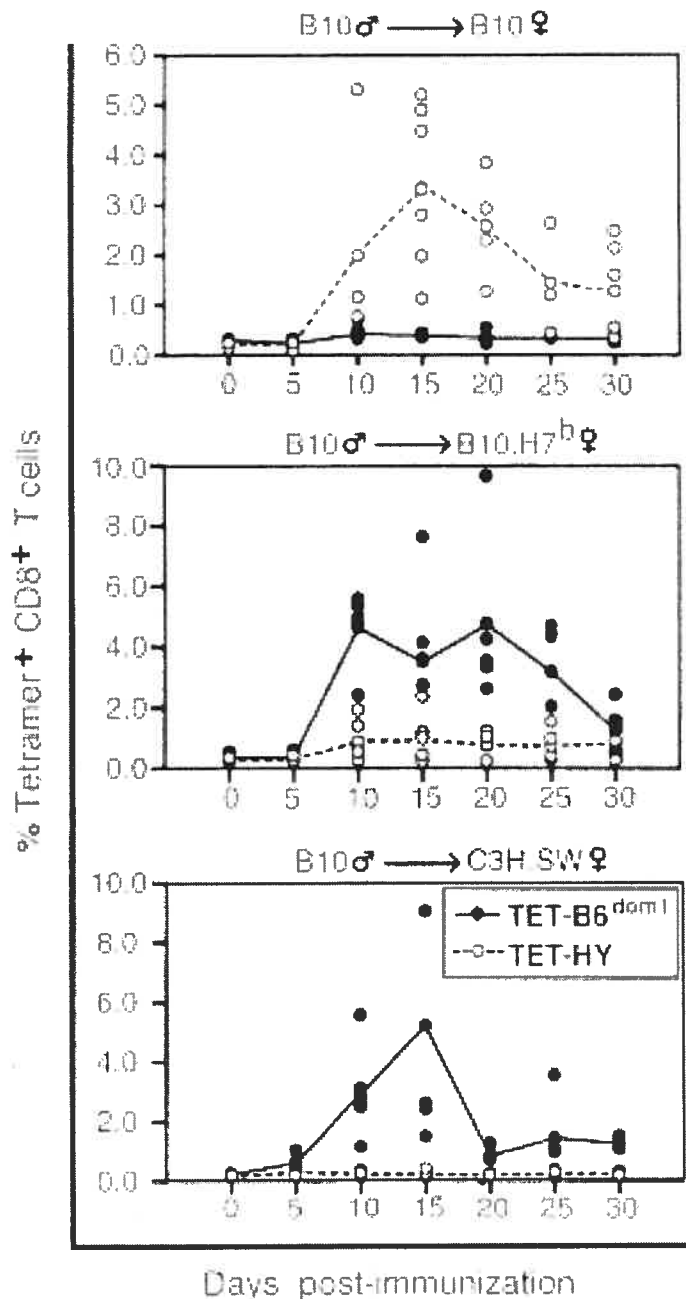
30. Bachmann,M.F., E.Sebzda, T.M.Kundig, A.Shahinian, D.E.Speiser, T.W.Mak, and P.S.Ohashi. 1996. T cell responses are governed by avidity and co-stimulatory thresholds. *Eur.J.Immunol.* 26:2017-2022.
31. Bachmann,M.F., A.Oxenius, D.E.Speiser, S.Mariathasan, H.Hengartner, R.M.Zinkernagel, and P.S.Ohashi. 1997. Peptide-induced T cell receptor down-regulation on naive T cells predicts agonist/partial agonist properties and strictly correlates with T cell activation. *Eur.J.Immunol.* 27:2195-2203.
32. Zajac,A.J., J.N.Blattman, K.Murali-Krishna, D.D.Sourdive, M.Suresh, J.D.Altman, and R.Ahmed. 1998. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J.Exp.Med.* 188:2205-2213.
33. Spencer,J.V. and T.J.Braciale. 2000. Incomplete CD8<sup>+</sup> T lymphocyte differentiation as a mechanism for subdominant cytotoxic T lymphocyte responses to a viral antigen. *J.Exp.Med.* 191:1687-1698.
34. Laouar,Y. and I.N.Crispe. 2000. Functional flexibility in T cells: independent regulation of CD4<sup>+</sup> T cell proliferation and effector function in vivo. *Immunity* 13:291-301.
35. Griem,P., H.J.Wallny, K.Falk, O.Rotzschke, B.Arnold, G.Schonrich, G.Hammerling, and H.G.Rammensee. 1991. Uneven tissue distribution of minor histocompatibility proteins versus peptides is caused by MHC expression. *Cell* 65:633-640.
36. Lenz,L.L., E.A.Butz, and M.J.Bevan. 2000. Requirements for bone marrow-derived antigen-presenting cells in priming cytotoxic T cell responses to intracellular pathogens. *J.Exp.Med.* 192:1135-1142.
37. Sigal,L.J. and K.L.Rock. 2000. Bone marrow-derived antigen-presenting cells are required for the generation of cytotoxic T lymphocyte responses to viruses and use transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent and -independent pathways of antigen presentation. *J.Exp.Med.* 192:1143-1150.
38. Tomlinson Jones,A., B.Federspiel, L.G.Ellies, M.J.Williams, R.Burgener, V.Duronio, C.A.Smith, F.Takei, and H.J.Ziltener. 1994. Characterization of the activation-associated isoform of CD43 on murine T lymphocytes. *J.Immunol.* 153:3426-3439.
39. Carlow,D.A., B.Ardman, and H.J.Ziltener. 1999. A novel CD8 T cell-restricted CD45RB epitope shared by CD43 is differentially affected by glycosylation. *J.Immunol.* 163:1441-1448.
40. Harrington,L.E., M.Galvan, L.G.Baum, J.D.Altman, and R.Ahmed. 2000. Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans. *J.Exp.Med.* 191:1241-1246.
41. Spaner,D., K.Raju, B.Rabinovich, and R.G.Miller. 1999. A role for perforin in activation-induced T cell death in vivo: increased expansion of allogeneic perforin-deficient T cells in SCID mice. *J.Immunol.* 162:1192-1199.
42. Badovinac,V.P., A.R.Tvinnereim, and J.T.Harty. 2000. Regulation of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell homeostasis by perforin and interferon- $\gamma$ . *Science* 290:1354-1357.
43. Gea-Banacloche,J.C., S.A.Migueles, L.Martino, W.L.Shupert, A.C.McNeil, M.S.Sabbaghian, L.Ehler, C.Prussin, R.Stevens, L.Lambert, J.Altman, C.W.Hallahan, J.C.L.B.de Quiros, and M.Connors. 2000. Maintenance of large numbers of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells in HIV-infected progressors and long-term nonprogressors. *J.Immunol.* 165:1082-1092.



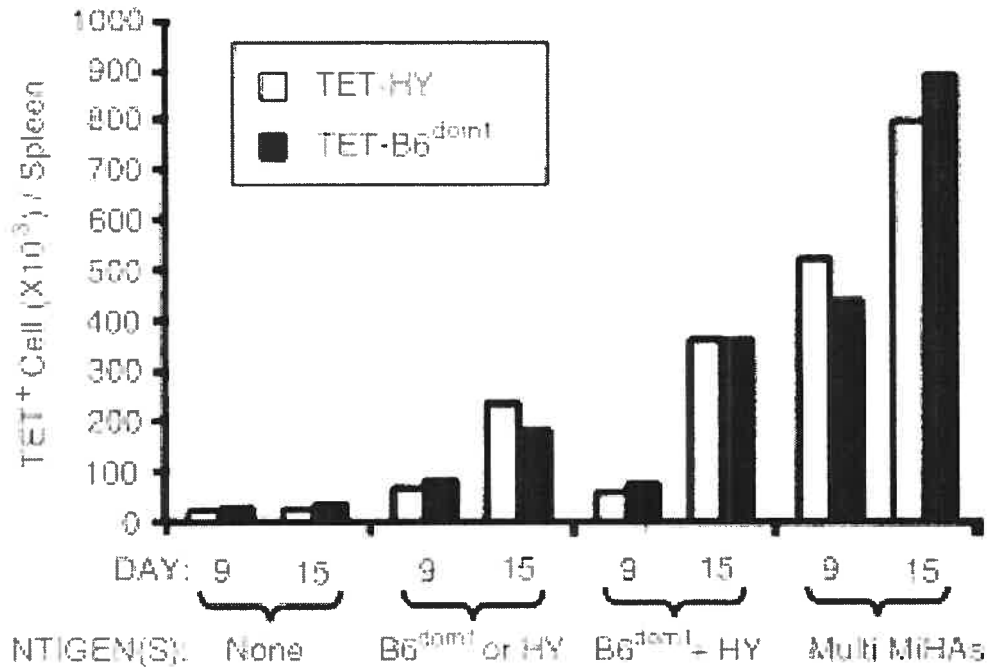
44. Gunzer,M., A.Schäfer, S.Borgmann, S.Grabbe, K.S.Zänker, E.B.Bröcker, E.Kämpgen, and P.Friedl. 2000. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* 13:323-332.
45. Ingulli,E., A.Mondino, A.Khoruts, and M.K.Jenkins. 1997. In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4<sup>+</sup> T cells. *J.Exp.Med.* 185:2133-2141.
46. Ruedl,C., M.Kopf, and M.F.Bachmann. 1999. CD8<sup>+</sup> T cells mediate CD40-independent maturation of dendritic cells in vivo. *J.Exp.Med.* 189:1875-1884.
47. Langenkamp,A., M.Messi, A.Lanzavecchia, and F.Sallusto. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 and nonpolarized T cells. *Nature Immunol.* 1:311-316.
48. Bailey,D.W. 1970. Four approaches to estimating number of histocompatibility loci. *Transplant.Proc.* 2:32-38.
49. Loveland,B. and E.Simpson. 1986. The non-MHC transplantation antigens: neither weak nor minor. *Immunol.Today* 7:223-229.



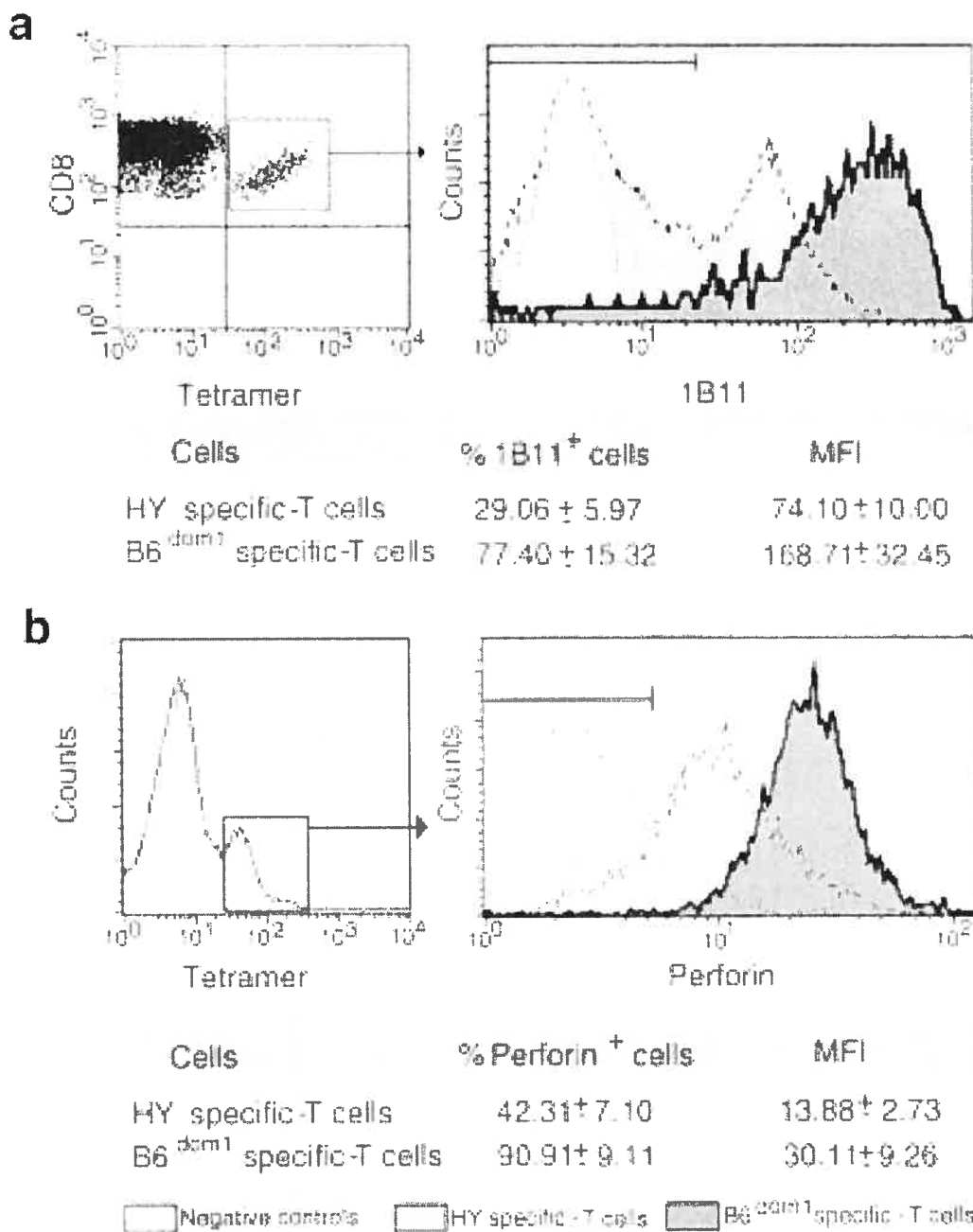
**Figure 1.** Staining of splenocytes and antigen-specific cell lines with B6<sup>dom1</sup>/D<sup>b</sup> and HY/D<sup>b</sup> tetramers. Labeling with anti-CD8 antibody and tetramers was performed on B6<sup>dom1</sup>- and HY-specific CD8<sup>+</sup> cell lines. Splenocytes from B10 male mice, which express B6<sup>dom1</sup> and HY MiHAs, served as additional negative controls. Dot plot represent gating on CD8<sup>+</sup> cells.



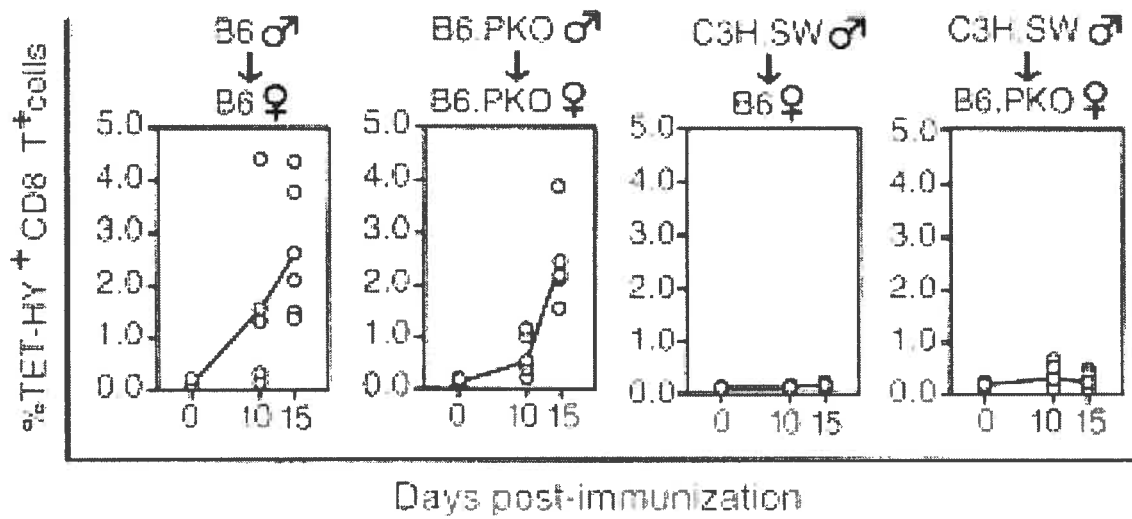
**Figure 2.** Recognition of B6<sup>dom1</sup> prevents expansion of HY-specific CD8<sup>+</sup> T cells. Percentage of B6<sup>dom1</sup>- and HY-tetramer<sup>+</sup> cells were assessed in three combinations of priming cells/recipient mice (incompatible MiHAs): i) B10.H7<sup>b</sup> male cells injected in B10.H7<sup>b</sup> female mice (HY); ii) B10 male cells in B10.H7<sup>b</sup> female mice (HY + B6<sup>dom1</sup>); and iii) B10 male cells in C3H.SW female mice (HY + B6<sup>dom1</sup> + numerous other MiHAs). The number of MiHA differences between C3H.SW and B10 mice is estimated to be over 40.<sup>102</sup> Each dot represents one individual. Lines indicate the mean percentage of B6<sup>dom1</sup>- and HY-tetramer<sup>+</sup> cells at various times with 3 to 7 mice per group.



**Figure 3.** Expansion of B6<sup>dom1</sup>- and HY-specific CD8<sup>+</sup> T cells after adoptive transfer to irradiated recipients. Spleen cell suspensions containing  $5 \times 10^6$  CD8<sup>+</sup> T cells were injected via the tail vein in irradiated (10 Gy) recipients. Donors and recipients were either syngeneic or different for i) HY; ii) B6<sup>dom1</sup>; iii) HY and B6<sup>dom1</sup>; or iv) HY<sup>+</sup> B6<sup>dom1</sup><sup>+</sup> numerous other MiHAs. Absolute numbers of CD8<sup>+</sup> tetramer<sup>+</sup> cells were estimated on days 9 and 15 after transfer. Bars represent the mean values for two mice per time.



**Figure 4.** Expression of cell surface O-glycan epitopes and intracellular perforin content. Panel A) Staining with 1B11 antibody was assessed on spleen tetramer<sup>+</sup> cells 15 days after priming against HY (B10 female mice injected with B10 male cells), or B6<sup>dom1</sup> (B10.H7<sup>b</sup> male mice injected with B10 male cells). Panel B) Intracellular perforin staining. Splenocytes from mice primed against HY or B6<sup>dom1</sup> (as in panel A) were incubated for 5 h with irradiated B10 male spleen cells expressing HY and B6<sup>dom1</sup> antigens in culture medium supplemented with brefeldin A, then permeabilized with saponin, and stained with anti-perforin antibody. For both panels A and B, flow cytometry data from one representative experiment are shown and the mean results ± SD of three experiments are presented. Splenocytes from unprimed mice served as negative controls.



**Figure 5.** Immunodomination prevails in perforin-deficient mice. Expansion of HY-tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells when HY was i) presented alone to wild-type mice (B6 male cells into B6 female mice), or ii) presented with numerous other MiHAs to either perforin-deficient or wild-type female mice (C3H.SW male cells into B6.PKO or B6 female mice, respectively). Each dot represents one individual. Lines indicate the mean percentage of HY-tetramer<sup>+</sup> cells at various times with 3 to 6 mice per group.

## **PRÉFACE AU SECOND ARTICLE**

---

L'ensemble et la totalité des expérimentations présentées dans les prochains travaux ont été réalisés exclusivement par l'auteur de cette présente thèse.

De nombreuses autres pistes ont été envisagées et explorées au cours de cette seconde partie des travaux, mais leur absence dans les prochaines pages est essentiellement due à l'impossibilité d'interpréter adéquatement les résultats obtenus. Résultats jugés non publiables pour diverses raisons. Toutefois, par demande du présent jury, certaines de ces expérimentations, notamment les travaux destinés à déterminer l'implication de la reconnaissance au soi dans le processus d'immunodomination ont été ajoutés dans une section dédiées aux Travaux non-publiés.

## **SECOND ARTICLE**

---

# **“ CD8 T-Cell Ability to Exert Immunodomination Correlates with T-Cell Receptor : Epitope Association Rate ”**

**Biology of Blood and Marrow Transplantation 11:260-271 (2005)**

**Guillaume Roy-Proulx, Chantal Baron et Claude Perreault**



**ABSTRACT**

When presented alone, H7<sup>a</sup> and HY Ags elicit CTL responses of similar amplitude, but H7<sup>a</sup> totally abrogates response to HY when both Ags are presented on the same APC. Immunodomination of H7<sup>a</sup> over HY results from CD8 T cell competition for APC resources. To decipher the mechanisms of immunodomination using these two model epitopes, we studied the following parameters: frequency of antigen specific T cells in the pre-immune repertoire, TCR diversity of Ag reactive T cells, and T cell interactions with self as well as with their cognate Ag. H7<sup>a</sup>- and HY-specific T cell precursors had similar frequencies in non immune mice and expressed similar levels of CD5. The H7<sup>a</sup>-specific CD8 T cell repertoire harvested at the time of primary response showed highly restricted TCR diversity. T cells specific for H7<sup>a</sup> and HY expressed equivalent levels of CD8 and TCR, and displayed similar tetramer decay rates. The key difference was that anti-H7<sup>a</sup> T cells exhibited a much more rapid TCR:pepMHC on-rate than anti-HY T cells. Coupled to evidence that primed CD8 T cells limit the duration of Ag presentation by killing or inactivating APCs, our data support a novel and simple model for immunodomination: the main feature of T cells that exert immunodomination is that, compared to other T cells, they are functionally primed after shorter duration of Ag presentation.

## Introduction

It is relatively easy to elicit CD8 T cell response against an MHC I-associated peptide presented alone on professional APCs, provided Ag reactive T cells are present in the T cell repertoire. However, under most circumstances such as with infection and transplantation, immune responses are triggered by APCs that present a multitude of non self epitopes. In this case, CD8 T cells respond to only a few immunodominant epitopes and neglect other potentially immunogenic peptides. Restriction of CD8 T cell responses to a few selected epitopes has been termed immunodominance, a central and robust feature of immune responses (1-8). At face value, restricting CTL responses to immunodominant epitopes can be viewed as a low risk/high efficiency strategy for the immune system: limiting the diversity of the immune response minimizes the potential for autoimmune recognition, while focusing on the best epitopes confers good chances to rapidly eliminate pathogens (9,10).

The immunodominance hierarchy is largely dictated by the immunodomination process whereby dominant epitopes abrogate response to non dominant epitopes (11). Immunodomination results from cross-competition between T cells specific for different epitopes (12). Studies based on adoptive transfer of graded numbers of CD8 T cells specific for various influenza peptides showed that the capacity to exert (and to resist) immunodomination varies considerably with the specificity of CD8 T cells and is a cause rather than an effect of the immunodominance hierarchy (11). In most models, immunodomination results from competition for APC resources among responding CD8 T cells, since it disappears when competing epitopes are presented on different APCs or when APCs are present in large excess (3,13-17). Accordingly, immunodomination is mitigated under conditions where Ag presentation is not limiting, such as lymphocytic choriomeningitis virus infection (12,18).

The mechanisms of competition for APC resources that lead to immunodomination remain ill defined. Many models suggest that the crux of immunodomination is APC killing (19,20). However, at least under certain conditions,

immunodomination can be driven by other means than APC destruction (12). One attractive possibility would be that early interactions with CTL specific for immunodominant epitopes lead to functional exhaustion or inactivation of APC. Indeed, following activation, dendritic cells produce IL-12 only transiently and rapidly become functionally exhausted (21). Interestingly, it has been shown that secretion of IFN- $\gamma$  which is rapidly produced at the CTL/APC interface is instrumental in suppressing response to non dominant epitopes (17,22). Whether IFN- $\gamma$  entails APC demise or inactivation remains to be determined. Thus, though our mechanistic understanding remains incomplete, the dominant paradigm holds that CTLs exert immunodomination by physically or functionally impairing the ability of APC to present Ag, thereby preventing priming against non dominant epitopes (3,19,20). Restricting the duration of Ag presentation through APC physical or functional deletion provides an efficient feedback mechanism with pervasive consequences on the size, diversity and duration of CD8 T cell responses (20). Of note, the ability to exert and to resist immunodomination are directly related (11,13,23). Thus, while cell surface expression of the H7<sup>a</sup> Ag prevents priming against more than 90% of MiHAs present on C57BL/6 cells, H7<sup>a</sup>-specific CTLs consistently resist immunodomination by CTLs specific for a myriad of other MiHAs (13,16,23). In contrast, the HY MiHA elicits CTL response only when presented alone. Though expression of other Ags does not modify expression of HY at the APC surface, it totally abrogates HY-specific CTL response (16,24). Two fundamental and related inferences can be drawn from these data. First, compared with other CTLs, those that exert immunodomination lead to more rapid APC deletion or inactivation. Second, that immunodominating CTLs display intrinsic resistance to immunodomination means that the duration of Ag presentation required for their priming is shorter than for CTLs specific for non dominant epitopes.

To elucidate the mechanisms of immunodomination, we performed a comprehensive set of studies on CD8 T cells specific for two model Ags presented by H2D<sup>b</sup>: H7<sup>a</sup> (also known as B6<sup>dom1</sup>) and HY. We thought that selecting these Ags would maximize the sensitivity of our studies because, as mentioned above, H7<sup>a</sup> and HY lie at opposite ends of the immunodomination scale (that is, in their ability to exert and resist

immunodomination). Thus, when presented alone, these Ags elicit CTL responses of similar amplitude, but H7<sup>a</sup> totally abrogates response to HY when both Ags are presented on the same APC (13,16). This cannot be explained by differences in epitope stability because the half-lives of H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup> and H-Y/D<sup>b</sup> complexes are similar (8 h) (23). We focused herein on the following parameters: T cell frequency in the pre-immune repertoire, TCR diversity of Ag reactive T cells, and T cell interactions with self as well as with their cognate Ag. We report that the salient difference between CTLs specific for H7<sup>a</sup> and HY is that the former display much more rapid tetramer binding than the latter. Our data allow for the development of a model in which the result of cross-competition between CTLs specific for different epitopes depends on the TCR:epitope on-rate of competitors. This paradigm makes distinct and testable predictions and integrates numerous reports concerning immunodomination.

## Materials and Methods

### *Mice*

C57BL/10Snj (B10), B10.C-*H7<sup>b</sup>*(47N)/SN (B10.H7<sup>b</sup>) and BALB/c mice were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Mice were bred in the Guy-Bernier Research Center and maintained in specific pathogen-free conditions according to the standard of the Canadian Council on Animal Care.

### *Peptides*

H7<sup>a</sup> (KAPDNRETL) and H-Y<sub>(Uty)</sub> (WMHHNMDLI) peptides were synthesized by the Sheldon Biotechnology Center (Montreal, QC, Canada). Purity, as determined by reverse phase-high performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis were above 97%.

### *Antibodies, MHC class I tetramers and flow cytometry*

Cell suspensions were stained with the following Abs from BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA) : anti-CD8 (53-6.7), anti-TCR $\alpha\beta$  (H57-597), anti-V $\alpha$ 2 (B20.1), anti-V $\alpha$ 3.2 (RR3-16), anti-V $\alpha$ 8.3 (B21.14), anti-V $\alpha$ 11./11.2<sup>b,d</sup> (RR8-1), anti-V $\beta$ 2 (B20.6), anti-V $\beta$ 3 (KJ25), anti-V $\beta$ 4 (KT4), anti-V $\beta$ 5.1/5.2 (MR9-4), anti-V $\beta$ 6 (RR4-7), anti-V $\beta$ 7 (TCR310), anti-V $\beta$ 8.1/8.2 (MR5-2), anti-V $\beta$ 9 (MR10-2), anti-V $\beta$ 10<sup>b</sup> (B21.5), anti-V $\beta$ 11 (RR3-15), anti-V $\beta$ 12 (MR11-1), anti-V $\beta$ 13 (MR12-3), anti-V $\beta$ 14 (14-2), anti-V $\beta$ 17<sup>a</sup> (KJ23), anti-H2D<sup>b</sup> (28-14-8) and anti-CD5 (53-7.3). H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup> and H7<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> tetramers were obtained from the Canadian Network for Vaccines and Immunotherapies (CANVAC) Tetramer Core Facility (Montreal, QC, Canada). H-Y<sub>(Uty)</sub>/D<sup>b</sup> and LCMV gp33-41/D<sup>b</sup> tetramers were obtained from Beckman Coulter Immunomics (San Diego, CA). All acquisitions were made on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences, Mountain View, CA).

### *Tetramer binding assays*

Tetramer association assays (TCR-pepMHC "on-rate") were performed as described (25,26). On d 14 post priming, spleen cells were stained by anti-CD8 Ab and graded

concentrations of tetramer ranging from 3.5 to 270 nM. After incubation, cells were washed extensively, fixed in 1% paraformaldehyde, stained on ice for 45 min and analyzed by flow cytometry. Tetramer decay assays (TCR-pepMHC “off-rate”) were performed as described (26,27). Briefly, *in vivo* primed spleen cells were stained with saturating concentrations of anti-CD8 Ab and H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup> or H-Y(Uty)/D<sup>b</sup> tetramers for 45 min. Cells were washed, cultured for various periods of time at 25°C in the presence of saturating amounts of purified anti-D<sup>b</sup> Ab, fixed in 1% paraformaldehyde and analyzed by flow cytometry. The tetramer-specific total fluorescence was determined according to Savage *et al.* (27), normalized to percent of the total fluorescence at the initial time point and plotted on a logarithmic scale.

#### *Single cell RT-PCR and TCR sequencing*

Single immune [CD8<sup>+</sup>Vβ8<sup>+</sup>Vα8<sup>+</sup>H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup><sup>+</sup>] T cells were sorted directly in a 96-well PCR plate containing 20 μl of cDNA reaction mix using a FACSVantage SE with Diva Option (BD Biosciences, San Jose, CA). The cDNA reaction mix contained 1X cDNA buffer, 1.0 μl of Sensiscript Reverse Transcriptase, 0.5 mM each dNTP, 1 μM oligo-dT primers, and 10 U RNase inhibitor (Qiagen Inc., Mississauga, Ontario, Canada). After sorting, plates were frozen, thawed and incubated at 37°C for 60 min to perform the RT reaction, followed by 5 min at 93°C to stop the reverse transcriptase activity. The Vβ8 or Vα8 transcripts were amplified from 2.5 μl of cDNA by nested PCR in a 25 μl amplification reaction with *Taq* polymerase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), using oligonucleotides designed by Baker *et al.* (28). The first-round reaction was performed with the external primers : Vβ8-ext (TGGGAACAAAACACATGGAGGC) / Cβ-ext (CTATAATTGCTCTCTTGTAGG) and Vα8-ext (CTGTGATGCTGAACTGCACC) / Cα3'-ext (TCAACTGG ACCACAGCCTCAG). The second round was performed with 2.5 μl aliquot from the first round with internal primers: Vβ8-int (ATGTACTGGTATCGGCAGGAC) / Cβ100-int (AAGCCCCTGGCCAAGCACAC) and Vα8-int (GCCACTCTCCATAAGAGCAG) / CαR-int (TAGGTGGCGGTGGTCTCTTTG). For each round, PCR conditions were 94°C for 3 min followed by 30 cycles of 94°C/30 s, 56°C/30 s, 72°C/1 min, followed by a final

extension cycle of 72°C for 10 min. PCR products were resolved on a 2% agarose gel, purified on QIAquick Gel extraction spin columns (Qiagen) and sequenced at the Analysis and Synthesis Facility of Laval University (Quebec, QC, Canada).

*Limiting dilution (LD) assays of CTL precursors*

Limiting numbers of responder spleen cells from unprimed animals were cultured in 96-well round bottomed plates with constant numbers ( $2.5 \times 10^5$ ) of irradiated stimulator spleen cells pulsed with 20  $\mu\text{M}$  of H7<sup>a</sup> or H-Y<sub>(Uty)</sub> peptide for 40 min at 37°C. Cell cultures were made in Iscove's medium with FBS (10%), L-arginine (116 mg/L), L-asparagine (36 mg/L), L-glutamine (216 mg/L), IL-2 (20 U/ml), IL-4 (10 ng/ml) and IL-7 (10 ng/ml). On d 7 and 14, 50% of the medium was replaced by fresh medium containing IL-2, IL-4, IL-7 and 20  $\mu\text{M}$  of the respective peptide. Tetramer labeling was performed on d 21 and detection of tetramer-positive cells was performed as described (29). Briefly, cells were washed and incubated at room temperature for 30 min with specific and irrelevant (LCMV gp33-41/D<sup>b</sup>) tetramers. The analysis procedure is depicted in Figure 1A and is aimed at gating out those among CD8 T cells that emit a higher than background fluorescence at 670nm when excited at 488 nm (autofluorescence) or those that bind an irrelevant tetramer. As a result of the limiting dilution, the tetramer-labeled clusters in the positive microcultures (less than 10% of the wells) each represent a single clone. Wells were scored positive when the percentage of cells specifically labelled by tetramers containing the peptide used for stimulation was more than 3 SD over mean results for negative controls (i.e., male cells stimulated by HY and B10 cells stimulated by H7<sup>a</sup>).

In some experiments, analyses of precursor frequencies were performed on subsets of CD8 T cells. In this case, unprimed spleen cells were depleted with anti-pan B (B220) and anti-CD4 (L3T4) beads (Dynal Biotech, Brown Deer, WI) and stained with Abs against CD8 and CD5. The low, intermediate and high CD5 subsets of CD8 T cells were sorted, and  $5 \times 10^4$  CD8 T cells were cultured in 96-well round bottomed plates with  $2.5 \times 10^5$  stimulator spleen cells (pulsed with 20  $\mu\text{M}$  of peptide) and  $1 \times 10^5$  autologous irradiated spleen cells as feeders.

## Results

### *The diversity of the repertoire of H7<sup>a</sup>-specific CD8 T cells is extremely limited*

Significant insight on the bases of immunodomination may be gained from studies on MiHAs because, with their tens of thousands of proteins, mammalian cells represent the most complex entity to which CTLs can be confronted in the antigenic universe (30). Studies based on four molecularly defined BALB.B MiHAs recognized by C57BL/6 cells provided evidence that the diversity of the CD8 T cell TCR repertoire may be correlated immunodominance. Thus, BALB.B H28 and H60 MiHAs are immunodominant and C57BL/6 responder mice carry null alleles (30-32). In contrast, H13 and H47 are not immunodominant and B6 mice share closely matched allelic analogs with BALB.B mice (33-35). It was therefore proposed that in the absence of a self analog peptide, the complete lack of negative selection should provide a more diversified peripheral repertoire (32). However, recent biochemical definition of the model immunodominant H7<sup>a</sup> MiHA (KAPDNRETL, corresponding to amino acids 770-778 of the SIMP/STT3-B protein) and its allelic product (H7<sup>b</sup>: KAPDNRDTL), appears at face value difficult to reconcile with this paradigm (36). Since the two allelic H7 MiHAs differ by a single methylene group, it is difficult to imagine how they might elicit diversified arrays of TCR clonotypes. We therefore deemed it important to directly assess the diversity of the anti-H7<sup>a</sup> TCR repertoire.

As a prelude to detailed studies of the T cell repertoire, it was essential to validate the specificity of the H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup> tetramers used to identify and isolate H7<sup>a</sup>-reactive CD8 T cells. Splenocytes from B10.H7<sup>b</sup> mice primed against B10 cells, and B10 mice primed against B10.H7<sup>b</sup> cells were stained with H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup> and H7<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> tetramers. Despite the fact that H7<sup>a</sup> and H7<sup>b</sup> differ by a single CH2 group (36), T cells bound only the allelic product against which they were primed and not the self allelic product (Figure 2). Thus, H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup> tetramers used in this work showed exquisite specificity.

B10.H7<sup>b</sup> mice were primed with  $2 \times 10^7$  B10 cells, and their splenocytes were harvested on d 14, when about 5% of CD8 T cells were H7<sup>a</sup>-specific (14). H7<sup>a</sup> tetramer<sup>+</sup>



CD8 T cells were stained with a panel of 14 anti-V $\beta$  and 4 anti-V $\alpha$  antibodies. The TCRV $\beta$  repertoire of anti-H7<sup>a</sup> T cells was dramatically skewed because, in most mice (7 out of 8), tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells used a single V $\beta$  element, in most cases V $\beta$ 8 (Figure 3). Although the panel of anti-V $\alpha$  Abs available is relatively restricted, our data strongly suggest that TCRV $\alpha$  usage is also skewed because in each mouse no more than one V $\alpha$  element was detected on tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells.

To analyze more precisely the diversity of the H7<sup>a</sup>-specific repertoire we focused on tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells bearing the TCRV $\alpha$  and TCRV $\beta$  elements most frequently detected in our flow cytometry analyses: V $\alpha$ 8 and V $\beta$ 8. The third complementarity-determining regions (CDR3) of the TCR $\alpha$  and  $\beta$  chains have a primary role in recognition of the MHC bound peptide antigen and are thus responsible for most of the specificity of TCR interactions. Single cell PCR can estimate T cell frequency accurately, as it is not affected by skewed PCR amplification or different TCR mRNA expressions in individual T cells (37). Thus, our experimental strategy involved single-cell sorting of tetramer<sup>+</sup>/V $\alpha$ 8<sup>+</sup>/V $\beta$ 8<sup>+</sup> CD8 T cells, RT-PCR amplification, and sequencing of CDR3 loops of the TCR $\alpha$  and  $\beta$  chains (28,38). These single cell analyses were performed in four mice in which more than 80% of tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells were stained by anti-V $\alpha$ 8 and -V $\beta$ 8 antibodies. CDR3 lengths were designated from the amino acid sequences, whereas J-element usage was determined after comparison with known genomic sequences (39-41). Analysis of 65 TCR $\beta$  transcripts from four mice showed that the diversity of the TCR $\beta$  chains was strikingly limited and conserved features were clearly identified (Table 1). Practically all TCR $\beta$  chains from sorted tetramer<sup>+</sup>/V $\alpha$ 8<sup>+</sup>/V $\beta$ 8<sup>+</sup> CD8 T cells used V $\beta$ 8.1 and J $\beta$ 2.1 segments. In 94% of the cases (61/65), the CDR3 $\beta$  region had a length of twelve amino acids with conserved charged residues: aspartic (D) or glutamic (E) acid at P2, arginine (R) at P3 and glutamic acid (E) at P11. The TCR $\beta$  chains showed low diversity in each individual mouse and were remarkably similar among mice. Overall, 94% of the CDR3 $\beta$  segments from the four mice harbored the following twelve amino acid consensus sequence: S(D/E)R(T/A)GGXNYAEQ. Analysis of 47 TCR $\alpha$  transcripts from the same

tetramer<sup>+</sup>/V $\alpha$ 8<sup>+</sup>/V $\beta$ 8<sup>+</sup> CD8 T cell samples confirmed the limited diversity of the H7<sup>a</sup>-specific repertoire (Table 1). Two types of dominant TCR $\alpha$  chains were found: V $\alpha$ 8.3-S(G/A)SSNTNKV-J $\alpha$ 27 in two mice, and V $\alpha$ 8.3-GTGGYKV-J $\alpha$ 10 in the other two. We therefore conclude that the H7<sup>a</sup>-specific CD8 T cell repertoire harvested at the time of primary response shows highly restricted TCR diversity.

*Anti-H7<sup>a</sup> and -HY CD8 T cell precursors have similar frequencies*

Because the role of precursor T cell frequency in immunodomination is controversial (5,11,43,44), we deemed it necessary to assess the frequency of H7<sup>a</sup>- and HY-specific CD8 T cells in naive mice. The frequency of antigen-specific CD8 T cells in naive mice is typically about 10<sup>-5</sup> to 10<sup>-6</sup>, and thus below the detection limit of standard tetramer staining methods (43,45). Indeed, the proportion of spleen CD8 T cells stained by H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup> tetramers was not higher in B10.H7<sup>b</sup> mice than in our negative controls: H7<sup>a</sup>-positive mice (B10) and H2D<sup>b</sup>-negative mice (Balb/c) (data not shown). Likewise, the proportion of CD8 T cells stained by HY/D<sup>b</sup> tetramers was similar in male and female B10.H7<sup>b</sup> mice (data not shown). Thus, the frequency of H7<sup>a</sup>- and HY-specific T cells is below 10<sup>-3</sup>. To evaluate precursor frequencies, we therefore used a very sensitive method developed by Karanikas *et al.* (29). This method involves *in vitro* culture of T cells with peptide coated stimulating cells under limiting dilution conditions in cytokine supplemented milieu. On d 21, T cells from B10.H7<sup>b</sup> female mice stimulated with HY- or H7<sup>a</sup>-coated cells were labeled with anti-CD8 Ab and the cognate tetramer. Cells that were autofluorescent or that were labeled by an irrelevant tetramer (LCMV gp33-41/D<sup>b</sup>) were gated out (Figure 1A). As a result of the limiting dilution, each positive microcultures represents a single clone. Under these conditions, the frequencies of HY- and H7<sup>a</sup>-specific CD8 T cells in nonimmunized B10.H7<sup>b</sup> female mice were about 1.4 x 10<sup>-6</sup> and 1.7 x 10<sup>-6</sup>, respectively (Figure 1B). These frequencies are consistent with those of other antigen-specific cells (43,45), and show that the immunodomination of H7<sup>a</sup> over HY cannot be ascribed to higher frequency of H7<sup>a</sup>-specific T cells in the pre-immune repertoire.

### *Lack of Correlation between Immunodominance and Levels of CD5 Expression on Preimmune T Cells*

Models proposed so far have posited *a priori* that immunodomination should be regulated by only two factors: T cell precursor frequency and TCR interactions with the cognate Ag. We hypothesized that a third factor might play a key role: CTL interactions with self pepMHC as opposed as to foreign antigens. This idea stems from the demonstration that TCR engagement by self pepMHC actively sustains the naive T cells in an optimal state of sensitivity by sustaining partial phosphorylation of TCR  $\zeta$  and TCR clustering (46,47). The strength of TCR interactions with self pepMHC complexes differs among TCR clonotypes, and can be estimated using two parameters: the level of TCR $\zeta$  chain phosphorylation (46,47) and expression of CD5 levels (48,49). There is no means to assess TCR $\zeta$  chain phosphorylation of T cells specific for nominal antigen (e.g., H7<sup>a</sup> or HY) in the preimmune repertoire of non TCR-transgenic wild type mice. Nevertheless, we reasoned that we should be able to determine whether T cells specific for a given antigen are enriched among CD5<sup>lo</sup> or CD5<sup>hi</sup> T cell subsets by estimating the frequency of antigen specific T cells in sorted populations of CD8 T cells expressing different levels of CD5. We therefore used CD5 expression on CD8 T cells as a surrogate marker for the strength TCR interactions with self pepMHC complexes.

Spleen CD8 T cells from B10.H7<sup>b</sup> mice were electronically sorted into three subsets: CD5<sup>lo</sup>, CD5<sup>int</sup> and CD5<sup>hi</sup> T cells (Figure 1C). Sorted cells were cultured with peptide-coated stimulating cells under limiting conditions, as in already described experiments on the estimation of CD8 T cell precursor frequencies. The proportion of positive cultures was 7 of 131 for H7<sup>a</sup>-specific T cells and 11 of 222 for HY-specific T cells. The salient finding is that distribution of positive wells among CD5<sup>lo</sup>, CD5<sup>int</sup> and CD5<sup>hi</sup> T cells was similar for H7<sup>a</sup> and HY (Figure 1D). In both cases, Ag-specific CD8 T cell precursors were mainly found in the CD5<sup>lo/int</sup> as opposed to the CD5<sup>hi</sup> subset (Figure 1). These data unveil no relation between immunodominance and CD5 expression, and argue against the idea that the strength of TCR interactions with self pepMHC complexes shapes the immunodomination hierarchy.

### *Kinetics of TCR:epitope interactions*

T cell structural avidity, determined by the direct binding affinities of multiple cell-bound T-cell receptor molecules for pepMHC, is most commonly measured by staining with pepMHC multimers (26,27,50-52). The results of tetramer association (on-rate) and tetramer decay (off-rate) assays closely correspond to the  $K_{on}$  and  $K_{off}$  rates, respectively, of the interaction between the soluble TCR and immobilized pepMHC complexes (25,27). Thus, we next examined the structural avidity of interactions between H7<sup>a</sup>- and HY-specific T cells and their specific ligand on d 14 after *in vivo* priming, that is, at the time of primary response. In contrast with other studies (53), our experiments were conducted on freshly harvested spleen CD8 T cells without *in vitro* restimulation because *in vitro* culture may favor preferential expansion of selected T cell clonotypes. Splenocytes from each mouse were tested individually (not pooled), and a single batch of H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup> and HY/D<sup>b</sup> tetramers was used in these experiments.

We first compared the tetramer staining decay (TCR:pepMHC off-rate) of H7<sup>a</sup>- and HY-specific CD8 T cells. Of note, anti-H7<sup>a</sup> and -HY tetramer<sup>+</sup> cells expressed equivalent levels of CD8 and TCR (Figure 4A). Noticeably, the mean tetramer decay rate was not slower for H7<sup>a</sup>- relative to HY-specific T cells (Figure 4B and C). Consistent with a previous report (27), the level of animal-to-animal variation (the standard variation of decay plots) following primary immunization was significant in each group. A key point is that the TCR:pepMHC off-rate showed no less intragroup variation for H7<sup>a</sup>- relative to HY-specific T cells (Figure 4C). This means that there was no enrichment for T cells with slower TCR dissociation rate among anti-H7<sup>a</sup> compared with anti-HY T cells.

To estimate the TCR:pepMHC on-rate, T cells harvested on d 14 after primary immunization were incubated with increasing concentrations of tetramers. H7<sup>a</sup>-specific T cells showed much higher tetramer binding rate than HY-specific T cells (Figure 4D). Thus, tetramer concentrations required to reach 50% and 75% normalized fluorescence were 3.0 nM and 7.5 nM for anti-H7<sup>a</sup> T cells vs 30.0 nM and 130.0 nM for anti-HY T cells ( $p < 0.001$ , Student's *t* test). Thus, at the time of primary response, the TCR:pepMHC off-rate is similar for anti-H7<sup>a</sup> and -HY T cells whereas the on-rate is much more rapid in the case of H7<sup>a</sup>-specific T cells.

## DISCUSSION

### *The diversity of the TCR repertoire*

The TCR repertoire selected by discrete pepMHC complexes ranges from oligoclonal to extremely diverse (43,54-57). Our work shows that the TCR repertoire emerging during primary response to the immunodominant H7<sup>a</sup> antigen is oligoclonal. Two points can be made from the very limited heterogeneity of the anti-H7<sup>a</sup> repertoire. First, the potential for immunodominance is not directly related to TCR diversity. Second, since the product of the H7<sup>b</sup> allele differs from H7<sup>a</sup> by a single methylene group, our data support the concept that the degree of homology between the cognate antigen and self pepMHC peptides has a dominant influence on the diversity of the TCR repertoire (58). The fact that anti-H7<sup>a</sup> CD8 T cells represent about 5% of the peripheral T cell population 14 d after antigen encounter (16), but derive from a small number of clones (Figure 3 and Table 1) indicates that these clones are amplified with remarkable efficiency during the primary response.

The relation between TCR diversity and the efficacy of immune responses is complex. High TCR diversity increases the likelihood that the repertoire contains T cells with optimal avidity to recognize immunodominant epitopes, and that TCR clonotypes specific for mutated or secondary epitopes are available to prevent escape by mutation (59). A greater TCR diversity is therefore considered to be beneficial to the host. Remarkably, although we show herein that H7<sup>a</sup> specific CD8 T cells display very limited TCR diversity, these T cells are extremely effective in eradicating H7<sup>a</sup>-positive neoplastic cells (60). This should not be construed as a deterrent to the putative importance of a diversified T cell repertoire in general. This apparent paradox rather suggests that in presence of T cells specific for immunodominant antigens, TCR diversity is dispensable as long as the target epitope shows a low mutation rate. Indeed, *in vitro* immunoselection studies with anti-H7<sup>a</sup> CTLs have shown that H7<sup>a</sup> loss was an exceedingly rare event (61). In line with this, the structure of SIMP/STT3-B, the source protein of H7<sup>a</sup>, is highly conserved among species, and is nearly invariant among human individuals and inbred strains of mice (36,62). A corollary to data emerging from analyses of anti-H7<sup>a</sup> CTL responses is that targeting epitopes with a low mutation frequency may confer an advantage for T cell immunotherapy.

*The frequency of Antigen-specific CD8 T cells in the pre-immune repertoire and their interactions with self*

Since immunodomination results from competition for APC resources, it sounds intuitively plausible that high Ag specific T cell precursor frequency in the pre-immune repertoire might confer a competitive advantage (44). Considering the attractiveness of this concept, differential precursor frequencies are commonly invoked as putative contributory factors to immunodomination, albeit few direct assessments of Ag specific precursor frequencies have been made in nonimmune animals. Clearly, even though H7<sup>a</sup> and HY lie at opposite ends in the immunodomination hierarchy, H7<sup>a</sup>-specific T cells are not more abundant than HY-specific T cells in naïve mice. Even though H7<sup>a</sup> is at the summit of the immunodomination hierarchy on C57BL/6 cells, we argue that the unremarkable frequency ( $10^{-5}$  to  $10^{-6}$ ) of anti-H7<sup>a</sup> T cells in the nonimmune repertoire is not idiosyncratic. Indeed, similar precursor frequencies have been observed with T cells specific for immunodominant viral epitopes from LCMV and EBV (6,45). Furthermore, two studies showed that injection of very large numbers of memory CD8 T cells specific for immunodominated Ag did not enable these T cells to compete more successfully against T cells that recognized dominant epitopes (11,32). We therefore deduce that, except perhaps in some extreme situations, CD8 T cell precursor frequency does not impinge on immunodomination.

It has been proposed that one chief role of the background TCR signals induced by self-pepMHC complexes is to enhance sensitivity to foreign antigen (46,47). We therefore tested the novel idea that interactions with self pepMHC complexes might enable some CD8 T cells to react more promptly than others to their cognate Ag and thereby exert immunodomination. Our data on CD5 levels at the surface of naïve T cells, used as a surrogate marker for the intensity of TCR tickling in the periphery, provide indirect evidence against our hypothesis.

*TCR:epitope interaction kinetics*

Data summarized in the *Introduction* lead us to infer that the crux of immunodomination is speed: compared with other CTLs, those that exert immunodomination are primed

after lesser duration of Ag presentation and swiftly generate effector mechanisms that entail prompt deletion or inactivation of APC. This paradigm is supported by direct evidence that the duration of Ag presentation required to prime naïve T cells varies as a function of T cell Ag specificity (20,63). Furthermore, the speed paradigm dovetails well with a recent report that the rapidity with which CD8 T cells initiate IFN- $\gamma$  correlates with immunodominance (22). Moreover, anti-H7<sup>a</sup> but not anti-HY CD8 T cells rapidly eliminate APC presenting their cognate Ag *in vivo* (19). In line with the speed model, we report that the salient difference between anti-H7<sup>a</sup> and –HY CD8 T cells is that the former display a much more rapid TCR:pepMHC on-rate (Figure 4) and proliferate more rapidly after antigen priming (Figure 5). Our assumption that the TCR:pepMHC on-rate decisively influences the swiftness of T cell priming is supported by elegant studies from Kalergis *et al.* (64). When they examined the effects of point mutations in the CDR3  $\beta$  chain of a K<sup>b</sup>-restricted TCR, these authors found that *in vitro* T cell activation was promoted in a mutant (G97A) that, compared to the wild-type TCR, displayed a more rapid on-rate without prolongation of the off-rate. In contrast, mutants with longer TCR:pepMHC off-rates than the wild-type TCR, were less responsive, possibly because of less effective TCR serial engagement (64).

One has to be cautious in extrapolating *in vivo* the consequences of discrepancies in *in vitro* TCR:pepMHC on-rate among T cells with different Ag specificities. *In vivo* imaging of T cell interactions with APC in the lymph nodes has shown that the cascade of events leading to T cell priming occurs very rapidly. Initial signs of T cell activation appear during the first 8 h after APC encounter, and secretion of cytokines such as IL-2 and IFN- $\gamma$  begins during the subsequent 12 h (65). Thus, given the fast pace of initial interactions between T cells and APC, a quick TCR:pepMHC on-rate could confer a decisive advantage among T cells competing for APC resources. As a corollary, immunodomination should not occur when competing CD8 T cells have similar TCR:pepMHC on-rates. This would explain that competition for APC resources does not mould the repertoire of T cell responses in some models (12,44).

Studies of T cell with other Ag specificities will be needed to evaluate the generality of our model, that is, whether differences in the TCR:pepMHC on-rate are not only sufficient but also necessary to explain immunodomination. One prediction of our

model is that an Ag such as H7<sup>a</sup> should lose its ability to exert immunodomination over HY, for example, in mice whose T cells specific for the two Ags have similar TCR:pepMHC on-rates. Testing this prediction appears demanding but might be achieved by testing the immunodomination potential of TCR-transgenic T cells having the same Ag specificity but different TCR:pepMHC on-rates.

## References

1. Berger M, Wettstein PJ, Korngold R. T cell subsets involved in lethal graft-versus-host disease directed to immunodominant minor histocompatibility antigens. *Transplantation*. 1994;57:1095-1102.
2. Yewdell, J. W. and J. R. Bennink. 1999. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu. Rev. Immunol.* 17:51.
3. Perreault, C., D. C. Roy, and C. Fortin. 1998. Immunodominant minor histocompatibility antigens: the major ones. *Immunol. Today* 19:69.
4. Choi, E. Y., G. J. Christianson, Y. Yoshimura, N. Jung, T. J. Sproule, S. Malarkannan, S. Joyce, and D. C. Roopenian. 2002. Real-time T-cell profiling identifies H60 as a major minor histocompatibility antigen in murine graft-versus-host disease. *Blood* 100:4259.
5. Kjer-Nielsen, L., C. S. Clements, A. W. Purcell, A. G. Brooks, J. C. Whisstock, S. R. Burrows, J. McCluskey, and J. Rossjohn. 2003. A structural basis for the selection of dominant ab T cell receptors in antiviral immunity. *Immunity* 18:53.
6. Schirmbeck, R., D. Stober, S. El Kholly, P. Riedl, and J. Reimann. 2002. The immunodominant, L<sup>d</sup>-restricted T cell response to hepatitis B surface antigen (HBsAg) efficiently suppresses T cell priming to multiple D<sup>d</sup>-, K<sup>d</sup>-, and K<sup>b</sup>-restricted HBsAg epitopes. *J. Immunol.* 168:6253.
7. Yewdell, J. W. and M. Del Val. 2004. Immunodominance in TCD8<sup>+</sup> responses to viruses; cell biology, cellular immunology, and mathematical models. *Immunity* 21:149.
8. Korngold R, Leighton C, Mobraaten LE, Berger MA. Interstrain graft-vs.-host disease T-cell responses to immunodominant minor histocompatibility antigens. *Biol Blood Marrow Transplant.* 1997;3:57-64.
9. Deng, Y., J. W. Yewdell, L. C. Eisenlohr, and J. R. Bennink. 1997. MHC affinity, peptide liberation, T cell repertoire, and immunodominance all contribute to the paucity of MHC class I-restricted peptides recognized by antiviral CTL. *J. Immunol.* 158:1507.
10. Hamilton, S. E., B. B. Porter, K. A. Nordyke Messingham, V. P. Badovinac, and J. T. Harty. 2004. MHC class Ia-restricted memory T cells inhibit expansion of a nonprotective MHC class Ib (H2-M3)-restricted memory response. *Nat. Immunol.* 5:159.
11. Chen, W., L. C. Anton, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell. 2000. Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity* 12:83.

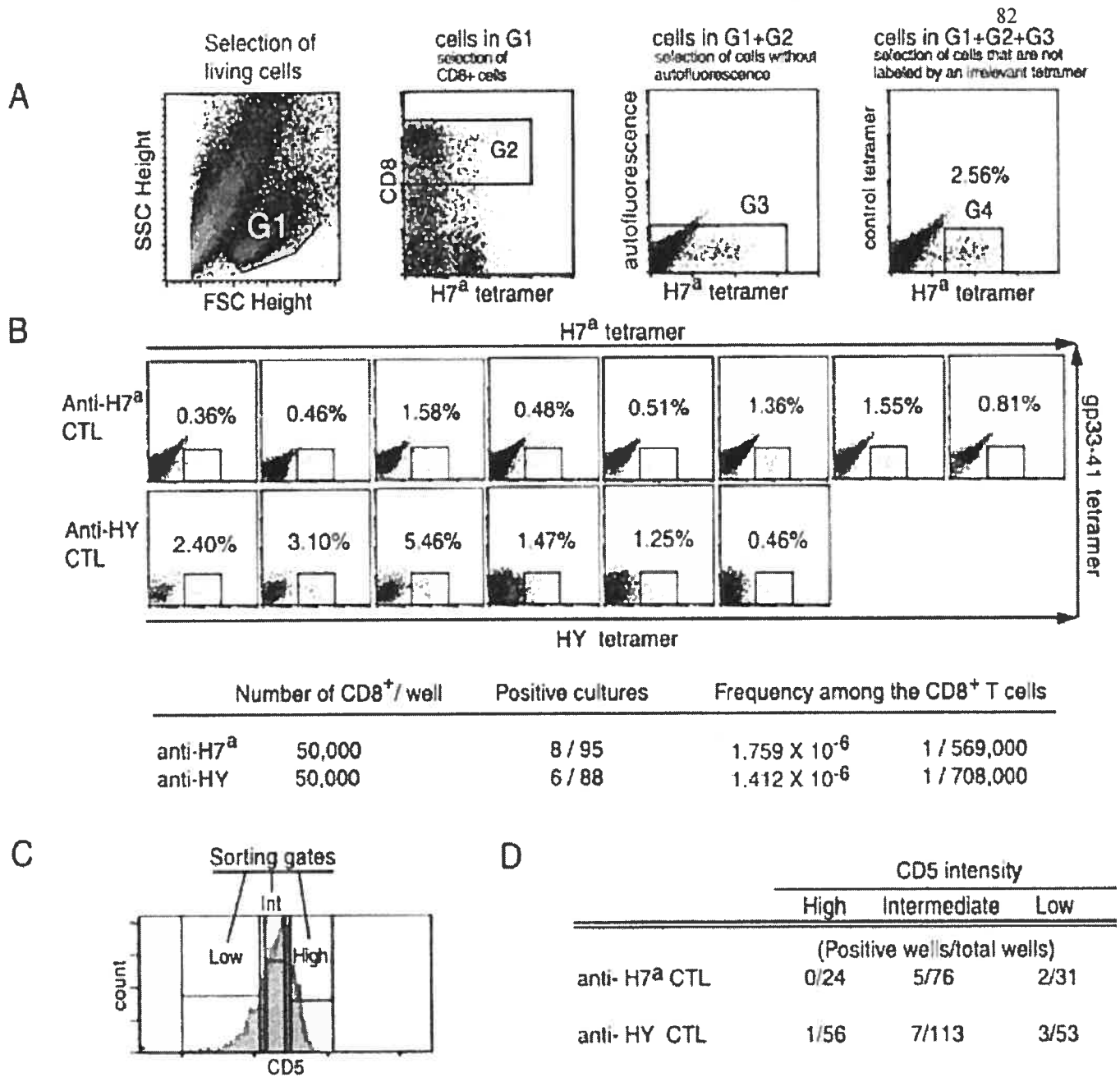


12. Kedl, R. M., J. W. Kappler, and P. Marrack. 2003. Epitope dominance, competition and T cell affinity maturation. *Curr. Opin. Immunol.* 15:120.
13. Pion, S., P. Fontaine, M. Desaulniers, J. Jutras, J. G. Filep, and C. Perreault. 1997. On the mechanisms of immunodominance in cytotoxic T lymphocyte responses to minor histocompatibility antigens. *Eur. J. Immunol.* 27:421.
14. Kedl, R. M., W. A. Rees, D. A. Hildeman, B. Schaefer, T. Mitchell, J. Kappler, and P. Marrack. 2000. T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* 192:1105.
15. Grufman, P., E. Z. Wolpert, J. K. Sandberg, and K. Kärre. 1999. T cell competition for the antigen-presenting cell as a model for immunodominance in the cytotoxic T lymphocyte response against minor histocompatibility antigens. *Eur. J. Immunol.* 29:2197.
16. Roy-Proulx, G., M. C. Meunier, A. M. Lantaigne, S. Brochu, and C. Perreault. 2001. Immunodomination results from functional differences between competing CTL. *Eur. J. Immunol.* 31:2284.
17. Rodriguez, F., S. Harkins, M. K. Slifka, and J. L. Whitton. 2002. Immunodominance in virus-induced CD8<sup>+</sup> T-cell responses is dramatically modified by DNA immunization and is regulated by gamma interferon. *J. Virol.* 76:4251.
18. Probst, H. C., T. Dumrese, and M. F. van den Broek. 2002. Competition for APC by CTLs of different specificities is not functionally important during induction of antiviral responses. *J. Immunol.* 168:5387.
19. Loyer, V., P. Fontaine, S. Pion, F. Héту, D. C. Roy, and C. Perreault. 1999. The *in vivo* fate of APCs displaying minor H antigens and/or MHC differences is regulated by CTLs specific for immunodominant class I-associated epitopes. *J. Immunol.* 163:6462.
20. Wong, P. and E. G. Pamer. 2003. Feedback regulation of pathogen-specific T cell priming. *Immunity* 18:499.
21. Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* 1:311.
22. Liu, F., J. L. Whitton, and M. K. Slifka. 2004. The rapidity with which virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells initiate IFN- $\gamma$  synthesis increases markedly over the course of infection and correlates with immunodominance. *J. Immunol* 173:456.
23. Pion, S., G. J. Christianson, P. Fontaine, D. C. Roopenian, and C. Perreault. 1999. Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocyte responses: explanation for the immunodominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens. *Blood* 93:952.
24. Wettstein, P. J. 1986. Immunodominance in the T cell response to multiple non-H-2 histocompatibility antigens. III. Single histocompatibility antigens dominate the male antigen. *J. Immunol.* 137:2073.
25. Busch, D. H. and E. G. Pamer. 1999. T cell affinity maturation by selective expansion during infection. *J. Exp. Med.* 189:701.
26. Messaoudi, I., J. A. G. Patino, R. Dyal, J. LeMaout, and J. Nikolich-Zugich. 2002. Direct link between *mhc* polymorphism, T cell avidity, and diversity in immune defense. *Science* 298:1797.

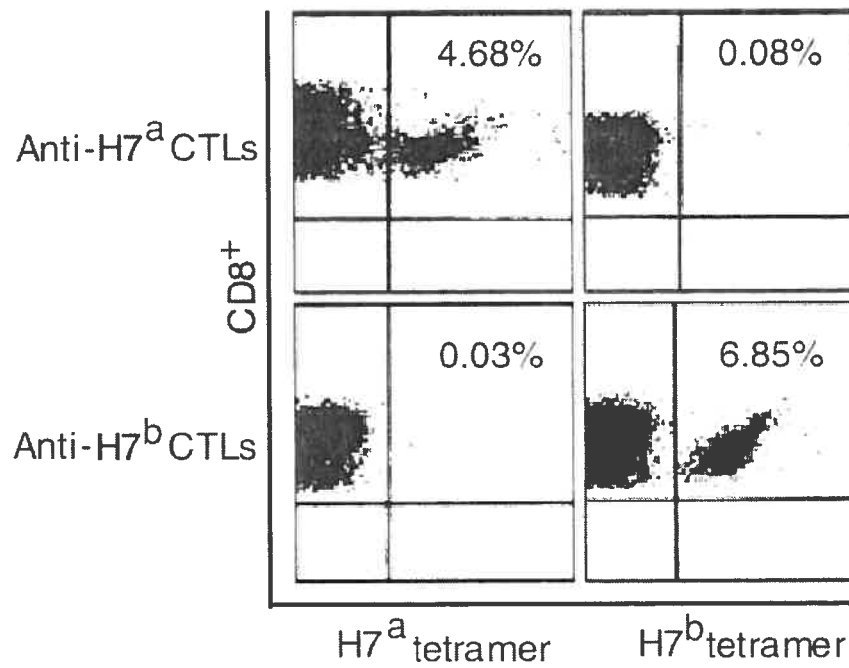
27. Savage, P. A., J. J. Boniface, and M. M. Davis. 1999. A kinetic basis for T cell receptor repertoire selection during an immune response. *Immunity* 10:485.
28. Baker, F. J., M. Lee, Y. H. Chien, and M. M. Davis. 2002. Restricted islet-cell reactive T cell repertoire of early pancreatic islet infiltrates in NOD mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99:9374.
29. Karanikas, V., C. Lurquin, D. Colau, N. van Baren, C. De Smet, B. Lethe, T. Connerotte, V. Corbiere, M. A. Demoitie, D. Lienard, B. Dreno, T. Velu, T. Boon, and P. G. Coulie. 2003. Monoclonal anti-MAGE-3 CTL responses in melanoma patients displaying tumor regression after vaccination with a recombinant Canarypox virus. *J. Immunol.* 171:4898.
30. Malarkannan, S., T. Horng, P. Eden, F. Gonzalez, P. Shih, N. Brouwenstijn, H. Klinge, G. Christianson, D. Roopenian, and N. Shastri. 2000. Differences that matter: major cytotoxic T cell-stimulating minor histocompatibility antigens. *Immunity* 13:333.
31. Malarkannan, S., P. P. Shih, P. A. Eden, Horng, A. R. Zuberi, G. Christianson, D. Roopenian, and N. Shastri. 1998. The molecular and functional characterization of a dominant minor H antigen, H60. *J. Immunol.* 161:3501.
32. Choi, E. Y., Y. Yoshimura, G. J. Christianson, T. J. Sproule, S. Malarkannan, N. Shastri, S. Joyce, and D. C. Roopenian. 2001. Quantitative analysis of the immune response to mouse non-MHC transplantation antigens in vivo: the H60 histocompatibility antigen dominates over all others. *J. Immunol.* 166:4370.
33. Mendoza, L. M., P. Paz, A. Zuberi, G. Christianson, D. Roopenian, and N. Shastri. 1997. Minors held by majors: the *H13* minor histocompatibility locus defined as a peptide-MHC class I complex. *Immunity*. 7:461.
34. Mendoza, L. M., G. Villaflor, P. Eden, D. Roopenian, and N. Shastri. 2001. Distinguishing self from nonself: immunogenicity of the murine H47 locus is determined by a single amino acid substitution in an unusual peptide. *J. Immunol.* 166:4438.
35. Ostrov, D. A., M. M. Roden, W. Shi, E. Palmieri, G. J. Christianson, L. Mendoza, G. Villaflor, D. Tilley, N. Shastri, H. Grey, S. C. Almo, D. Roopenian, and S. G. Nathenson. 2002. How H13 histocompatibility peptides differing by a single methyl group and lacking conventional MHC binding anchor motifs determine self-nonself discrimination. *J. Immunol.* 168:283.
36. McBride, K., C. Baron, S. Picard, S. Martin, D. Boismenu, A. Bell, J. Bergeron, and C. Perreault. 2002. The model B6<sup>dom1</sup> minor histocompatibility antigen is encoded by a mouse homolog of the yeast *STT3* gene. *Immunogenetics* 54:562.
37. Kurokawa, M., H. Furukawa, T. Yabe, T. Matsui, M. Toda, C. Hamada, R. Kasukawa, K. Yamamoto, K. Nishioka, and T. Kato. 1999. Frequency of clonally expanded T cells evaluated by PCR from a single cell. *J. Immunol. Methods* 224:203.
38. Correia-Neves, M., C. Waltzinger, D. Mathis, and C. Benoist. 2001. The shaping of the T cell repertoire. *Immunity* 14:21.
39. Chothia, C., D. R. Boswell, and A. M. Lesk. 1988. The outline structure of the T-cell ab receptor. *EMBO J.* 7:3745.
40. Gascoigne, N. R., Y. Chien, D. M. Becker, J. Kavalier, and M. M. Davis. 1984. Genomic organization and sequence of T-cell receptor b-chain constant- and joining-region genes. *Nature* 310:387.

41. Malissen, M., K. Minard, S. Mjolsness, M. Kronenberg, J. Goverman, T. Hunkapiller, M. B. Prystowsky, Y. Yoshikai, F. Fitch, T. W. Mak, and . 1984. Mouse T cell antigen receptor: structure and organization of constant and joining gene segments encoding the b polypeptide. *Cell* 37:1101.
42. Jouvin-Marche, E., I. Hue, P. N. Marche, C. Liebe-Gris, J. P. Marolleau, B. Malissen, P. A. Cazenave, and M. Malissen. 1990. Genomic organization of the mouse T cell receptor Va family. *EMBO J.* 9:2141.
43. Bousso, P., A. Casrouge, J. D. Altman, M. Haury, J. Kanellopoulos, J. P. Abastado, and P. Kourilsky. 1998. Individual variations in the murine T cell response to a specific peptide reflect variability in naive repertoires. *Immunity* 9:169.
44. Choi, E. Y., G. J. Christianson, Y. Yoshimura, T. J. Sproule, N. Jung, S. Joyce, and D. C. Roopenian. 2002. Immunodominance of H60 is caused by an abnormally high precursor T cell pool directed against its unique minor histocompatibility antigen peptide. *Immunity* 17:593.
45. Blattman, J. N., R. Antia, D. J. D. Sourdive, X. Wang, S. M. Kaech, K. Murali-Krishna, J. D. Altman, and R. Ahmed. 2002. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J. Exp. Med.* 195:657.
46. Dorfman, J. R., I. Stefanova, K. Yasutomo, and R. N. Germain. 2000. CD4<sup>+</sup> T cell survival is not directly linked to self-MHC-induced TCR signaling. *Nat. Immunol.* 1:329.
47. Stefanova, I., J. R. Dorfman, and R. N. Germain. 2002. Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* 420:429.
48. Smith, K., B. Seddon, M. A. Purbhoo, R. Zamoyska, A. G. Fisher, and M. Merkenschlager. 2001. Sensory adaptation in naive peripheral CD4 T cells. *J. Exp. Med.* 194:1253.
49. Kieper, W. C., J. T. Burghardt, and C. D. Surh. 2004. A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J. Immunol.* 172:40.
50. Kersh, G. J., E. N. Kersh, D. H. Fremont, and P. M. Allen. 1998. High- and low-potency ligands with similar affinities for the TCR: the importance of kinetics in TCR signaling. *Immunity* 9:817.
51. Kersh, E. N., A. S. Shaw, and P. M. Allen. 1998. Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor z phosphorylation. *Science* 281:572.
52. Monks, C. R., B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395:82.
53. Yoshimura, Y., R. Yadav, G. J. Christianson, W. U. Ajayi, D. C. Roopenian, and S. Joyce. 2004. Duration of alloantigen presentation and avidity of T cell antigen recognition correlate with immunodominance of CTL response to minor histocompatibility antigens. *J. Immunol.* 172:6666.
54. Casanova, J. L., J. C. Cerottini, M. Matthes, A. Necker, H. Gournier, C. Barra, C. Widmann, H. R. MacDonald, F. Lemonnier, and B. Malissen. 1992. H-2-restricted cytolytic T lymphocytes specific for HLA display T cell receptors of limited diversity. *J. Exp. Med.* 176:439.
55. Sourdive, D. D., K. Murali-Krishna, J. D. Altman, A. J. Zajac, J. K. Whitmire, C. Pannetier, P. Kourilsky, B. Evavold, A. Sette, and R. Ahmed. 1998. Conserved T cell receptor repertoire in primary and memory CD8 T cell responses to an acute viral infection. *J. Exp. Med.* 188:71.

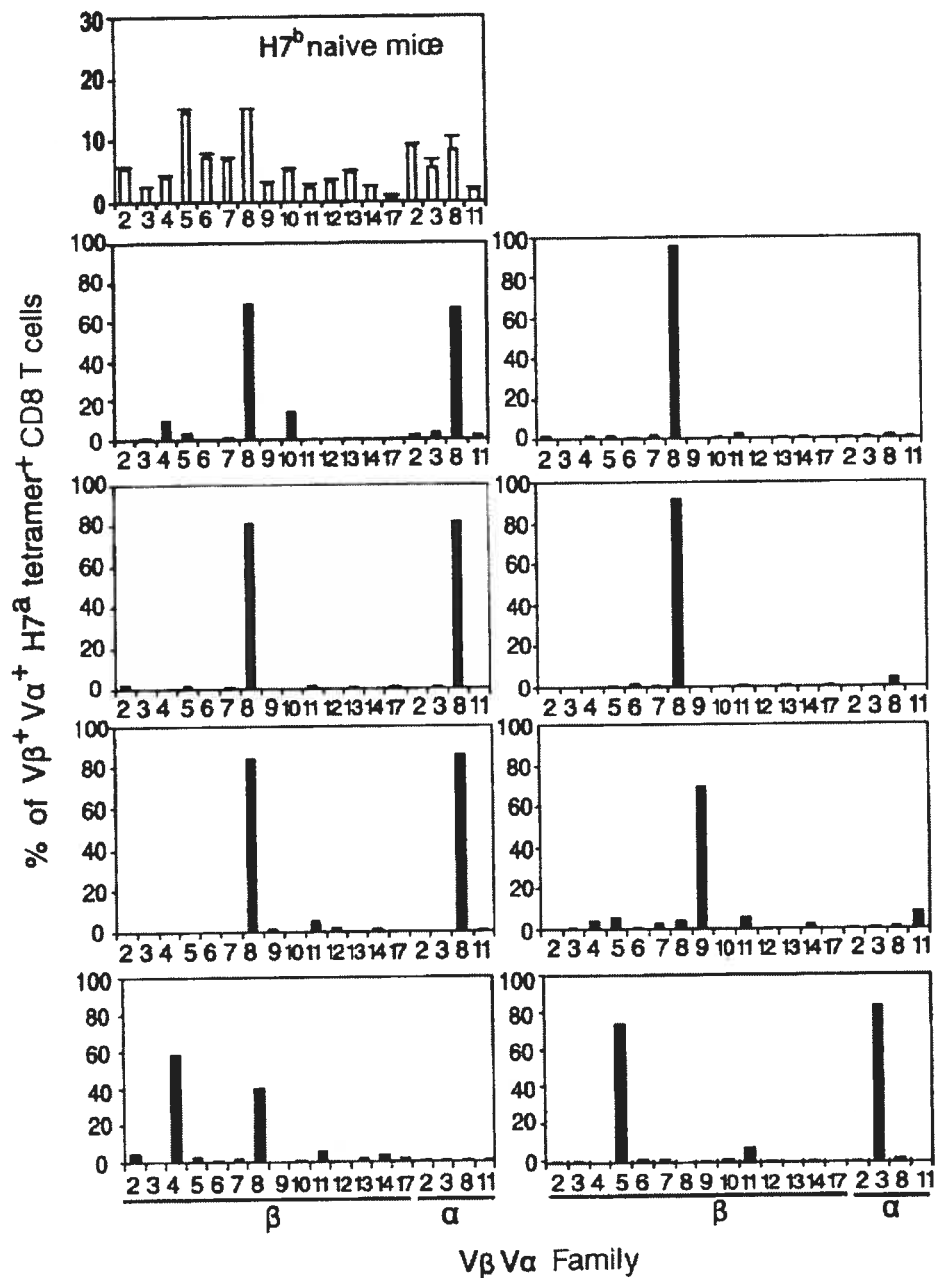
56. Mandruzzato, S., E. Rossi, F. Bernardi, V. Tosello, B. Macino, G. Basso, V. Chiarion-Sileni, C. R. Rossi, C. Montesco, and P. Zanovello. 2002. Large and dissimilar repertoire of Melan-A/MART-1-specific CTL in metastatic lesions and blood of a melanoma patient. *J. Immunol.* 169:4017.
57. Pewe, L. L., J. M. Netland, S. B. Heard, and S. Perlman. 2004. Very diverse CD8 T cell clonotypic responses after virus infections. *J. Immunol.* 172:3151.
58. Casanova, J. L. and J. L. Maryanski. 1993. Antigen-selected T-cell receptor diversity and self-nonsel homology. *Immunol. Today* 14:391.
59. Nikolich-Žugich, J., M. K. Slifka, and I. Messaoudi. 2004. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 4:123.
60. Fontaine, P., G. Roy-Proulx, L. Knafo, C. Baron, D. C. Roy, and C. Perreault. 2001. Adoptive transfer of T lymphocytes targeted to a single immunodominant minor histocompatibility antigen eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat. Med.* 7:789.
61. Eden, P. A., G. J. Christianson, P. Fontaine, P. J. Wettstein, C. Perreault, and D. C. Roopenian. 1999. Biochemical and immunogenetic analysis of an immunodominant peptide (B6<sup>dom1</sup>) encoded by the classical H7 minor histocompatibility locus. *J. Immunol.* 162:4502.
62. Kelleher, D. J., D. Karaoglu, E. C. Mandon, and R. Gilmore. 2003. Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties. *Mol. Cell* 12:101.
63. Stock, A. T., S. N. Mueller, A. L. van Lint, W. R. Heath, and F. R. Carbone. 2004. Cutting Edge: Prolonged antigen presentation after herpes simplex virus-1 skin infection. *J. Immunol.* 173:2241.
64. Kalergis, A. M., N. Boucheron, M. A. Doucey, E. Palmieri, E. C. Goyarts, Z. Vegh, I. F. Luescher, and S. G. Nathenson. 2001. Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. *Nat. Immunol.* 2:229
65. Mempel, T. R., S. E. Henrickson, and U. H. Von Andrian. 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427:154.



**Figure 1.** Anti-H7<sup>a</sup> and anti-HY CD8 T cell precursors exhibit similar frequencies and CD5 expression levels in naïve B10.H7<sup>b</sup> mice. *A*, Procedure for the analysis of lymphocytes labeled by H7<sup>a</sup> or HY tetramers. Autofluorescent cells and those that bind an irrelevant tetramer are gated out. *B*, One hundred and eighty three microcultures were set up with splenocytes suspension adjusted to 5 X 10<sup>4</sup> CD8 T cells per well. These cells were stimulated with HY or H7<sup>a</sup> as described in Materials and Methods. Plots show tetramer labeling of CD8 T cells in the positive anti-H7<sup>a</sup> (top row) and anti-HY (bottom row) wells. *C*, Gating procedure used to separate CD5<sup>lo</sup>, CD5<sup>int</sup> and CD5<sup>hi</sup> CD8 T cell subsets. Cells from these three subsets were plated in different wells. *D*, Frequency of positive microcultures obtained from CD5<sup>lo</sup>, CD5<sup>int</sup> and CD5<sup>hi</sup> CD8 T cells. Culture conditions and cell gating procedures were similar to those used in estimation of precursor frequency (panels *A* and *B*).



**Figure 2.** H7<sup>a</sup> (KAPDNRETL) and its allelic peptide H7<sup>b</sup> (KAPDNRDTL) are not cross-reactive at the TCR level. Splenocytes from B10.H7<sup>b</sup> mice primed against B10 cells (anti-H7<sup>a</sup>), and from B10 mice primed against B10.H7<sup>b</sup> (anti-H7<sup>b</sup>) were stained with H7<sup>a</sup> and H7<sup>b</sup> tetramers.



**Figure 3.** H7<sup>a</sup>-tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells use mainly TCR Vα8<sup>+</sup> and Vβ8<sup>+</sup> chains. Splenocytes from B10.H7<sup>b</sup> mice primed with B10 splenocytes were stained on d 14 with Abs against various TCR Vα and Vβ chains. Nonimmune B10.H7<sup>b</sup> mice were used as controls. Results from nonimmune B10.H7<sup>b</sup> control mice (n = 5) are presented as the mean + SD. Results from mice primed against H7<sup>a</sup> are presented individually for the eight mice tested.

Table 1. Amino-acid and Nucleotide Sequences of the TCR $\alpha$  and  $\beta$  Chain Hypervariable Regions of H7<sup>h</sup> Peritoneal Macrophages (M.D.V. 1 Cell)

Mouse	TCR $\beta$ V Gene	CDR3 Sequence												TCR $\beta$ DJ	Occurrence				
		Length	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			12			
Mouse 1	8.1	C	S	D	R	T	G	G	A	N	Y	A	E	Q	F	F	G	D2.1J 2.1	7/14
	TGT	GCC	AGC	GAC	AGG	ACT	GGG	GGG	GCA	AAC	TAT	GCT	GAG	CAG	TTC	TTC	GGA		
	C	A	S	D	R	A	G	G	V	N	Y	A	E	Q	F	F	G	D2.1J 2.1	5/14
	TGT	GCC	AGC	GAT	CGG	CCT	GGG	GGG	GIT	AAC	TAT	GCT	GAG	CAG	TTC	TTC	GGA		
Mouse 2	8.1	C	S	D	R	T	G	G	V	N	Y	A	E	Q	F	F	G	D2.1J 2.1	1/14
	TGT	GCC	AGC	GAT	CGT	ACT	GGG	GGG	GTG	AAC	TAT	GCT	GAG	CAG	TTC	TTC	GGA		
	C	A	S	E	R	T	S	Y	E	Q					Y	F	G	D2.1J 2.6	1/14
	TGT	GCC	AGC	GAG	AGG	ACT	TCC	TAT	GAA	CAG					TAC	TTC	GGA		
Mouse 2	8.1	C	S	D	R	T	G	G	V	N	Y	A	E	Q	F	F	G	D2.1J 2.1	12/14
	TGT	GCC	AGC	GAT	CGT	ACT	GGG	GGG	GTG	AAC	TAT	GCT	GAG	CAG	TTC	TTC	GGA		
	C	A	S	D	T	T	G	G	E	Y	A	E	Q	Q	F	F	G	D1.1J 2.1	1/14
	TGT	GCC	AGC	GAT	ACT	ACA	GGG	GGG	GAA	TAC	TAT	GCT	GAG	CAG	TTC	TTC	GGA		
Mouse 3	8.3	C	S	G	D	G	G	G	Y	N	Y	A	E	Q	F	F	G	D2.1J 2.1	1/14
	TGT	GCC	AGC	GAT	CGT	ACT	GGG	GGG	GTG	AAC	TAT	GCT	GAG	CAG	TTC	TTC	GGA		
	C	A	S	E	R	T	G	G	P	N	Y	A	E	Q	F	F	G	D2.1J 2.1	16/16
	TGT	GCC	AGC	GAG	AGG	ACT	GGG	GGG	GCA	AAC	TAT	GCT	GAG	CAG	TTC	TTC	GGA		
Mouse 4	8.1	C	S	E	R	T	G	G	P	N	Y	A	E	Q	F	F	G	D2.1J 2.1	18/21
	TGT	GCC	AGC	GAA	CGG	ACT	GGG	GGG	CCT	AAC	TAT	GCT	GAG	CAG	TTC	TTC	GGA		
	C	A	S	P	S	G	G	A	N	Y	A	E	Q	Q	F	F	G	D2.1J 2.1	3/21
	TGT	GCC	AGC	AGA	CCC	TCT	GGG	GGG	GCT	AAC	TAT	GCT	GAG	CAG	TTC	TTC	GGA		
Consensus $\beta$ CDR3		S	D/E	R	T/A	G	G	X	N	Y	A	E	Q						
		AGT	GAT/A	CGT	A/GCT	GGG	GGG	AAC	TAT	GCT	GAG	CAG							

Mouse	TCR $\alpha$ V Gene	CDR3 Sequence												TCR $\alpha$ J	Occurrence				
		Length	1	2	3	4	5	6	7	8	9								
Mouse 1	8.3	C	L	S	S	S	N	T	N	K	V				Y	F	G	27	5/6
	TGT	GCT	CTG	CGA	TCT	TCC	AAT	ACC	AAC	AAA	GTC				GTC	TTT	GGA		
Mouse 2	8.3	C	L	S	R	I									F	F	G	24	1/6
	TGT	GCT	CTG	GAC	AGA	ATC									TTC	TTT	GGT		
Mouse 3	8.3	C	L	S	S	S	N	T	N	K	V				V	F	G	27	10/10
	TGT	GCT	CTG	GCC	TCT	TCC	AAT	ACC	AAC	AAA	GTC				GTC	TTT	GGA		
Mouse 4	8.3	C	L	G	T	G	Y	K	V						V	F	G	10	13/13
	TGT	GCT	CTG	GGG	ACT	GGG	TAT	AAA	GTG						GTC	TTT	GGA		
Mouse 4	8.3	C	L	G	T	G	Y	K	V						V	F	G	10	18/18
	TGT	GCT	CTG	GGG	ACT	GGG	TAT	AAA	GTG						GTC	TTT	GGA		

T lymphocytes were obtained from the spleen of individual B10.H7<sup>h</sup> mice 14 days after priming against H7<sup>h</sup> cells and were then processed for single-cell CDR3 analysis as described in Materials and Methods.



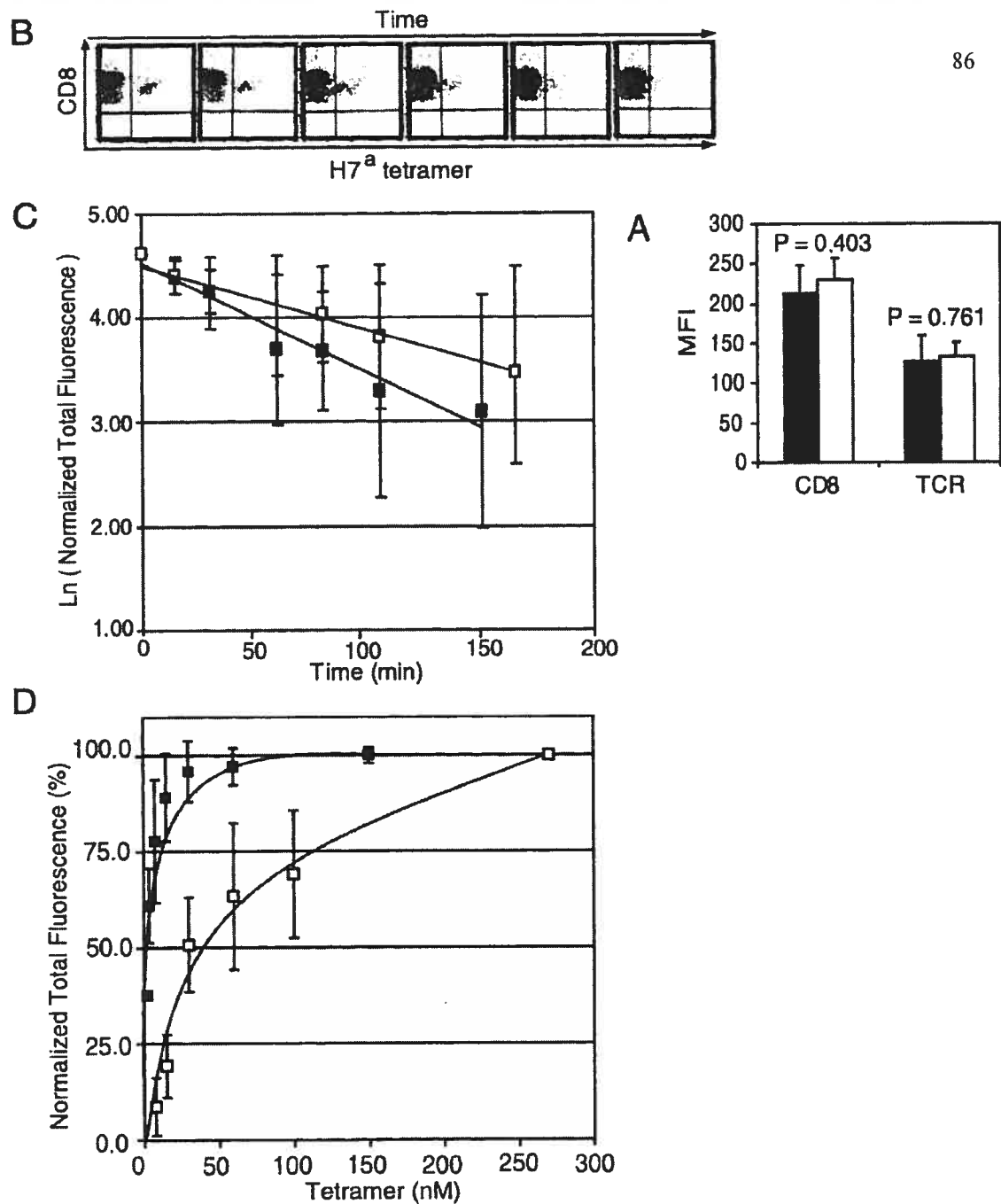
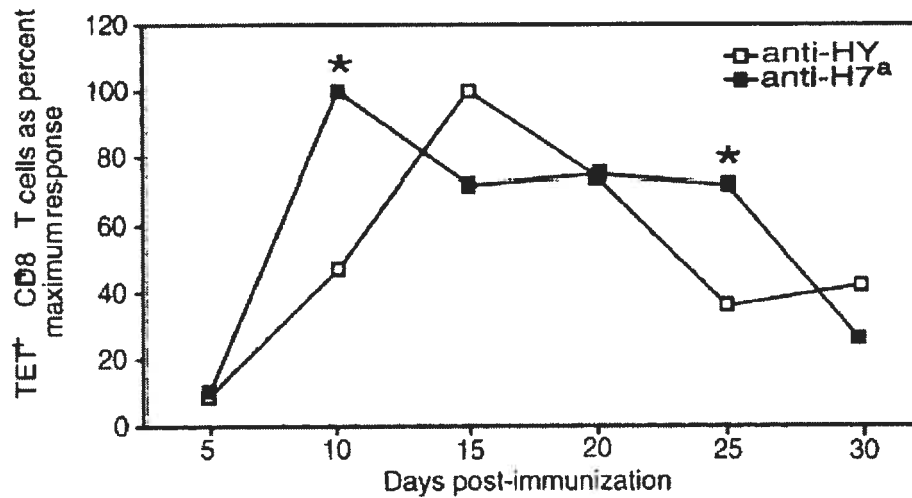


Figure 4. TCR:pepMHC dissociation and association rates for (■) H7<sup>a</sup>- and (□) HY-specific CD8 T cells harvested at the time of primary response (d 14 after Ag priming). *A*, CD8 T cells labeled with H7<sup>a</sup> and HY tetramers were stained with Ab against CD8 and TCR $\alpha\beta$ . *B*, One representative example of H7<sup>a</sup>-tetramer decay plot series. *C*, Decay plot of the natural logarithm of the normalized total fluorescence vs time (after addition of anti-Db mAb 14.4.4) for primed splenocytes stained with H7<sup>a</sup> or HY tetramers. The rate of tetramer decay was similar for cells labeled with H7<sup>a</sup> and HY tetramers ( $p = 0.427$ ). *D*, To evaluate the TCR:pepMHC association rate, d-14 splenocytes were incubated with graded concentrations of the relevant tetramer. In *C* and *D*, each point represents the mean of five to ten mice tested.



**Figure 5.** Kinetics of CD8 T-cell responses against H7<sup>a</sup> and HY. B10.H7<sup>b</sup> female mice were immunized with B10 or B10.H7<sup>b</sup> male cells to evaluate the kinetic of CD8 T-cell response against H7<sup>a</sup> and HY, respectively. The number of tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells in the spleen was measured on day 5, 10, 15, 20, 25 and 30. The maximum response was defined as 100%, and other responses were plotted as a fraction of that maximum response. There were 4 to 7 mice per time point. \* $P < .05$ ; Student *t* test.

## **PRÉFACE AUX ARTICLES COMPLÉMENTAIRES**

---

Parmi l'ensemble des projets menés dans le laboratoire du Dr Perreault, un axe est dédié à l'élaboration d'un essai immunothérapeutique destiné aux patients leucémiques.

En parallèle avec mes travaux sur l'immunodominance, Pierre Fontaine et moi avons également travaillé sur un projet dédié à tester un essai thérapeutique dont l'objectif était de vérifier si la réponse à notre Ag modèle H7<sup>a</sup> était suffisante pour éliminer des cellules tumorales préalablement injectées et permettre la survie des souris testées. Relativement à ma contribution dans ces travaux, Pierre Fontaine et moi-même avons été les deux principaux maîtres d'œuvre des travaux en question, présentés dans la section suivante (Fontaine, P. *et al.* 2001), impliquant par conséquent une contribution majeure de ma part dans le projet.

Pour faire suite aux résultats obtenus par Fontaine *et al.* 2001, j'ai également participé à la réalisation d'une seconde série de travaux dédiée à l'essai thérapeutique en question, cette fois en compagnie de Marie-Christine Meunier. Dans ce projet destiné cette fois à analyser la cinétique de la réponse spécifique à H7<sup>a</sup> et décrire la cinétique d'élimination des cellules tumorales dans un contexte immunothérapeutique, j'ai participé principalement à l'élaboration des expérimentations relatives aux analyses des cellules T spécifiques à H7<sup>a</sup> (Meunier, MC. *et al.* Blood, 2003).

Comme ces deux séries de travaux complémentaires (présentés sous leur forme d'articles publiés) sont dédiées principalement à la caractérisation d'un essai immunothérapeutique, il fut convenu que seules les expérimentations (5) pertinentes à l'étude de l'immunodominance et à son implication en immunothérapie soient présentées et discutées dans cette thèse.

## **ARTICLE COMPLÉMENTAIRE**

---

# **“Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease ”**

**Nature Medicine 2001 July; 7(7):789-94.**

Fontaine P, **Roy-Proulx G**, Knafo L, Baron C, Roy DC, Perreault C.

# Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease

PIERRE FONTAINE, GUILLAUME ROY-PROULX, LAURENT KNAFO, CHANTAL BARON,  
DENIS-CLAUDE ROY & CLAUDE PERREAULT

Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, Canada

Correspondence should be addressed to C.P.; email: [REDACTED]

Adoptive transfer of T cells reactive to minor histocompatibility antigens has the unmatched ability to eradicate malignant hematopoietic cells. Unfortunately, its use is hampered by the associated graft-versus-host disease. The critical issue of a possible dissociation of the antileukemic effect and graft-versus-host disease by targeting specific minor histocompatibility antigens remains unresolved because of the unknown nature and number of minor histocompatibility antigens necessary or sufficient to elicit anti-leukemic activity and graft-versus-host disease. We found that injection of T lymphocytes primed against a single major histocompatibility complex class I-restricted immunodominant minor histocompatibility antigen (B6<sup>dom1</sup>) caused no graft-versus-host disease but produced a curative anti-leukemic response. Avoidance of graft-versus-host disease required that no other host-reactive T cells be co-injected with T cells primed with B6<sup>dom1</sup>. Here we show that effective and non-toxic immunotherapy of hematologic malignancies can be achieved by targeting a single immunodominant minor histocompatibility antigen.

Two main approaches in the field of cancer immunotherapy are currently being investigated. The first approach hinges on the generation/amplification of patients' immune responses towards tumor-associated antigens (TAAs) expressed on the surface of their own cancer cells<sup>1</sup>. Although it appears relatively easy to elicit TAA-specific T-cell responses *in vitro*, curative *in vivo* responses are much more difficult to induce<sup>2</sup>. Because TAAs are 'neo self-antigens' for patients' immune systems and their expression is commonly restricted to cells that are not professional antigen-presenting cells, these antigens are usually neglected by T cells, and even worse, can tolerize TAA-reactive T cells<sup>3,4</sup>.

The second approach based on adoptive immunotherapy uses T cells specific for minor histocompatibility antigens (MiHAs). This approach has been evaluated mainly in patients with hematologic malignancies treated by allogeneic hematopoietic cell transplant (AHCT)<sup>5</sup>. Following AHCT, eradication of leukemic cells is primarily mediated by a donor T-cell-dependent immune reaction, the graft-versus-leukemia (GVL) effect<sup>6,7</sup>. The best evidence that the main targets of the GVL effect are MiHAs rather than TAAs is that the GVL effect is severely attenuated after syngeneic transplant<sup>8,9</sup>. Many studies of relapsing chronic myelogenous leukemia patients have reported that infusion of MiHA-incompatible T cells induces a complete remission in most cases<sup>10,11</sup>. Thus, the GVL effect represents the most conclusive evidence that the immune system can cure cancer in humans.

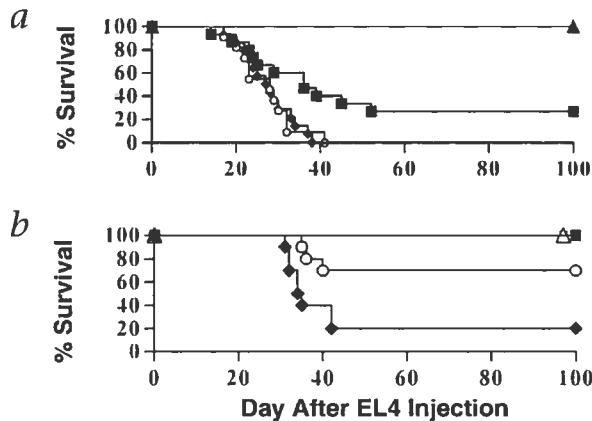
There is one major impediment to MiHA-based adoptive immunotherapy: the occurrence of graft-versus-host disease (GVHD). The importance of this model generates speculation about the possibility of adoptively transferring T cells with GVL activity without causing GVHD by targeting specific

MiHAs (refs. 5, 12). A solution to this conundrum will be possible only when two basic issues are resolved. First, how many MiHAs need to be recognized to produce GVHD and GVL? And second, which specific MiHAs can induce GVHD and GVL?

Using B6<sup>dom1</sup> (H7<sup>a</sup>) as a model antigen, we investigated the ability of a major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted MiHA to elicit GVL and GVHD. B6<sup>dom1</sup> is an immunodominant H2D<sup>b</sup>-associated nonapeptide encoded by the *H7* locus at the telomeric end of chromosome 9 (refs. 13–15). B6<sup>dom1</sup> is an instructive model for MiHA-based adoptive immunotherapy for several reasons: it is highly immunodominant, its biochemical structure has been elucidated and B6<sup>dom1</sup>-congenic (B10.H7<sup>b</sup>) mice are available.

## Priming against B6<sup>dom1</sup> confers resistance to EL4 cells

B6<sup>dom1</sup> is absent on cells from B10.H7<sup>b</sup>, C3H/HeJ and C3H.SW mice, but is present on B6, B10, EL4 and LP cells<sup>14</sup>. EL4 cells are MHC-I/II<sup>-</sup> and express six TAAs (refs. 16, 17). B6 mice injected with  $1 \times 10^5$  EL4 cells died within 40 days (Fig. 1a). Thus, EL4 TAAs do not elicit a protective immune response in unprimed animals. B10 mice differ from B6 mice (and EL4 cells) at the *H9* locus, which encodes a non-dominant MiHA (ref. 18). Host versus EL4 disparity at the *H9* locus had no effect, as survival of B10 recipients was not prolonged relative to that of B6 hosts. In contrast, survival rates of recipients with disparity either for the *H7* locus or the full MHC (C3H/HeJ) were 30% and 100%, respectively. Resistance to EL4 cells increased slightly to 20% in mice primed against H9<sup>a</sup> + EL4 TAAs (Fig. 1b). Survival reached 70% in mice primed with synthetic B6<sup>dom1</sup> peptide and 100% in mice primed with B6<sup>dom1</sup>-positive cells. In the latter group, resistance to EL4 cells was significantly enhanced compared with unprimed animals ( $P = 0.003$ ). Moreover, priming



**Fig. 1** Survival of primed and unprimed mice following i.v. injection of  $1 \times 10^5$  EL4 cells. **a**, Survival of unprimed recipients. ○, B6 (6 TAAs), that is, B6 recipients with antigenic disparity of 6 TAAs with EL4 cells; ◆, B10 (6 TAAs + H9<sup>a</sup> MiHA); ■, B10.H7<sup>b</sup> (6 TAAs + H9<sup>a</sup> and B6<sup>dom1</sup> MiHAs); ▲, C3H/HeJ (full H2<sup>b</sup> haplotype). **b**, Survival of primed mice. ◆, B10 primed with EL4 cells (6 TAAs + H9<sup>a</sup> MiHA), that is, B10 recipients primed with EL4 cells, with common antigens between priming inoculum and EL4 cells of 6 TAAs + H9<sup>a</sup> MiHA; △, B10.H7<sup>b</sup> primed with B10 cells (B6<sup>dom1</sup> MiHA); ■, B10.H7<sup>b</sup> primed with LP cells (B6<sup>dom1</sup> MiHA); ○, B10.H7<sup>b</sup> primed with B6<sup>dom1</sup> peptide (B6<sup>dom1</sup> MiHA).  $n = 10-15$  mice per group.

with B6<sup>dom1</sup>-positive cells seemed more effective than peptide immunization in conferring resistance to EL4 cells ( $P = 0.05$ ). These results indicate that B6<sup>dom1</sup> can trigger a potent immune response which is more protective than that elicited by TAAs and a non-dominant MiHA (H9).

**Transfer of anti-B6<sup>dom1</sup> T cells does not cause GVHD**

We transferred bone-marrow cells and  $5 \times 10^7$  splenocytes (as a source of T cells) from either primed (against B6<sup>dom1</sup>) or unprimed donors into irradiated recipients, and assessed signs of GVHD. As donors, we used B10.H7<sup>b</sup> mice that differ from B10 hosts at the H7 locus as well as C3H.SW mice that differ from B10 for numerous MiHAs including H7. Transfer of B10.H7<sup>b</sup>-derived cells from either naive or primed donors caused no GVHD in B10 hosts (Table 1). We observed a lack of GVHD with B10.H7<sup>b</sup> donors primed under three conditions: subcutaneous injection of B6<sup>dom1</sup> peptide, or intraperitoneal (i.p.) injection of splenocytes presenting either selective B6<sup>dom1</sup> difference (B10 cells) or multiple MiHA differences including B6<sup>dom1</sup> (LP cells).

The above results seemed to contradict a previous study that found GVHD in 50% of B6 mice injected with cells from B6<sup>dom1</sup>-primed C3H.SW donors<sup>14</sup>. We thus investigated why mice had GVHD after transplantation of B6<sup>dom1</sup>-primed cells from C3H.SW but not B10.H7<sup>b</sup> donors (Table 1). We first confirmed GVHD in 53% of B10 hosts following injection of cells from C3H.SW mice primed with B6<sup>dom1</sup> peptide, but not from unprimed donors<sup>14,19</sup>. Dermatitis, weight loss, elevation of aspartate aminotransferase (AST) levels and a 20% mortality rate characterized GVHD. Notably, cells from B6<sup>dom1</sup>-primed C3H.SW donors elicited no GVHD in B10.H7<sup>b</sup> recipients. This finding shows that expression of B6<sup>dom1</sup> by host cells is absolutely necessary for induction of GVHD by B6<sup>dom1</sup>-primed C3H.SW-derived T cells. This excludes the possibility of GVHD being initiated by T cells reactive to a cross-reactive contaminant in the B6<sup>dom1</sup> peptide preparation.

We devised two alternative hypotheses to explain this contradiction: 1) following antigen priming, expansion of B6<sup>dom1</sup>-reactive T cells is more substantial in C3H.SW than in B10.H7<sup>b</sup> donors; or 2) post-trans-

plant expansion of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells is more important when derived from a C3H.SW than from a B10.H7<sup>b</sup> donor. We excluded the first premise after we found that the percentage of B6<sup>dom1</sup>/H2D<sup>b</sup> tetramer<sup>+</sup> T cells was not greater in peptide-primed C3H.SW donors than in B10.H7<sup>b</sup> donors primed with B10 cells (Fig. 2). Moreover, comparison of B10.H7<sup>b</sup> mice primed with B6<sup>dom1</sup>-positive cells or with B6<sup>dom1</sup> peptide showed that expansion of tetramer-positive T cells was greater after cell injection than after peptide immunization (Fig. 1b). The second hypothesis could also be dismissed because the number of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells found on day 15 in the spleen of recipients from C3H.SW and from B10.H7<sup>b</sup> donors was not different (Table 2).

One important difference between C3H.SW- and B10.H7<sup>b</sup>-derived T cells is that only the former contain T cells reactive to MiHAs other than B6<sup>dom1</sup> on B10 cells<sup>20</sup>. Thus, we tested whether purified C3H.SW-derived B6<sup>dom1</sup>-reactive T cells would cause GVHD in B10 recipients in the absence of other host-reactive T cells. Injection of T-cell-depleted bone marrow with  $5 \times 10^5$  purified, *in vitro*-expanded B6<sup>dom1</sup>-specific T cells from C3H.SW donors caused no GVHD in B10 hosts (Table 1). Because  $4.3 \pm 2.1 \times 10^5$  B6<sup>dom1</sup>-specific T cells were recovered from recipient spleen ( $n = 5$ ) on day 15, the lack of GVHD could not be ascribed to rapid disappearance of these cells. A logical inference is that the occurrence of GVHD in B10 recipients of T cells from B6<sup>dom1</sup>-primed C3H.SW donors is best explained by epitope spreading, a process whereby epitopes distinct from and non-cross-reactive with an inducing epitope become targets of an evolving immune response<sup>21</sup>.

**B6<sup>dom1</sup> MiHA expression**

A study in mice has indicated that in order to trigger GVHD, MiHAs must be expressed on both hematopoietic and non-

**Table 1** Evaluation of GVHD induced by T cells from naive and B6<sup>dom1</sup>-primed donors

Donor (Priming)	Recipient <sup>a</sup>	Signs of GVHD			
		Dermatitis <sup>b</sup>	Survival <sup>c</sup>	Weight Loss <sup>d</sup>	AST <sup>e</sup>
B10.H7 <sup>b</sup> (none)	B10	0	100	0	NT
B10.H7 <sup>b</sup> (B6 <sup>dom1</sup> peptide)	B10	0	100	0	NT
B10.H7 <sup>b</sup> (B10 cells)	B10	0	100	0	111 ± 56*
B10.H7 <sup>b</sup> (LP cells)	B10	0	100	0	NT
C3H.SW (none)	B10	0	100	0	NT
C3H.SW (B6 <sup>dom1</sup> peptide)	B10	53	80	40	227 ± 114*
C3H.SW (B6 <sup>dom1</sup> peptide)	B10.H7 <sup>b</sup>	0	100	0	NT
C3H.SW + cell line <sup>g</sup>	B10	0	100	0	NT

<sup>a</sup>, 15-20 mice per group. <sup>b</sup>, Percentage of mice with dermatitis. <sup>c</sup>, Percentage of mice alive on day 100. <sup>d</sup>, Percentage of mice with > 5% weight loss on day 50. <sup>e</sup>, Serum levels of AST (IU/L) were assessed on day 15 post-transplant in 5 mice per group. The mean AST level in a syngeneic control group was 139 ± 59. <sup>f</sup>, Purified *in vitro* expanded C3H.SW-derived anti-B6<sup>dom1</sup> CD8<sup>+</sup> T cells. <sup>g</sup>, Significant difference between experimental groups ( $P = 0.03$ ). NT, not tested.

**Table 2** Numbers of B6<sup>dom1</sup>-specific CD8<sup>+</sup> T cells in recipient's spleen

Group	Donor (priming)	Recipient <sup>a</sup>	EL4 cells <sup>c</sup>	CD8 <sup>+</sup> tetramer <sup>b</sup> cells (× 10 <sup>3</sup> per spleen) <sup>d</sup>
A	C3H.SW (B6 <sup>dom1</sup> peptide)	B10	No	79 ± 20
B	B10.H7 <sup>b</sup> (B10 cells)	B10	No	66 ± 25
C	B10.H7 <sup>b</sup> (B10 cells)	B10	Yes	67 ± 45
D	B10.H7 <sup>b</sup> (B10 cells)	B10.H7 <sup>b</sup>	Yes	10 ± 8

<sup>a</sup>, 3 mice per group. <sup>b</sup>, 1 × 10<sup>5</sup> EL4 cells i.v. on day 1. <sup>c</sup>, Numbers of CD8<sup>+</sup> T cells that stained positive with B6<sup>dom1</sup>/D<sup>b</sup> tetramers on day 15 post-transplant.

hematopoietic host cells<sup>22</sup>. Could the inability of B6<sup>dom1</sup> to elicit GVHD be explained by selective expression on hematopoietic cells? By testing peptide extracts from B6 mouse organs in cytotoxic T lymphocyte (CTL) assays, we have shown that B6<sup>dom1</sup> has a wide tissue distribution. B6<sup>dom1</sup> was present in all 10 organs tested, including those that are the main targets of GVHD (skin, liver and intestines)<sup>15</sup>. To determine the origin of B6<sup>dom1</sup> recovered from non-lymphoid organs, we created hematopoietic chimeras that expressed B6<sup>dom1</sup> on either hematopoietic cells or non-hematopoietic cells. Thus, irradiated C3H.SW (Thy1.2, B6<sup>dom1</sup>-negative) mice were transplanted with B6.PL (Thy1.1, B6<sup>dom1</sup>-positive) bone-marrow + spleen cells (B6.PL → C3H.SW), and vice versa (C3H.SW → B6.PL). When tested on day 180 post-transplant, mice were complete hematopoietic chimeras as determined by staining of spleen cells with antibodies against Thy1.1 and Thy1.2 (< 1% host cells; data not shown). When we used titrated amounts of peptide extracts to sensitize target cells to lysis by B6<sup>dom1</sup>-specific T cells, we recovered B6<sup>dom1</sup> from the liver of B6 but not of B10.H7<sup>b</sup> mice. This indicates that the B6<sup>dom1</sup>-specific T-cell line does not crossreact with other peptides from the C57BL background (Fig. 3). B6<sup>dom1</sup> was present in similar amounts in liver extracts from B6.PL → C3H.SW and C3H.SW → B6.PL mice. Hence, B6<sup>dom1</sup> is present in both hematopoietic and non-hematopoietic cells. We obtained similar results with lung extracts (data not shown). We estimate that, on a per cell basis, the mean number of B6<sup>dom1</sup> copies on liver non-hematopoietic cells is no more than 10% of that on hematopoietic cells because the number of liver hematopoietic cells is less than 10% that of non-hematopoietic cells<sup>21</sup>, and because we recovered similar amounts of B6<sup>dom1</sup> from non-hematopoietic cells (C3H.SW → B6.PL liver) relative to hematopoietic cells (C3H.SW → B6.PL liver).

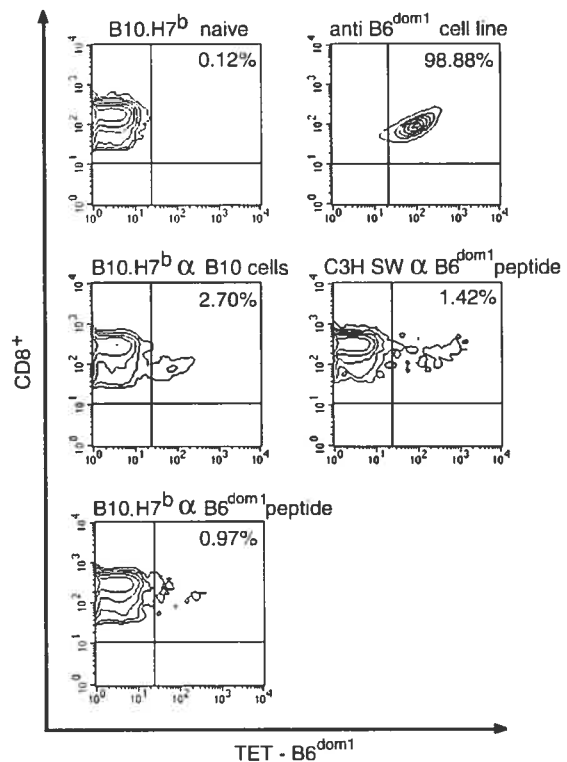
#### Transfer of anti-B6<sup>dom1</sup> T cells eradicates EL4 cells

Irradiated mice received bone-marrow cells and 5 × 10<sup>7</sup> splenocytes from B10.H7<sup>b</sup> or B10 donors on day 0, and 1 × 10<sup>5</sup> EL4 cells on day 1. We injected donors with B10 or EL4 cells on day -14. Recipients were either B10.H7<sup>b</sup> or B10 mice; in the former group, B6<sup>dom1</sup> was present only on injected EL4 cells,

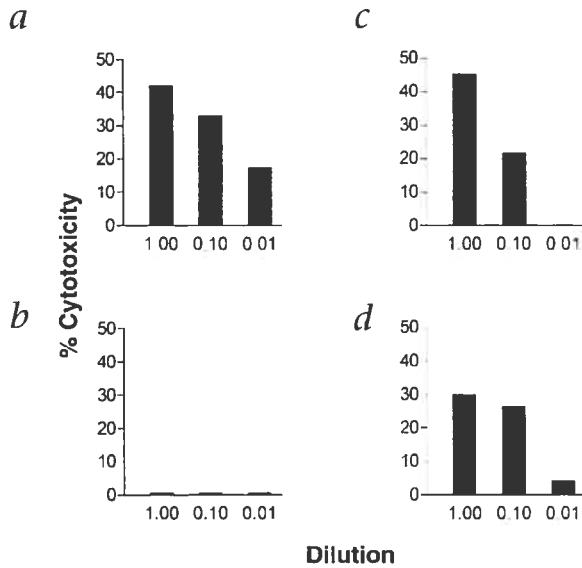
whereas in the latter group B6<sup>dom1</sup> was also present on host cells (Fig. 4). We monitored mice for signs of GVHD, and performed autopsies on mice that died before day 100 to ascertain whether death was due to GVHD or leukemia. Recipients of B10 T cells died of EL4 leukemia between days 23 and 43. In contrast, long-term survival was achieved in 60% of B10 recipients injected with B6<sup>dom1</sup>-primed B10.H7<sup>b</sup>-derived T cells. In these mice, we observed no GVHD, but 40% of recipients died of leukemia. The cure rate was increased to 100% in B10.H7<sup>b</sup> recipients injected with the same inoculum, and the difference between B10 and B10.H7<sup>b</sup> hosts was significant (*P* = 0.03). In comparison, transfer of T cells from B10 donors primed against EL4 TAAs yielded only 20% long-term survival (8/10 recipients died of leukemia), significantly less than the survival rate of B10.H7<sup>b</sup> recipients of B6<sup>dom1</sup>-primed T cells (*P* = 0.0007). Thus, although adoptive transfer of anti-B6<sup>dom1</sup> T cells did not cause GVHD, it produced a more effective GVL response than that achieved by transferring T cells primed against TAAs. The difference in survival between B10 and B10.H7<sup>b</sup> recipients of B6<sup>dom1</sup>-primed T cells indicates that tissue distribution of the target MiHA might influence the potency of the GVL reaction.

To evaluate whether the fate of adoptively transferred B6<sup>dom1</sup>-specific T cells was influenced by the distribution of their target antigen, we assessed the number of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells in B10 and B10.H7<sup>b</sup> recipients injected with EL4 cells (Table 2). The number of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells collected from recipients' spleens on day 15 was 6–7-fold greater in B10 compared with B10.H7<sup>b</sup> hosts. Thus, the expansion of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells was less vigorous in B10.H7<sup>b</sup> hosts, which nevertheless presented a superior leukemia cure rate.

In order to determine whether the difference between B10



**Fig. 2** Assessment of B6<sup>dom1</sup>-specific CD8<sup>+</sup> T cells by staining with B6<sup>dom1</sup>/D<sup>b</sup> tetramers. Numbers indicate the percentage of CD8<sup>+</sup> T cells that were tetramer-positive. Staining of splenocytes from unprimed B10.H7<sup>b</sup> mice (negative control) as well as B6<sup>dom1</sup>-specific cell line (positive control) show B6<sup>dom1</sup>/D<sup>b</sup> tetramers to be a highly specific and sensitive reagent. Mean ± s.d. percentage of tetramer-positive CD8<sup>+</sup> T cells was 0.9 ± 0.2 for B10.H7<sup>b</sup> mice primed with B6<sup>dom1</sup> peptide, 2.4 ± 0.4 for B10.H7<sup>b</sup> mice primed with B10 cells, and 1.3 ± 0.3 for C3H.SW mice primed with B6<sup>dom1</sup> peptide. Data represent 3–4 independent experiments.



**Fig. 3**  $B6^{dom1}$  is expressed on both hematopoietic and non-hematopoietic cells. **a–d**, Peptides were extracted from the liver of B6.PL (**a**), B10.H7<sup>b</sup> (**b**), B6.PL → C3H.SW (**c**) and C3H.SW → B6.PL (**d**) mice. Titrated amounts of fractionated liver extracts were incubated with <sup>51</sup>Cr-labeled C3H.SW Con A blast targets in the presence of  $B6^{dom1}$ -specific effectors. Specific cytotoxicity is shown as the mean of triplicate cultures.

ing—when naive T cells reactive to other host MiHAs (which did not cause GVHD when transplanted alone) were co-injected with  $B6^{dom1}$ -specific T cells. The most plausible explanation is that destruction of host hematopoietic cells by  $B6^{dom1}$ -primed T cells has no direct deleterious consequence, but promotes cross-presentation of host MiHAs in an inflammatory context. Accordingly, this cross-presentation of host MiHAs would have no consequence when only  $B6^{dom1}$ -specific T cells are transferred, but would result in the priming of co-injected T cells specific for other MiHAs and thereby initiate GVHD. The inference is that avoidance of GVHD will be best ensured by selective transfer of T cells specific for the target MiHA. Moreover, our suggestion that T cells specific for some MiHAs might cause GVHD because they induce epitope spreading is a plausible explanation for observations from another group. Goulmy *et al.* found that a mismatch of the HA-1 MiHA is associated with an increased risk of GVHD even though HA-1 is selectively expressed on hematopoietic cells and the main GVHD targets are epithelial cells<sup>24,25</sup>. We propose that HA-1 might behave like  $B6^{dom1}$  and induce GVHD by initiation of epitope spreading rather than through direct effect of HA-1-specific T cells on the various GVHD target cells.

It has been proposed that avoidance of GVHD might require targeting MiHAs that are present strictly on hematopoietic cells<sup>5,12</sup>. However, the frequency of immunodominant MiHAs strictly expressed on hematopoietic cells is unknown. The finding that anti- $B6^{dom1}$  T cells do not cause GVHD—though this MiHA has a wide tissue distribution—is therefore an important result. This suggests that compared with hematopoietic cells, non-hematopoietic cells are less susceptible to MiHA-specific T cells. Differential susceptibility to MiHA-reactive T cells is probably related to the fact that the amount of MiHA peptide on the cell surface is determined by the level of expression of MHC molecules, which is lower on non-hematopoietic than hematopoietic cells<sup>26,27</sup>. This idea is consistent with our estimate of  $B6^{dom1}$  expression being one order of magnitude lower on hepatocytes relative to Kupffer cells.

The finding that T cells targeted to  $B6^{dom1}$  may eradicate cancer cells is plausible. MiHAs are essentially T-cell epitopes that elicit rejection of antigen-bearing cells<sup>28</sup>. What may seem more surprising, however, is that  $B6^{dom1}$ -specific T cells do not cause GVHD. We suggest that this phenomenon is not particular to

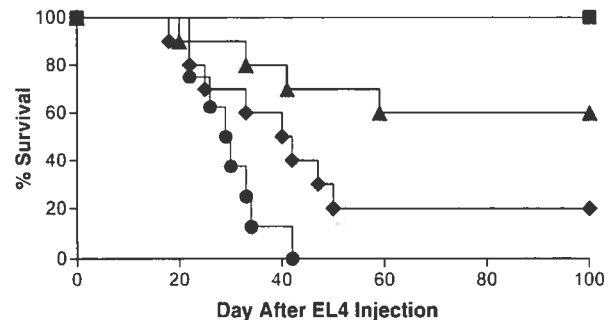
and B10.H7<sup>b</sup> recipients was sensitive to T-cell dosage, we decreased the number of splenocytes injected by 50% for B10.H7<sup>b</sup> recipients (to  $25 \times 10^6$ ) and increased it five-fold (to  $25 \times 10^7$ ) for B10 recipients. As in a previous experiment (Fig. 4), all B10.H7<sup>b</sup> recipients survived without signs of leukemia ( $n = 15$ ; data not shown). The outcome of B10 recipients injected with  $25 \times 10^7$  splenocytes was similar to that seen in those receiving  $5 \times 10^7$  splenocytes; none presented signs of GVHD, yet 5 of 15 mice died of leukemia (data not shown). Based on staining with  $B6^{dom1}/D^b$  tetramers, we calculated that the number of  $B6^{dom1}$ -specific CD8<sup>+</sup> T cells found in  $25 \times 10^7$  B10.H7<sup>b</sup>-derived splenocytes primed with B10 cells was about  $0.5 \times 10^5$ . Hence, eradication of leukemia cells occurred in all B10.H7<sup>b</sup> recipients under conditions where the effector:target ratio ( $B6^{dom1}$ -specific T cells:EL4 cells) was approximately 1:2. Injection of 10 times this number of T cells into B10 recipients caused no GVHD, and eradicated leukemic cells in 10 of 15 recipients, yet failed to cure leukemia in 5.

### Discussion

This study shows that adoptive transfer of primed T cells targeted to a single immunodominant MiHA can eradicate leukemia cells without causing GVHD. Moreover, an estimate of the number of T cells required to achieve this goal is provided. These findings might have important implications for leukemia immunotherapy and should advance efforts to define human immunodominant MiHAs in molecular terms. Moreover, our results raise several unforeseen issues regarding the avoidance of GVHD and the potentiation of GVL effect.

We observed no GVHD when  $B6^{dom1}$ -primed T cells were the only host-reactive T cells injected. However, we detected GVHD of moderate intensity—most consistent with epitope spread-

**Fig. 4** Adoptive transfer of  $B6^{dom1}$ -primed T cells eradicates EL4 cells. Irradiated mice were injected i.v. with bone-marrow cells and splenocytes from B10.H7<sup>b</sup> or B10 donors on day 0. Donors were primed with EL4 or B10 cells on day -14. On day 1, recipient mice ( $n = 10$  per group) received  $1 \times 10^5$  EL4 cells. ■, B10.H7<sup>b</sup> (B10) → B10.H7<sup>b</sup>, that is, B10.H7<sup>b</sup> donors primed against B10 cells into B10.H7<sup>b</sup> hosts; ▲, B10.H7<sup>b</sup> (B10) → B10; ◆, B10 (EL4) → B10; ●, B10 (B10) → B10.





B6<sup>dom1</sup>. Experiments in congenic mice, where donors and recipients were incompatible for a single MiHA, consistently failed to document a single occurrence of GVHD in any of the 25 different donor–recipient combinations tested<sup>29</sup>. GVHD could only be obtained when donors and recipients displayed multiple incompatible MiHAs (refs. 19,22). We conclude that if some MiHAs exist that can elicit GVHD alone, that is, without epitope spreading or the help of other MiHAs, they must be exceedingly rare. Rather, we propose that the occurrence of GVHD depends on the recognition of several recipient MiHAs, the minimal number of MiHAs required being greater than one in most if not all cases. Mutis *et al.* have shown that CTLs specific for a single MiHA can be generated *ex vivo* from unprimed blood donors using dendritic cells pulsed with synthetic MiHAs (refs. 30). We predict that selective transfer of such *ex vivo*-primed CTLs selective for a single MiHA will be effective in eradicating leukemic cells without causing GVHD.

Most mice primed by injection of B6<sup>dom1</sup> peptide remained leukemia-free following injection of EL4 cells (Fig. 1b). This indicates that CD8<sup>+</sup> T cells are sufficient to mount a protective B6<sup>dom1</sup>-specific response against leukemia cells and is consistent with the fact that B6<sup>dom1</sup> is an immunodominant CD8<sup>+</sup> T-cell epitope and is thus less dependent on CD4<sup>+</sup> help<sup>11,14,11</sup>. Besides, B6<sup>dom1</sup>-reactive CD8<sup>+</sup> T cells must be essential for the induction of GVHD by splenocytes from C3H.SW donors primed with B6<sup>dom1</sup> peptide because this peptide is selectively recognized by H2D<sup>b</sup>-restricted CD8<sup>+</sup> T cells. However, once initiated by B6<sup>dom1</sup>-specific T cells, epitope spreading might recruit a diverse repertoire of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells which could contribute to GVHD.

When primed against B6<sup>dom1</sup> (on B10 splenocytes), cells from B10.H7<sup>b</sup> donors eradicated leukemic cells in 100% of syngeneic hosts. However, the cure rate decreased to 60% when B6<sup>dom1</sup>-specific T cells were injected into B10 hosts, that is, when the target MiHA was expressed not only on leukemic cells but also on host cells. This occurred despite the fact that on day 15 the number of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells was greater in B10 than B10.H7<sup>b</sup> hosts. Why was the antileukemia effect less potent in B10 recipients? Confrontation with ubiquitously expressed antigens is known to cause a brisk expansion of antigen-reactive T cells, which is followed by their demise via activation-induced cell death (AICD)<sup>12,11</sup>. We propose that confrontation of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells with ubiquitously expressed B6<sup>dom1</sup> leads to AICD, and that this limits the duration of the GVL effect. Further studies of the post-transplant fate and tissue distribution of adoptively transferred B6<sup>dom1</sup>-specific T cells will be required to test this hypothesis. Nonetheless, because many MiHAs have a wide tissue distribution<sup>15,26</sup>, preventing AICD of adoptively transferred CD8<sup>+</sup> T cells using molecules such as IL-15 (ref. 34) might be a useful adjunct to successful MiHA-based leukemia immunotherapy.

## Methods

**Mice.** The following strains of mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) and bred in the Guy-Bernier Research Center: B6.PL-*Thy-1*<sup>2</sup>/Cy (B6.PL), B10.C-*H7*<sup>b</sup>(47N)/Sn (B10.H7<sup>b</sup>), C3H/HeJ, C3H.SW, C57BL/6J (B6), C57BL/10J (B10) and LP/J.

**Tumor cells and CD8<sup>+</sup> T-cell lines.** We obtained the EL4 thymoma cell line (of C57BL/6J origin) from the American Type Culture Collection (Rockville, Maryland). The long-term B6<sup>dom1</sup>-specific T-cell line used in Fig. 2 has been described<sup>13</sup>. Short-term C3H.SW-derived B6<sup>dom1</sup>-specific T-cell lines were generated for *in vivo* adoptive transfer experiments. Thus, C3H.SW mice were injected twice with  $2 \times 10^7$  B10 spleen cells on days -21 and -14.

Splenocytes from primed mice were restimulated *in vitro* weekly for 4–6 rounds with C3H.SW spleen cells pulsed with 1 nM B6<sup>dom1</sup> peptide in culture medium supplemented with 50 U/ml human recombinant interleukin-2 (rIL-2; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota). When used for *in vivo* experiments, anti-B6<sup>dom1</sup> T-cell lines were shown by flow cytometry analysis to contain at least 98% CD8<sup>+</sup> cells of which more than 90% were stained by B6<sup>dom1</sup> tetramers.

**Cell transplantation and assessment of GVHD.** Mice were transplanted as described<sup>15</sup>. In most experiments, recipient mice received 1000 cGy total body irradiation from a <sup>60</sup>Co source at a dose rate of 128 cGy/min on day 0, the day of transplant. The dose of irradiation was increased to 1200 cGy for production of hematopoietic chimeras used to evaluate the presence of B6<sup>dom1</sup> in tissue extracts (Fig. 3). Bone-marrow cells ( $1 \times 10^7$ ) mixed with spleen cells ( $5 \times 10^7$ , unless stated otherwise) from naive or immunized donors, or mixed with purified B6<sup>dom1</sup>-specific T cells, were given as a single *i.v.* injection via the tail vein. Donor immunization was performed by *i.p.* injection of  $2 \times 10^7$  cells (either normal splenocytes or irradiated EL4 cells) on day -14, or by subcutaneous injection of 300 µg B6<sup>dom1</sup> peptide in incomplete Freund's adjuvant on days -21 and -14. Mice injected with purified B6<sup>dom1</sup>-specific T cells (short-term CD8<sup>+</sup> T cell lines) were given daily *i.p.* injection of 2,500 U human rIL-2 for 7 days (days 0 to 6) to increase *in vivo* growth and survival of cultured antigen-activated T cells<sup>16</sup>. Differences between group means were tested using Fisher's exact test and Student's *t*-test.

**Synthetic peptides.** B6<sup>dom1</sup> peptide (AAPDNRETF) was synthesized by the Sheldon Biotechnology Centre (Montreal, Canada). Purity, as determined by reversed phase-high performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis, was above 97%.

**Extraction and HPLC fractionation of natural B6<sup>dom1</sup> peptide.** B6<sup>dom1</sup> peptide was extracted from tissue homogenates in 0.1% trifluoroacetic acid in the presence of protease inhibitors as described<sup>15</sup>. After a pre-purification on a C18 Sep-Pak column (Waters, Milford, Massachusetts), extracts containing 5 mg protein were fractionated on an HPLC system using a Luna C18 column (5 µm, 4.6 × 250 mm, Torrance, California). Solvents used were 99.9% water/0.1% trifluoro-acetic acid (solvent A) and 99.9% acetonitrile/0.1% trifluoro-acetic acid (solvent B). The gradient consisted of the following linear step intervals: 0% B (0–5 min), up to 20% B at 10 min, up to 55% B at 55 min, plateau at 55% B from 55–60 min, and up to 100% B at 70 min. Flow rate was 1 ml/min, and 1-ml fractions were collected and lyophilized. To evaluate the presence of B6<sup>dom1</sup> in tissue extracts, fraction 15, where the B6<sup>dom1</sup> peptide eluted, was incubated with <sup>51</sup>Cr-labeled C3H.SW Con A blast targets that were tested in cytotoxicity assays in the presence of B6<sup>dom1</sup>-specific effectors (effector/target cell ratio was 10/1)<sup>15</sup>.

**MHC class I/peptide tetramers.** MHC class I (H2D<sup>b</sup>)/peptide (B6<sup>dom1</sup>) tetramers were produced as described<sup>32,37</sup>. Recombinant β<sub>2</sub>-microglobulin and the extracellular domain of the MHC class I heavy chain containing the BirA recognition sequence in frame at its C terminus were overexpressed in *Escherichia coli* as insoluble aggregates forming inclusion bodies. Purified inclusion bodies were solubilized in urea, and monomeric H2D<sup>b</sup> complexes were refolded around peptide by dilution of denaturing buffer. Monomeric complexes were recovered by anion exchange chromatography over a Mono Q HR column (Pharmacia, Uppsala, Sweden). H2D<sup>b</sup>/peptide complexes were biotinylated using BirA enzyme (Avidity, Denver, Colorado) as described<sup>38</sup>. Tetramers were generated by mixing the biotinylated monomeric complexes with NeutrAvidin-PE (Molecular Probes, Eugene, Oregon) at a 6:1 molar ratio. Then, biotinylated tetramers were purified by gel filtration over a Superdex 200 HR column (Pharmacia).

**Cell staining and flow cytometry.** Evaluation of chimerism was performed with PE-conjugated anti-Thy-1.2 (clone 30-H12) and FITC-conjugated anti-Thy-1.1 (clone OX-7) antibodies from Pharmingen (Mississauga, Canada). For estimation of tetramer-positive splenocytes, cell suspensions (100 µl) were stained with allophycocyanin-conjugated antibody against CD8 (clone 53-6.7; Pharmingen) in PBS/BSA 0.1% for 25 min at 4 °C, washed, and then incubated with 1 µg PE-labeled tetramers at 37 °C for 40 min.

Cells were analyzed on a FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, California) using CELLQuest software.

#### Acknowledgments

We thank J.D. Altman for advice on the preparation of H2D<sup>b</sup>-peptide tetramers; C. Fortin for help with statistical analyses; P.M. Huet for advice on liver cell populations; P. Eden for thoughtful review of the manuscript; Compatisgene Inc. for sharing their cell culture and HPLC facilities; the CANVAC Tetramer Core Facility for a gift of plasmid clones; and J.A. Kashul for editorial assistance. Grant 011189 from the National Cancer Institute of Canada supported this work.

RECEIVED 9 JANUARY; ACCEPTED 16 MAY 2001

- Rosenberg, S.A. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* **10**, 281–287 (1999).
- Van den Eynde, B.J. & van der Bruggen, P. T cell defined tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 684–693 (1997).
- Staveley-O'Carroll, K. et al. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1178–1183 (1998).
- Lee, P.P. et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nature Med.* **5**, 677–685 (1999).
- Perreault, C., Roy, D.C. & Fortin, C. Immunodominant minor histocompatibility antigens: The major ones. *Immunol. Today* **19**, 69–74 (1998).
- Horowitz, M.M. et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 555–562 (1990).
- Kolb, H.J. et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. *Blood* **86**, 2041–2050 (1995).
- Gale, R.P. et al. Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann. Intern. Med.* **120**, 646–652 (1994).
- Barrett, A.J. et al. Effect of nucleated marrow cell dose on relapse and survival in identical twin bone marrow transplants for leukemia. *Blood* **95**, 3323–3327 (2000).
- Collins, R.H.J. et al. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Oncol.* **15**, 433–444 (1997).
- Drobyski, W.R. et al. T-cell depletion plus salvage immunotherapy with donor leukocyte infusions as a strategy to treat chronic-phase chronic myelogenous leukemia patients undergoing HLA-identical sibling marrow transplantation. *Blood* **94**, 434–441 (1999).
- Goulmy, E. Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol. Rev.* **157**, 125–140 (1997).
- Perreault, C., Jutras, J., Roy, D.C., Filep, J.G. & Brochu, S. Identification of an immunodominant mouse minor histocompatibility antigen (MiHA). T cell response to a single dominant MiHA causes graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* **98**, 622–628 (1996).
- Pion, S., Christianson, G.J., Fontaine, P., Roopenian, D.C. & Perreault, C. Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocyte responses: explanation for the immunodominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens. *Blood* **93**, 952–962 (1999).
- Eden, P.A. et al. Biochemical and immunogenetic analysis of an immunodominant peptide (B6<sup>dom1</sup>) encoded by the classical H7 minor histocompatibility locus. *J. Immunol.* **162**, 4502–4510 (1999).
- Pion, S., Fontaine, P., Baron, C., Gyger, M. & Perreault, C. Immunodominant minor histocompatibility antigens expressed by mouse leukemic cells can serve as effective targets for T cell immunotherapy. *J. Clin. Invest.* **95**, 1561–1568 (1995).
- Johnston, J.V. et al. B7-CD28 costimulation unveils the hierarchy of tumor epitopes recognized by major histocompatibility complex class I-restricted CD8<sup>+</sup> cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **183**, 791–800 (1996).
- Roderick, T.H. & Guidi, J.N. Genetic variants and strains of the laboratory mouse. (eds. Lyon, M.F. & Searle, A.G.) 663–772 (Oxford University Press, Oxford, 1989).
- Fontaine, P., Langlais, J. & Perreault, C. Evaluation of *in vitro* cytotoxic T lymphocyte assays as a predictive test for the occurrence of graft vs host disease. *Immunogenetics* **34**, 222–226 (1991).
- Pion, S. et al. On the mechanisms of immunodominance in cytotoxic T lymphocyte responses to minor histocompatibility antigens. *Eur. J. Immunol.* **27**, 421–430 (1997).
- Ciubotariu, R. et al. Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts. *J. Clin. Invest.* **101**, 398–405 (1998).
- Korngold, R. & Sprent, J. Lethal GVHD across minor histocompatibility barriers: nature of the effector cells and role of the H-2 complex. *Immunol. Rev.* **71**, 5–29 (1983).
- Blouin, A., Bolender, R.P. & Weibel, E.R. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J. Cell Biol.* **72**, 441–455 (1977).
- Goulmy, E. et al. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* **334**, 281–285 (1996).
- Goulmy, E. Human minor histocompatibility antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 75–81 (1996).
- Griem, P. et al. Uneven tissue distribution of minor histocompatibility proteins versus peptides is caused by MHC expression. *Cell* **65**, 633–640 (1991).
- Daar, A.S., Fuggle, S.V., Fabre, J.W., Ting, A. & Morris, P.J. The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation* **38**, 287–292 (1984).
- Loveland, B. & Simpson, E. The non-MHC transplantation antigens: neither weak nor minor. *Immunol. Today* **7**, 223–229 (1986).
- Korngold, R., Leighton, C., Mobraaten, L.E. & Berger, M.A. Inter-strain graft-versus-host disease T-cell responses to immunodominant minor histocompatibility antigens. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **3**, 57–64 (1997).
- Mutis, T. et al. Feasibility of immunotherapy of relapsed leukemia with *ex vivo*-generated cytotoxic T lymphocytes specific for hematopoietic system-restricted minor histocompatibility antigens. *Blood* **93**, 2336–2341 (1999).
- Franco, A. et al. Epitope affinity for MHC class I determines helper requirement for CTL priming. *Nature Immunol.* **1**, 145–150 (2000).
- Gallimore, A. et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J. Exp. Med.* **187**, 1383–1393 (1998).
- Brochu, S., Rioux-Massé, B., Roy, J., Roy, D.C. & Perreault, C. Massive activation-induced cell death of alloreactive T cells with apoptosis of bystander postthymic T cells prevents immune reconstitution in mice with graft-versus-host disease. *Blood* **94**, 390–400 (1999).
- Ku, C.C., Murakami, M., Sakamoto, A., Kappler, J. & Marrack, P. Control of homeostasis of CD8<sup>+</sup> memory T cells by opposing cytokines. *Science* **288**, 675–678 (2000).
- Dulude, G., Roy, D.C. & Perreault, C. The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis. *J. Exp. Med.* **189**, 1329–1342 (1999).
- Cheever, M.A. & Chen, W. Therapy with cultured T cells: principles revisited. *Immunol. Rev.* **157**, 177–194 (1997).
- Altman, J.D. et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **274**, 94–96 (1996).
- Crawford, F., Kozono, H., White, J., Marrack, P. & Kappler, J. Detection of antigen-specific T cells with multivalent soluble class II MHC covalent peptide complexes. *Immunity* **8**, 675–682 (1998).

**ARTICLE COMPLÉMENTAIRE**

---

**“Tissue distribution of target antigen has a decisive  
influence on the outcome of adoptive cancer  
immunotherapy”**

Blood. 2003 Jan 15;101(2):766-70.

Meunier MC, **Roy-Proulx G**, Labrecque N, Perreault C.

# Tissue distribution of target antigen has a decisive influence on the outcome of adoptive cancer immunotherapy

Marie-Christine Meunier, Guillaume Roy-Proulx, Nathalie Labrecque, and Claude Perreault

**Adoptive transfer of allogeneic T cells has unmatched efficacy to eradicate leukemic cells. We therefore sought to evaluate in kinetic terms interactions between T cells and allogeneic leukemic cells. T cells primed against the model B6<sup>dom1</sup> minor histocompatibility antigen were adoptively transferred in irradiated B10 (B6<sup>dom1</sup>-positive) and congenic B10.H7<sup>b</sup> (B6<sup>dom1</sup>-negative) recipients, some of which were also injected with EL4 leukemia/lymphoma cells (B6<sup>dom1</sup>-positive). A key finding was that the tissue distribu-**

**tion of the target epitope dramatically influenced the outcome of adoptive cancer immunotherapy. Widespread expression of B6<sup>dom1</sup> in B10 recipients induced apoptosis and dysfunction of antigen-specific T cells. Furthermore, in leukemic B10 and B10.H7<sup>b</sup> hosts, a massive accumulation of effector/memory B6<sup>dom1</sup>-specific T cells was detected in the bone marrow, the main site of EL4 cell growth. The accumulation of effector/memory cells in recipient bone marrow was EL4 dependent, and its kinetics was different**

**from that observed in recipient spleen. We conclude that strategies must be devised to prevent apoptosis of adoptively transferred T cells confronted with a high antigen load and that local monitoring of the immune response at the site of tumor growth may be mandatory for a meaningful assessment of the efficacy of adoptive immunotherapy. (Blood. 2003;101:766-770)**

© 2003 by The American Society of Hematology

## Introduction

T-cell immunosurveillance can prevent the development of several malignancies. Nevertheless, the common occurrence of neoplasia shows that cancer immunosurveillance is leaky. Not only are cancer cells commonly ignored by the immune system, they can induce anergy or deletion of tumor-reactive T cells. In addition, it has proven exceedingly difficult to elicit curative immune responses with tumor vaccines.<sup>1-3</sup> Several factors explain the disappointing results obtained in tumor vaccine trials: low immunogenicity of tumor-associated epitopes, absence of high-avidity tumor-reactive T cells in the peripheral T-cell repertoire, location of cancer cells outside the secondary lymphoid organs, and microenvironmental features in the tumor cell stroma (physical barriers, cytokines) that hinder productive interactions between T cells and cancer cells.<sup>3-7</sup>

Many drawbacks of tumor vaccines can be curtailed by the use of adoptive T-cell immunotherapy.<sup>8</sup> Indeed, the T-cell repertoire from an allogeneic donor comprises T lymphocytes that can recognize with high avidity non-self-epitopes expressed by recipient cancer cells. Furthermore, these T cells can be primed *ex vivo* against their target antigen before adoptive transfer. Injected cells can be self-major histocompatibility complex (MHC)-restricted T lymphocytes that recognize polymorphic MHC-associated peptides—that is, minor histocompatibility antigens (MiHA)—or they can be allo-MHC restricted.<sup>9-13</sup> Many clinical studies have shown that a single injection of allogeneic lymphocytes can eradicate up to 10<sup>12</sup> hematopoietic malignant cells.<sup>14-17</sup> The remarkable efficacy of adoptive T-cell immunotherapy in eradicating leukemia/lymphoma cells probably constitutes the most convincing evidence that T

lymphocytes can cure established cancer.<sup>15</sup> Moreover, recent studies suggest that the efficacy of adoptive immunotherapy can be extended to the treatment of solid tumors.<sup>18,19</sup> The use of this approach however, has been limited by the fact that unselected allogeneic T cells can recognize epitopes present on normal host cells, thereby causing graft-versus-host disease. Nevertheless, we recently showed that the injection of T cells that selectively recognize an immunodominant MiHA, B6<sup>dom1</sup>, expressed at high levels on hematopoietic cells, can eradicate malignant hematopoietic cells without causing graft-versus-host disease.<sup>20</sup> B6<sup>dom1</sup> is an H2D<sup>b</sup>-associated immunodominant peptide encoded by the *H7* locus at the telomeric end of mouse chromosome 9 that is ubiquitously expressed but is 10 times more abundant on hematopoietic than on nonhematopoietic cells.<sup>20-22</sup>

The B6<sup>dom1</sup> model is an informative paradigm for cancer immunotherapy because the desired outcome, efficient eradication of cancer cells without toxicity to the host, can be achieved relatively easily by targeting this epitope. Furthermore, the conclusions drawn by studying B6<sup>dom1</sup>-specific T-cell responses may be generally applicable because B6<sup>dom1</sup> is a natural MHC-associated peptide expressed at physiological levels rather than, for example, the product of a transfected viral gene. The aim of the present work was to evaluate in kinetic terms the interactions between adoptively transferred CD8 T cells and allogeneic cancer cells using B6<sup>dom1</sup> as a model target antigen. More specifically, we asked the following questions: (1) What is the level and duration of B6<sup>dom1</sup>-specific T-cell expansion following adoptive transfer to cancer-bearing mice? (2) What is the pace of cancer cell eradication? These

From the Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, PQ, Canada.

Submitted April 4, 2002; accepted August 11, 2002. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, August 22, 2002; DOI 10.1182/blood-2002-04-1032.

Supported by the National Cancer Institute of Canada and the Canadian Network for Vaccines and Immunotherapeutics of Cancer and Chronic Viral Diseases (CANVAC).

**Reprints:** Claude Perreault, Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, 5415 de l'Assomption Blvd, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4; e-mail: [REDACTED]

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2003 by The American Society of Hematology

questions address important issues related to our understanding of how T-lymphocyte responses against cancer cells compare with those against microbial pathogens.

## Materials and methods

### Mice

B10.C-H7<sup>b</sup>(47N)/Sn (B10.H7<sup>b</sup>) and C57BL/10J (B10) mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and were bred at the Guy-Bernier Research Center.

### Tumor cells

The EL4 leukemia/lymphoma cell line (of C57BL/6 origin) was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and was cultured in Dulbecco modified essential medium (DMEM) supplemented with 5% horse serum, penicillin–streptomycin, and L-glutamine. Because they are derived from a C57BL/6 mouse, EL4 cells differ from B10 cells at the *H9* locus, which encodes a nondominant MiHA. *H9* disparity elicits no detectable anti-EL4 response *in vivo*.<sup>20</sup>

### Cell transplantation

Recipient mice received 1200 cGy total body irradiation from a cobalt 60 source at a dose rate of 128 cGy/min on day 0, the day of transplantation. Donor bone marrow (BM) cells ( $1 \times 10^7$ ) mixed with spleen cells ( $5 \times 10^7$ ) were given as a single intravenous injection through the tail vein. Donor immunization was performed by intraperitoneal injection of  $2 \times 10^7$  splenocytes on day -14.

### Cell staining and flow cytometry

MHC class I (H2D<sup>b</sup>)/peptide (B6<sup>dom1</sup>) tetramers were produced as previously described.<sup>20</sup> The following antibodies were obtained from PharMingen (San Diego, CA): fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-V $\beta$ 12 T-cell receptor (MR11-1), FITC-labeled anti-CD44 (Pgp-1, Ly-24), phycoerythrin-labeled anti-CD90.2 (Thy-1.2), allophycocyanin-labeled anti-CD4 (RM4-5), and anti-CD8 (53-6.7). Evaluation of apoptotic cells was performed by staining with FITC–Annexin V (PharMingen) as described.<sup>23</sup> Cells were analyzed on a FACScalibur using CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Differences between group means were tested using Student *t* test.

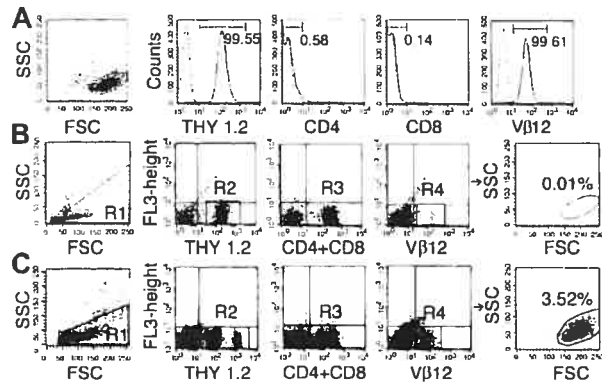
### Cytotoxicity assays

Direct cytotoxic activity was assessed by measuring [<sup>3</sup>H]thymidine release from EL4 target cells as described by Barry et al.<sup>24</sup> Effectors were splenocytes harvested on day 15 after allogeneic hematopoietic cell transplantation (AHCT) and enriched in CD8 T cells by depletion of CD4 and B cells using anti-CD4 and anti-B220 MACS beads (Miltenyi Biotech, Auburn, CA).

## Results

### Phenotype of EL4 cells

EL4 cells were observed *in vivo* by staining with antibodies against Thy1.2, T-cell receptor (TCR) V $\beta$ 12, CD4, and CD8 because we found that EL4 cells were uniformly Thy1.2<sup>+</sup> TCR V $\beta$ 12<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> (Figure 1A) and that the proportion of cells with this phenotype in the BM, lymph nodes, and spleen of normal mice was 0.02% or less (Figure 1B).

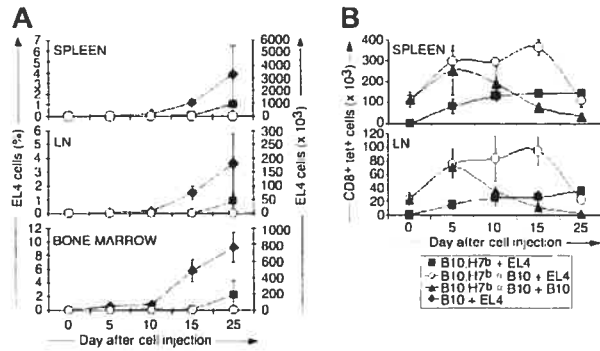


**Figure 1. Phenotype of EL4 cells.** (A) Flow cytometry analysis of *in vitro*-grown EL4 cells stained with monoclonal antibody against Thy1.2, CD4, CD8, and TCR V $\beta$ 12. Numbers in graphs correspond to the percentage of positive cells. (B) Negative control showing the virtual absence (0.01%) of Thy1.2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> V $\beta$ 12<sup>+</sup> cells in normal B10 splenocytes. (C) Detection of cells with the EL4 phenotype (3.52%) in the spleen of a B10 mouse 15 days after injection of  $10^5$  EL4. In panels B and C, cells in R1 were stained with antibodies against Thy1.2 (R2), CD4, and CD8 (R3) and V $\beta$ 12 (R4). Cells present in R1 + R2 + R3 + R4 are depicted in the rightmost panels.

### Expansion kinetics of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells and EL4 cells following intravenous injection of EL4 cells into naive and preimmunized mice

B6<sup>dom1</sup> (H7<sup>a</sup>) is expressed by EL4 and B10 cells but not by congenic B10.H7<sup>b</sup> cells. We first assessed the accumulation of EL4 cells from day 0 to 25 after intravenous injection in naive B10 and B10.H7<sup>b</sup> mice and in preimmunized B10.H7<sup>b</sup> mice (Figure 1C). In this and all further experiments, preimmunization was performed by intraperitoneal injection of  $2 \times 10^7$  B10 splenocytes on day -14. Previous studies have shown that after the intravenous injection of  $5 \times 10^5$  EL4 cells, the cancer death rates in naive B10, naive B10.H7<sup>b</sup>, and preimmunized B10.H7<sup>b</sup> mice were 100%, 80%, and 0%, respectively. The median time to death was day 25 for B10 mice and day 36 for naive B10.H7<sup>b</sup> mice.<sup>20</sup> After day 10, EL4 expanded rapidly and at a similar pace in the BM, lymph nodes, and spleen of B10 mice (Figure 2A). EL4 cells were detected only later and in lesser amounts in naive B10.H7<sup>b</sup> mice and were undetectable in immunized B10.H7<sup>b</sup> mice. Thus, anti-B6<sup>dom1</sup>-specific T-cell responses by naive mice can to some extent mitigate the expansion rate of EL4 cells, but only in B6<sup>dom1</sup>-immune mice is the accumulation of EL4 cells totally prevented.

We estimated the number of B6<sup>dom1</sup>-specific CD8 T cells at the same time points in naive and preimmunized B10.H7<sup>b</sup> mice challenged with EL4 cells (Figure 2B). In addition, a control group of preimmunized mice was reinjected with B10 cells to evaluate whether the type of cells used for challenge, neoplastic or not, influenced the T-cell response. In naive B10.H7<sup>b</sup> mice injected with EL4 cells, numbers of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells increased slowly in the spleen and lymph nodes during the first 10 days, then remained relatively unchanged to day 25. This kinetics of expansion of antigen-specific CD8 T cells in naive mice was unlike the brisk expansion followed by rapid decline after days 5 to 10 typically seen during the course of acute viral and bacterial infections.<sup>25</sup> Expansion of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells was more rapid and extensive in preimmunized than in naive mice. Interestingly, its duration was considerably prolonged when the cells injected on day 0 were EL4 rather than B10. The latter point indicates that the elimination of rapidly proliferating neoplastic cells is more demanding for the immune system than the elimination of normal cells.



**Figure 2.** Analysis of the expansion kinetics of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells and EL4 cells after intravenous injection of EL4 cells into naive and immunized mice. B10 and B10.H7<sup>b</sup> mice were injected intravenously with  $5 \times 10^5$  EL4 cells or B10 splenocytes on day 0 (+EL4 and +B10, respectively). B10.H7<sup>b</sup> recipients were either naive or preimmunized with  $2 \times 10^7$  B10 splenocytes ( $\alpha$ B10) intraperitoneally on day -14. (A) Number of EL4 cells (Thy1.2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>V $\beta$ 12<sup>-</sup>) present in the spleen, inguinal lymph nodes, and BM (2 tibiae and femurs). Naive versus preimmunized mice:  $P = .04$  for spleen and lymph node, and  $P = .007$  for bone marrow on day 25. (B) Number of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells (CD8<sup>+</sup>tet<sup>+</sup>) in the spleen and inguinal lymph nodes. Primed mice challenged with EL4 versus B10 cells:  $P = .004$  on day 15. Results are depicted as the mean  $\pm$  SD of 3 mice per group.

#### Expansion kinetics of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells and EL4 cells after adoptive T-cell transfer in B10 and B10.H7<sup>b</sup> hosts

In the next series of experiments, BM cells and splenocytes from preimmunized B10.H7<sup>b</sup> donors were injected into irradiated B10 or B10.H7<sup>b</sup> hosts to address the following questions: (1) Can adoptively transferred T cells respond to EL4 cells with the same efficacy as do normal mouse T cells? (2) How does the tissue distribution of the target antigen, here B6<sup>dom1</sup>, influence the outcome of adoptive immunotherapy? Previous studies have shown that all B10 recipients of a B10 graft die of leukemia by day 40; in contrast, when the donor is a B10.H7<sup>b</sup> mouse preimmunized against B6<sup>dom1</sup>, the leukemia death rate is 40% and 0% for B10 and B10.H7<sup>b</sup> recipients, respectively.<sup>20</sup> Consistent with survival data, EL4 cells expanded rapidly in recipients of B10 cells and accumulated more slowly and to lower levels in B10 recipients of a preimmunized B10.H7<sup>b</sup> donor (Figure 3A;  $P < .05$ ). In contrast, EL4 cells remained undetectable in B10.H7<sup>b</sup> recipients of a preimmunized B10.H7<sup>b</sup> donor ( $P < .005$ ; B10.H7<sup>b</sup> vs B10 recipients). Of note, the geography of EL4 cell accumulation in irradiated recipients (Figure 3A) was different from the geography observed in mice that did not undergo transplantation (Figure 2A). This can be illustrated by comparing B10 mice that did not undergo transplantation with irradiated B10 recipients of B10 transplanted allogeneic hematopoietic cells. On day 25, the absolute number of EL4 cells in the group that underwent transplantation compared with the group that did not was increased 2 times in BM but decreased 10 times in spleen (Figures 2A, 3A). Lymph nodes of recipients of transplanted cells were too hypocellular for study.

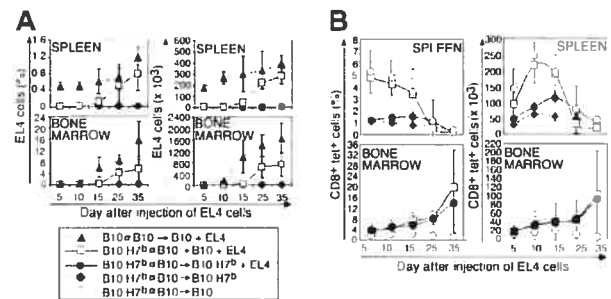
The key finding concerned the kinetics of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells in B10 compared with B10.H7<sup>b</sup> recipients of B10.H7<sup>b</sup> donors preimmunized with B10 cells. In B10.H7<sup>b</sup> hosts injected with EL4 cells, the number of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells in the spleen reached a peak of approximately  $120 \times 10^3$  on day 15 and decreased progressively thereafter (Figure 3B). This was significantly ( $P < .05$ ), though not exceedingly, superior to the levels observed in B10.H7<sup>b</sup> controls not receiving EL4 cells and in which the accumulation of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells was attributed solely to homeostatic expansion. Strikingly, expansion of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells was more rapid and extensive in B10 recipients, in which it

reached a zenith of approximately  $225 \times 10^3$ /spleen on day 10 ( $P < .005$ ). However, this accumulation decreased abruptly thereafter so that the number of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells on day 25 was lower in B10 than in B10.H7<sup>b</sup> recipients.

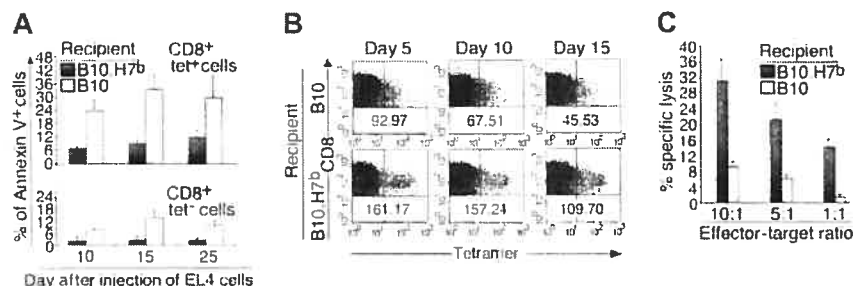
Because the BM was a preferential site of growth of EL4 cells in mice that underwent irradiation and transplantation, we estimated BM infiltration by B6<sup>dom1</sup>-specific T cells. Accumulation of tetramer<sup>+</sup> cells in the BM did not follow the same course as in the spleen (Figure 3B). Indeed, BM infiltration by B6<sup>dom1</sup>-specific T cells was seen only in recipients injected with EL4 cells. In the absence of EL4 cells, no accumulation of tetramer<sup>+</sup> cells was found in B10 hosts even though B6<sup>dom1</sup> expression is practically ubiquitous in these mice. Consistent with this, the genotype of the EL4 injected hosts, B10 versus B10.H7<sup>b</sup> (that is, bearing B6<sup>dom1</sup> or not on nonneoplastic cells), had no influence on the number of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells found in the BM. Moreover, though it started later than it did in the spleen, the accumulation of tetramer<sup>+</sup> T cells in the BM increased steadily over the observation period so that by day 35, tetramer<sup>+</sup> T cells were more numerous in the BM than in the spleen.

We next assessed by Annexin V staining the rate of apoptosis because it determines, in conjunction with the mitotic rate, the kinetics of T-cell accumulation. At all time points, the proportion of apoptotic B6<sup>dom1</sup> tetramer<sup>+</sup> T cells showed a dramatic increase in B10 compared with B10.H7<sup>b</sup> hosts (Figure 4A). Thus, on day 15, approximately 34% of tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells were Annexin V<sup>+</sup> in B10 hosts, but the rate was only approximately 10% in B10.H7<sup>b</sup> hosts ( $P < .005$ ). B10 recipients also presented a mild but significant increase in the proportion of Annexin V<sup>+</sup> elements among tetramer<sup>-</sup> CD8 T cells ( $P = .01$ ); this is consistent with the previous demonstration that host-reactive CD8 T cells that undergo activation-induced cell death (AICD) also induce bystander apoptosis of other (non-host-reactive) donor-derived T cells.<sup>23</sup> Activated T cells down-modulate their TCR. The extent of this down-modulation is correlated with the strength of the TCR signal and is most pronounced in T cells confronted with a highly abundant epitope.<sup>25</sup> In accordance with this, mean fluorescence intensity of B6<sup>dom1</sup> tetramer labeling was remarkably decreased in B10 compared with B10.H7<sup>b</sup> hosts (Figure 4B); this was true for both Annexin V-positive and -negative tetramer<sup>+</sup> T cells (Table 1).

Antigen-driven T-cell expansion is not synonymous with protective immunity. Accumulating evidence indicates that antigen-specific CD8 T cells may expand considerably in vivo yet show defective effector activity.<sup>26</sup> We therefore compared the cytotoxic



**Figure 3.** Analysis of the expansion kinetics of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells and EL4 cells following adoptive T-cell transfer in B10 and B10.H7<sup>b</sup> hosts. BM cells ( $10^7$ ) and spleen cells ( $5 \times 10^7$ ) from donors preimmunized with B10 splenocytes on day -14 were injected into irradiated (10 Gy) B10 or B10.H7<sup>b</sup> recipients on day 0. Some groups were injected with  $5 \times 10^5$  EL4 cells on day +1 (+EL4). (A) Proportion and absolute number of EL4 cells found in recipient spleen and BM (2 tibiae and femurs). (B) Proportion and absolute number of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells in recipient spleen and BM. Results are depicted as the mean  $\pm$  SD of 3 mice per group.



**Figure 4. Apoptosis rate and cytotoxic activity of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells in B10 versus B10.H7<sup>b</sup> hosts.** BM cells ( $10^7$ ) and spleen cells ( $5 \times 10^7$ ) from B10.H7<sup>b</sup> donors preimmunized with B10 splenocytes on day -14 were injected into irradiated (10 Gy) B10 or B10.H7<sup>b</sup> recipients on day 0. Recipients were injected with  $5 \times 10^4$  EL4 cells on day +1. (A) Proportion of Annexin V<sup>+</sup> cells among tetramer<sup>+</sup> and tetramer<sup>-</sup> CD8 T cells from B10 and B10.H7<sup>b</sup> recipients. (B) Tetramer staining of CD8 T cells from B10 and B10.H7<sup>b</sup> mice; numbers indicate the mean fluorescence intensity of tetramer<sup>+</sup> cells. (C) Direct cytotoxic activity of CD8 T cells harvested on day 15 after AHCT. Spleen CD8 T cells were enriched by negative depletion of B and CD4 lymphocytes and were cultured for 6 hours at various effector-to-target ratios with [<sup>3</sup>H]thymidine-labeled EL4 cells (3 mice per group).

activity of freshly harvested CD8 T cells from B10 and B10.H7<sup>b</sup> recipients. On day 15, CD8 splenocytes were directly assayed for cytotoxic activity (<sup>3</sup>H]thymidine release) against EL4 cells (Figure 4C). The nature of the host had a dramatic influence on anti-EL4 effector function: strong cytotoxicity was observed with CD8 T cells from B10.H7<sup>b</sup> hosts but not from B10 hosts ( $P = .02$ ).

## Discussion

The crucial point emerging from this work is that the tissue distribution of target antigen, here B6<sup>dom1</sup>, has a profound influence on the outcome of adoptive T-cell immunotherapy. When B6<sup>dom1</sup>-primed T cells were injected into recipients (B10.H7<sup>b</sup>) in which B6<sup>dom1</sup> was present only on EL4 cancer cells, B6<sup>dom1</sup>-specific T cells expanded to reach a peak in host spleen on day 15 and progressively declined thereafter, displayed direct cytotoxic activity, and completely eliminated EL4 cells. In contrast, when B6<sup>dom1</sup> was ubiquitously expressed (B10 hosts), B6<sup>dom1</sup>-specific T cells proliferated more extensively but showed poor effector function, underwent major AICD, and were less effective at eradicating EL4 cells. These data explain why the EL4 cure rate is 100% in B10.H7<sup>b</sup> hosts but only 60% in B10 hosts.<sup>20</sup> Moreover, this correlation between antigen load and the fate of injected T cells is strikingly similar to what is observed with T-cell response to the lymphocytic choriomeningitis virus.<sup>25</sup> Thus, the risk for AICD after adoptive immunotherapy must be taken into account whether the target antigen is a viral epitope or an endogenous host MHC class I-associated peptide (the immunodominant B6<sup>dom1</sup> MiHA in our model). As a corollary, our finding that overstimulated donor-derived T cells can become dysfunctional implies that assessing the level of protection afforded by adoptive cancer immunotherapy will probably require combined phenotypic and functional analyses of antigen-specific T cells.

Our data demonstrate that in cancer treatment, the pitfalls inherent in adoptive immunotherapy differ from those associated with vaccination. Thus, following vaccination with tumor-associated antigens, the strength of the immune response increases in parallel with antigen dose, and AICD is not an issue.<sup>27</sup> Because tumor-associated antigens elicit mainly low-avidity T cells, the efficacy of tumor vaccines is limited by poor immunogenicity rather than AICD. The notion that AICD is a possible outcome of adoptive cancer immunotherapy has several implications. Thus, the fact that alloreactive T cells can become hyporesponsive and disappear subsequent to AICD would explain a well-recognized paradox: malignancies relapsing after AHCT remain sensitive to

donor anti-host CTLs in vitro and can be successfully treated with reinjection of lymphocytes from the original donor.<sup>14,17,28</sup> Based on our work, we speculate that most leukemic relapses are caused by the disappearance of effector/memory T cells rather than by the emergence of resistant neoplastic cells. How long adoptively transferred T cells must persist to achieve cancer cure has yet to be determined.<sup>28,29</sup> Nevertheless, because some cancers relapse months to years after AHCT, continuous remission may require long-term persistence of memory T cells. Further studies will be required to assess the expression profile of immunodominant human MiHAs and to what extent these antigens can induce AICD of adoptively transferred T cells. One inference from the present work is that when adoptive immunotherapy is targeted to an abundant and widely expressed antigen, strategies will have to be developed to prolong the survival of donor T cells. In additional studies we intend to evaluate whether this might be achieved by increasing the supply of cytokines such as interleukin-7 (IL-7) or IL-15.<sup>30-33</sup> When possible, it may be preferable to target epitopes with a limited tissue distribution.

Although EL4 cells accumulated chiefly in the secondary lymphoid organs in mice that did not undergo transplantation, the main site of EL4 cell growth was the BM in mice that underwent transplantation and irradiation. A plausible explanation is that because irradiation induces damage to the stroma of secondary lymphoid organs (for example, microvascular occlusions) that impede the homing of lymphoid cells to the lymph nodes,<sup>34</sup> EL4 cells seed and proliferate in the BM of irradiated hosts. We therefore asked whether significant numbers of adoptively transferred B6<sup>dom1</sup>-specific T cells would be able to reach the site harboring the greatest cancer burden, the BM. The key findings in BM were that B6<sup>dom1</sup>-specific T cells accumulated to unexpectedly high levels, with kinetics entirely different from kinetics in the spleen, and that, surprisingly, this accumulation was EL4 dependent. It has been shown that after viral infection, effector/memory CD8 T cells emigrate from secondary lymphoid organs and disseminate widely in nonlymphoid organs, such as the BM, in which the virus does not replicate.<sup>35,36</sup> Could the presence of high numbers of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells in the BM of irradiated leukemic recipients result solely from random migration of effector/memory T cells? Two findings strongly argue against this. First, when T cells primed in secondary lymphoid organs accumulate in other organs simply because of random dissemination, the kinetics of T-cell accumulation and disappearance is similar in lymphoid and nonlymphoid organs.<sup>36,37</sup> This was clearly not the case in our study. Here the accumulation of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells in the BM started later but lasted longer than in the spleen (Figure 3B). Second, and

**Table 1. Mean tetramer staining intensity of Annexin V<sup>+</sup> and Annexin V<sup>-</sup> tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells**

Recipient	Annexin V	Days after injection of EL4 cells		
		5	10	15
B10	Positive	61 ± 9	57 ± 8	43 ± 3
	Negative	104 ± 9	74 ± 4	70 ± 7
B10.H7 <sup>p</sup>	Positive	81 ± 15	105 ± 15	67 ± 8
	Negative	193 ± 60	150 ± 38	104 ± 8

of special significance, though B6<sup>dom1</sup> is expressed by hematopoietic and nonhematopoietic cells of all tissues and organs of B10 mice,<sup>20,21</sup> only when these recipients were injected with EL4 cells did B6<sup>dom1</sup>-specific T cells accumulate in the BM (Figure 3B). This is notably different from what was seen in the spleen, where the expansion of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells was influenced more by the presence of B6<sup>dom1</sup> on normal host cells than by the presence or absence of EL4 cells. These data strongly suggest that T cells expanded in the BM because EL4 cells, which accumulated chiefly

there, induced in situ proliferation of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells that had migrated to the BM.

In the BM of leukemic mice that underwent transplantation, the number of B6<sup>dom1</sup>-specific T cells increased over the entire observation period (35 days) without evidence of attrition. This suggests that after adoptive immunotherapy, the primary sites of tumor growth (rather than the classical secondary lymphoid organs) are the main repositories of effector/memory T cells. It will be important to determine the cause of this. Indeed, assuming its generality, this paradigm would imply that local monitoring of the immune response at the site of tumor growth may be mandatory for a meaningful assessment of the efficacy of adoptive immunotherapy.

## Acknowledgments

We thank Marie-Ève Blais and Sylvie Brochu for insightful comments and Ms J. Kashul for editorial assistance.

## References

- Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol*. 1997;9:684-693.
- Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*. 2001;411:380-384.
- Theobald M, Biggs J, Hernandez J, et al. Tolerance to p53 by A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*. 1997;185:833-841.
- Lee PP, Yee C, Savage PA, et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med*. 1999;5:677-685.
- Rosic-Kablar S, Chan K, Reis MD, Dube ID, Hough MR. Induction of tolerance to immunogenic tumor antigens associated with lymphomagenesis in HOX11 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:13300-13305.
- Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor- $\beta$  signaling in T cells. *Nat Med*. 2001;7:1118-1122.
- Ochsenbein AF, Siero S, Odermatt B, et al. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature*. 2001;411:1058-1064.
- Perreault C, Brochu S. Adoptive cancer immunotherapy: discovering the best targets. *J Mol Med*. 2002;80:212-218.
- Goulmy E. Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol Rev*. 1997;157:125-140.
- Perreault C, Roy DC, Fortin C. Immunodominant minor histocompatibility antigens: the major ones. *Immunol Today*. 1998;19:69-74.
- Stanislowski T, Voss RH, Lotz C, et al. Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer. *Nat Immunol*. 2001;2:962-970.
- Kessels HW, Wolkers MC, van den Boom MD, van Den Valk MA, Schumacher TN. Immunotherapy through TCR gene transfer. *Nat Immunol*. 2001;2:957-961.
- Warren EH, Gavin M, Greenberg PD, Riddell SR. Minor histocompatibility antigens as targets for T-cell therapy after bone marrow transplantation. *Curr Opin Hematol*. 1998;5:429-433.
- Collins RHJ, Shpilberg O, Drobyski WR, et al. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 1997;15:433-444.
- Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*. 2001;411:385-389.
- Drobyski WR, Hessner MJ, Klein JP, et al. T-cell depletion plus salvage immunotherapy with donor leukocyte infusions as a strategy to treat chronic-phase chronic myelogenous leukemia patients undergoing HLA-identical sibling marrow transplantation. *Blood*. 1999;94:434-441.
- Dazzi F, Szydlo RM, Cross NC, et al. Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96:2712-2716.
- Morecki S, Yacovlev E, Gelfand Y, Uzi I, Slavin S. Cell therapy with preimmunized effector cells mismatched for minor histocompatible antigens in the treatment of a murine mammary carcinoma. *J Immunother*. 2001;24:114-121.
- Childs R, Chernoff A, Contentin N, et al. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after non-myeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2000;343:750-758.
- Fontaine P, Roy-Proulx G, Knafo L, et al. Adoptive transfer of T lymphocytes targeted to a single immunodominant minor histocompatibility antigen eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat Med*. 2001;7:789-794.
- Eden PA, Christianson GJ, Fontaine P, et al. Biochemical and immunogenetic analysis of an immunodominant peptide (B6<sup>dom1</sup>) encoded by the classical H7 minor histocompatibility locus. *J Immunol*. 1999;162:4502-4510.
- Pion S, Christianson GJ, Fontaine P, Roopenian DC, Perreault C. Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocyte responses: explanation for the immunodominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens. *Blood*. 1999;93:952-962.
- Brochu S, Rioux-Massé B, Roy J, Roy DC, Perreault C. Massive activation-induced cell death of alloreactive T cells with apoptosis of bystander postthymic T cells prevents immune reconstitution in mice with graft-versus-host disease. *Blood*. 1999;94:390-400.
- Barry M, Heibin J, Pinkoski M, Bleackley RC. Quantitative measurement of apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes. *Methods Enzymol*. 2000;322:40-46.
- Gallimore A, Gilthero A, Godkin A, et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med*. 1998;187:1383-1393.
- Welsh RM. Assessing CD8 T cell number and dysfunction in the presence of antigen. *J Exp Med*. 2001;193:F19-F22.
- Perez-Diez A, Spiess PJ, Restifo NP, Matzinger P, Marincola FM. Intensity of the vaccine-elicited immune response determines tumor clearance. *J Immunol*. 2002;168:338-347.
- Wang J, Shaw JL, Mullen CA. Down-regulation of antihost alloreactivity after bone marrow transplant permits relapse of hematological malignancy. *Cancer Res*. 2002;62:208-212.
- Cheever MA, Chen W. Therapy with cultured T cells: principles revisited. *Immunol Rev*. 1997;157:177-194.
- Ku CC, Murakami M, Sakamoto A, Kappler J, Marrack P. Control of homeostasis of CD8<sup>+</sup> memory T cells by opposing cytokines. *Science*. 2000;288:675-678.
- Sprent J, Surh CD. T cell memory. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:551-579.
- Yajima T, Nishimura H, Ishimitsu R, et al. Overexpression of IL-15 in vivo increases antigen-driven memory CD8<sup>+</sup> T cells following a microbe exposure. *J Immunol*. 2002;168:1198-1203.
- Mackall CL, Fry TJ, Bare C, et al. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood*. 2001;97:1491-1497.
- Samlowski WE, Araneo BA, Butler MO, Fung MC, Johnson HM. Peripheral lymph node helper T-cell recovery after syngeneic bone marrow transplantation in mice prepared with either gamma-irradiation or busulfan. *Blood*. 1989;74:1436-1445.
- Marshall DR, Turner SJ, Belz GT, et al. Measuring the Diaspora for virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:6313-6318.
- Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrançois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*. 2001;291:2413-2417.
- Reinhardt RL, Khoruts A, Merica R, Zell T, Jenkins MK. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature*. 2001;401:101-105.



## TRAVAUX NON PUBLIÉS

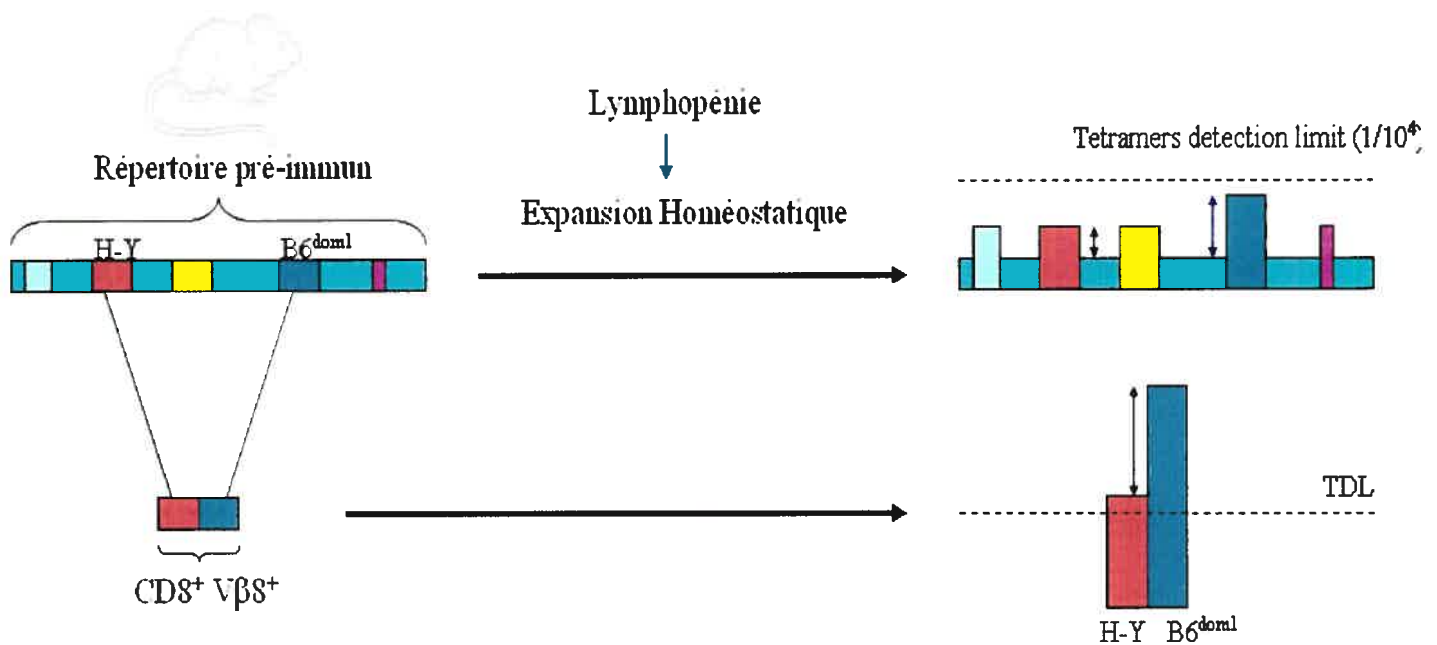
---

### *Implication de l'expansion homéostatique dans le processus d'immunodomination*

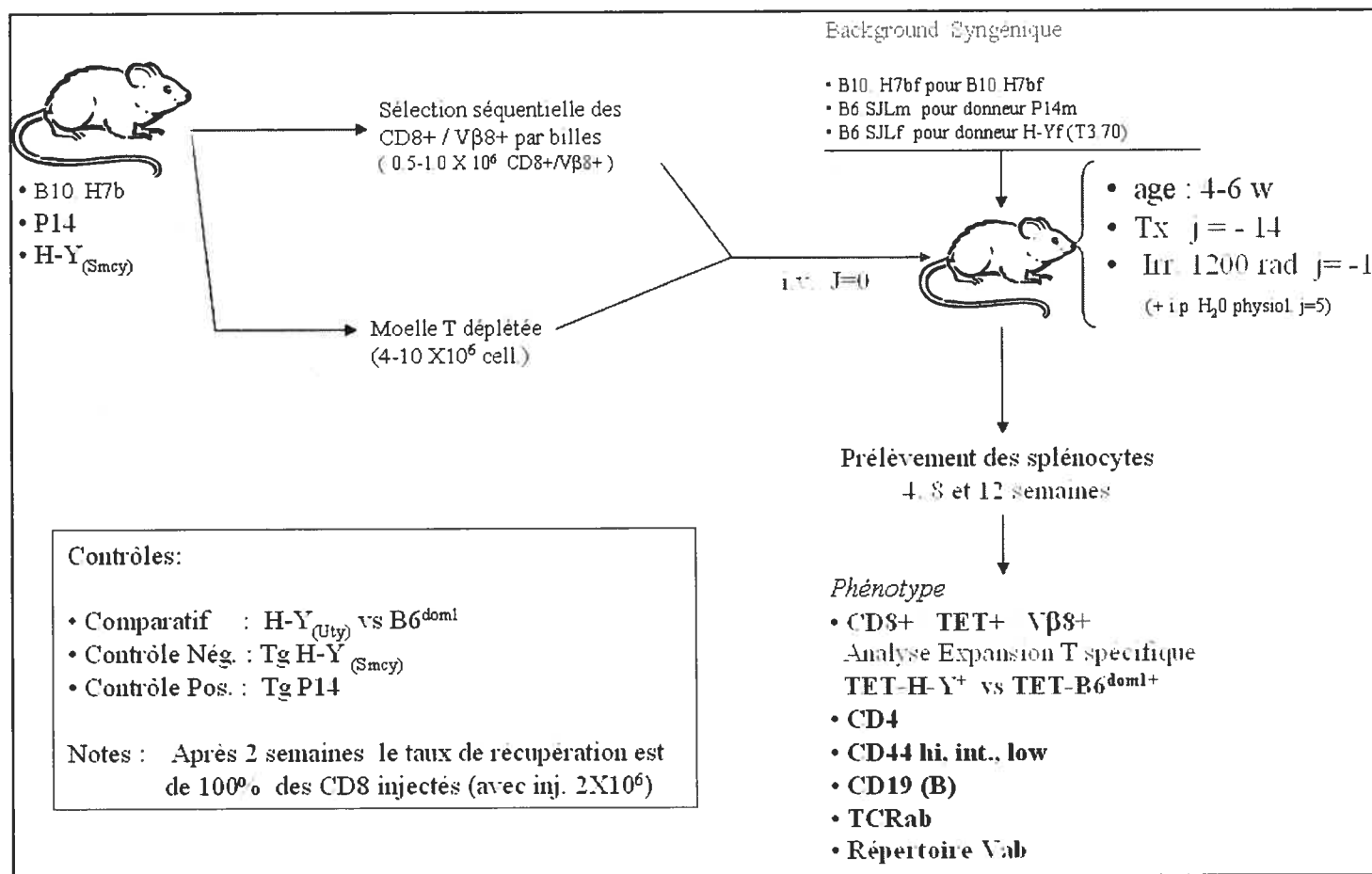
Les travaux de Ernst, B. *et al.* indiquent que les peptides qui permettent la sélection positive dans le thymus sont également impliqués dans le signal de survie destiné au maintien des cellules T CD8<sup>+104</sup>. Combiné au fait qu'une lymphopénie entraîne une expansion des cellules T CD8<sup>+</sup> résiduelles et que cette expansion peut être peptide-CMH dépendante, nous avons tenté de démontrer que les signaux reçus en périphérie et impliqués dans cette expansion homéostatique pouvaient refléter ceux qui procurent aux cellules T CD8<sup>+</sup> une stimulation suboptimale contribuant à l'activation lymphocytaire<sup>105:106</sup>. L'hypothèse alors posée proposait que les cellules T CD8<sup>+</sup> dirigées contre un épitope qui génère une réponse dominante, devraient recevoir des signaux périphériques plus importants leur procurant ainsi un avantage au niveau de l'activation vis-à-vis les cellules dirigées vers un épitope non-dominant qui recevraient quant à eux un signal périphérique plus faible.

Ainsi, l'objectif de ces travaux était de démontrer indirectement par des expansions homéostatiques différentielles et peptide-CMH spécifiques, qu'une différence dans les signaux reçus par les cellules T en périphérie peut être impliquée dans le processus d'immunodomination. Nous avons ainsi tenté de quantifier par tétramères de CMH la différence d'expansion homéostatique spécifique entre les cellules T dirigées contre H7<sup>a</sup> et celles dirigées contre HY.

Comme la limite de détection des tétramères est de  $1/10^4$  cellules, nous avons dû sélectionner uniquement les cellules T  $CD8^+ V\beta 8^+$  qui correspondent à la famille commune la plus fréquemment observée selon nos résultats sur la diversité de la réponse. Par conséquent, comme la compétition pour les ressources (cytokine, APC, Ags)<sup>104</sup> constitue un paramètre indispensable à l'expansion homéostatique ; la réduction du nombre de compétiteurs devrait favoriser une plus forte expansion, tel qu'illustré dans le schéma de la Figure 5.



**Figure 5.** Schéma de la stratégie de mise en évidence d'une expansion homéostatique CMH-peptide spécifique différentielle entre les cellules T  $CD8^+$  dirigées contre  $H7^a$  et dirigées contre HY.



**Figure 6.** Devis expérimental d'expansion homéostatique CMH-peptide spécifique.

### *Conclusions de l'expérimentation*

Comme à la fois les contrôles effectués (voir devis expérimental en Figure 6) avec les cellules Tg H-Y<sub>(Smcy)</sub> et les cellules Tg P14 n'ont respectivement pas permis d'observer une correspondance avec la littérature<sup>104</sup>, et qu'aucune expansion tétramère-H7<sup>a+</sup> ou –HY<sup>+</sup> ne fût également observée dans les groupes testés, l'ensemble des expérimentations fut abandonné sans pouvoir tirer de conclusions ou interprétations quant à l'implication de la reconnaissance du soi en périphérie et l'immunodominance, via des résultats indirects d'expansion homéostatique. Aucune solution ne fut trouvée au niveau des problèmes expérimentaux ; ainsi aucune discussion ne sera abordée sur le sujet dans ce présent document.

## DISCUSSION

---

Situés aux extrêmes de l'échelle de la dominance, nos antigènes modèles nous ont permis de comparer et de mettre en lumière les différences moléculaires et cellulaires qui influencent les processus de domination. Bien que plusieurs travaux sur l'immunodominance aient été réalisés jusqu'à maintenant, plusieurs tendent à examiner des paramètres associés à l'immunogénicité plutôt qu'aux processus de domination. Nos travaux, par contre, se sont penchés directement sur ces processus ainsi que sur la compétition interclonale qui constitue une des bases les plus solides de la dominance. D'ailleurs, les éléments clés du phénomène de domination restent associés à l'identification des facteurs qui contribuent au succès de cette compétition. Peut-être agissent-ils en synergie; ou encore s'intègrent-ils en un seul facteur ou en une seule condition?

Pour être en mesure de bien analyser les caractéristiques et différences susceptibles de nous apporter les réponses à ces questions, nous avons dû, en premier lieu, apprivoiser la technologie des tétramères de classe I, dont la synthèse avec nos épitopes modèles nous a ainsi permis d'élaborer la majorité des expérimentations relatives à nos hypothèses (Figure 1, premier article). Indispensable à la quantification précise des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques, l'émergence de cette technologie<sup>107</sup> nous a non seulement permis d'observer les premiers résultats surprenants, mais nous a également permis d'obtenir des résultats dont la précision n'avait encore aucun précédent en ce qui concerne nos deux AgMiHs modèles.

## 1. Compétition pour les APC

Les toutes premières mesures de prolifération par tétramères effectuées dans un contexte où HY et H7<sup>a</sup> étaient simultanément présentées ont d'abord permis de mettre en évidence que la domination qu'exerce la réponse à H7<sup>a</sup> sur HY implique le blocage même du processus prolifératif (Figure 2, premier article). Cette observation permet d'éliminer la possibilité que le processus de domination implique l'expansion de cellules T CD8<sup>+</sup> non-fonctionnelles<sup>26:28</sup>. Ces résultats démontrent également que le processus de domination n'implique pas un décalage prolifératif, mais bel et bien un blocage drastique dans l'activation d'autres clonotypes en compétition.

En ce qui concerne l'amplitude de prolifération, les expansions individuelles démontrées par les tétramères indiquent que les clonotypes dirigés contre l'épitope HY ont le même potentiel prolifératif que les cellules T dirigées contre H7<sup>a</sup> (Figure 2, premier article). Cette dernière observation nous a beaucoup surprise compte tenu du fait que HY est parmi les AgMiH le moins dominant et qu'on pourrait associer sous-dominance et faible amplitude.

Ainsi, en plus d'indiquer l'absence de déficience proliférative de la part de clonotypes dirigés contre l'épitope non-dominant, cette similarité remarquable au niveau de la prolifération fut aussi observée dans les expériences de transfert (Figure 3, premier article). Ces essais démontrent également qu'un apport important d'APC co-présentant H7<sup>a</sup> et HY entraîne la disparition de la dominance. Ces résultats confirment non seulement l'importance du ratio T/APC et des APC dans la domination, mais soulignent également que ce processus reflète une compétition. Ces évidences confirment d'ailleurs

d'autres résultats obtenus auparavant quant à la rivalité interclonale et sa disparition en contexte d'excès d'APC<sup>19:32:78</sup>.

Il fut encore une fois très surprenant de constater que la réponse contre HY était d'une amplitude semblable à H7<sup>a</sup> lorsque la compétition était éliminée. D'un autre côté, bien que nous n'ayons pas étudié l'expansion de cellules CD4<sup>+</sup>, il est connu que l'expression de HY est aussi associée à d'autres AgMiHs associés aux molécules de classe II du CMH et que l'aide de cellules T CD4<sup>+</sup> ne doit pas être considérée comme négligeable dans la prolifération des cellules T CD8<sup>+</sup>. Toutefois, comme nous n'avons pas d'évidence que les APC d'origines hématopoïétiques sont maintenues suite à l'irradiation par 10 Gy (Figure 3, premier article), nous supposons qu'il y a toujours aide des cellules T CD4<sup>+</sup>. Cette hypothèse provient simplement du fait que la prolifération des cellules T CD8<sup>+</sup> dirigées contre HY semble aussi équivalente à celles de cellules dirigées contre H7<sup>a</sup> dans l'expérience de transfert, que lors de l'expérience d'immunisation conjointe contre H7<sup>a</sup> et HY (Figure 2, premier article).

Il est ainsi convenu qu'un apport important d'APC puisse faire disparaître la concurrence, mais il reste qu'il ne faut pas exclure le fait que plusieurs caractéristiques associées aux APC peuvent également constituer l'enjeu de la compétition : cytokines, les molécules accessoires<sup>38</sup>, l'accès à la surface de l'APC et l'accès aux molécules qui s'y trouvent<sup>32</sup>. D'ailleurs, en ce qui concerne l'accès des clonotypes aux APC, les images prises par Bousso *et al.* montrent bien que la surface d'une APC peut être relativement achalandée<sup>108</sup>. Toutefois, il reste que cette situation fut observée dans un contexte impliquant une forte quantité de clonotypes.

Pour ma part, je crois que dans un contexte où la quantité de cellules T est physiologiquement normale, il semble peu probable qu'un engorgement à la surface des APC puisse nuire à l'accès aux épitopes. D'ailleurs, les clones naïfs circulent en périphérie et entrent dans les organes lymphoïdes de façon asynchrone, limitant cette possibilité<sup>109</sup>. Ce phénomène est d'autant plus improbable que la relation physique des lymphocytes avec les APC est dynamique et que de brèves rencontres peuvent suffire pour entraîner le développement d'une réponse cytotoxique<sup>108:110</sup>. Il est aussi important de considérer que la rencontre d'un clonotype avec son épitope respectif est un événement aléatoire et rare, compte tenu de la très faible fréquence de clonotypes naïfs en circulation<sup>109:111</sup>.

D'autre part, des études sur l'influence de la fréquence de précurseurs dans le processus de dominance, comme ceux réalisés par Thatcher ont mené les auteurs à suggérer que ce processus prendrait forme dans la monopolisation de l'accès physique aux APC ou au niveau d'autres ressources (cytokines, molécules de surface)<sup>72</sup>. La population surnuméraire serait statistiquement ainsi avantagée. Serait-ce le cas dans notre modèle ?

## 2. Influence de la fréquence de précurseurs

La contribution de la fréquence de précurseurs dans le processus de domination demeure équivoque. Pour éclaircir le rôle de ce facteur dans notre modèle, nous avons mesuré la fréquence de clonotypes naïfs par l'utilisation d'une technique de dilution

limite qui implique une identification directe par tétramères ce qui la rends plus précise que celles précédemment utilisée et basées sur la mesure de cytotoxicité<sup>112</sup>.

Malgré la domination qu'exerce la réponse de H7<sup>a</sup> sur celle dirigée contre HY, aucune différence significative ne fut observée entre les fréquences de clonotypes naïfs anti-HY et -H7<sup>a</sup> (Figure 1, second article). La domination de H7<sup>a</sup> sur HY n'implique pas un nombre de précurseurs naïfs plus important envers H7<sup>a</sup>. Toutefois, il est légitime de s'interroger sur la dichotomie qui existe entre nos évidences expérimentales et d'autres études aux conclusions inverses, comme il est d'ailleurs aussi pertinent de s'interroger sur les nombreuses contradictions que présentent les différentes conclusions d'études à ce sujet.

Il est intéressant de noter que, tout d'abord, parmi les études qui ont examiné ce facteur, celles qui ont procédé expérimentalement par transfert clonotypique ont, pour la plupart, conclu que la fréquence de précurseurs n'avait pas d'implications significatives dans les processus menant à la dominance<sup>34:35:76-78</sup>. Par contre, des conclusions inverses ont été obtenues dans les quelques rares cas physiologiques normaux (sans transfert) tel que dans les cas de la dominance de Melan-A, H60 ou encore HEL<sub>85</sub> (bien pour ce dernier épitope, les comparaisons sont effectuées avec une lignée de souris transgéniques)<sup>52:72:74:75</sup>. Parmi ces derniers travaux, il est toutefois important de considérer que pour H60, le processus de domination est complètement dépendant de l'aide que procure les cellules T CD4<sup>+</sup> et que même un surnombre de départ (1/20 000



CD8<sup>+</sup>) peut être inapte à générer une réponse dominante<sup>52</sup>. Melan-A est en fait le seul épitope connu dont la fréquence de précurseurs puisse justifier sa dominance.

Il est ainsi possible que la fréquence soit un facteur influençant significativement la rivalité interclonale uniquement dans un contexte physiologique normal, mais dont la fréquence de précurseurs en question serait extrême. D'ailleurs, bien qu'impliquant des T mémoires, une étude de l'influence des CTL préexistants sur l'efficacité des vaccins a conclu qu'en général, la fréquence de précurseurs n'a que très peu d'influence sur le processus de domination, mais que cette influence pouvait tout de même prendre forme à de très hautes fréquences<sup>113</sup>. Les auteurs de ces travaux suggèrent que le recrutement massif et non-spécifique des complexes CMH-peptide aux nombreuses synapses entraînerait un déséquilibre concurrentiel<sup>113</sup>. Dans le même ordre d'idée, il fut démontré chez les cellules CD4<sup>+</sup> qu'une très forte expansion spécifique endogène (près de 50% des CD4<sup>+</sup>) pouvait littéralement bloquer l'expansion de cellules spécifiques adoptivement transférées<sup>114</sup>. Les auteurs suggèrent que l'implication d'une fréquence très élevée de cellules spécifiques bloque l'accès aux APC ou autres ressources permettant l'activation des autres clonotypes.

D'un autre point de vue, Bousso *et al.* et Kourilsky *et al.* ont non seulement suggéré que la dominance ne serait pas issue du nombre de clonotypes recrutés, mais serait plutôt relative à l'expansion d'un ou deux clonotypes, n'accordant pas d'importance à un grand nombre de cellules naïves au départ. Cependant, ils ont également suggéré qu'une augmentation de la fréquence de précurseurs pourrait être

favorable aux rencontres et, selon le principe « *premier arrivé, premier servi* », pourrait favoriser l'activation et la prolifération d'une population plutôt qu'une autre et ainsi dicter la hiérarchie de dominance<sup>115:116</sup>.

Ainsi, bien qu'un nombre de départ plus élevé puisse logiquement sembler favoriser l'expansion d'une population cellulaire plutôt qu'une autre, ce concept ne s'applique pas à nos épitopes modèles, mais indique par contre que le processus en question implique possiblement une vitesse d'expansion plus rapide ou encore un développement fonctionnel plus rapide ou efficace.

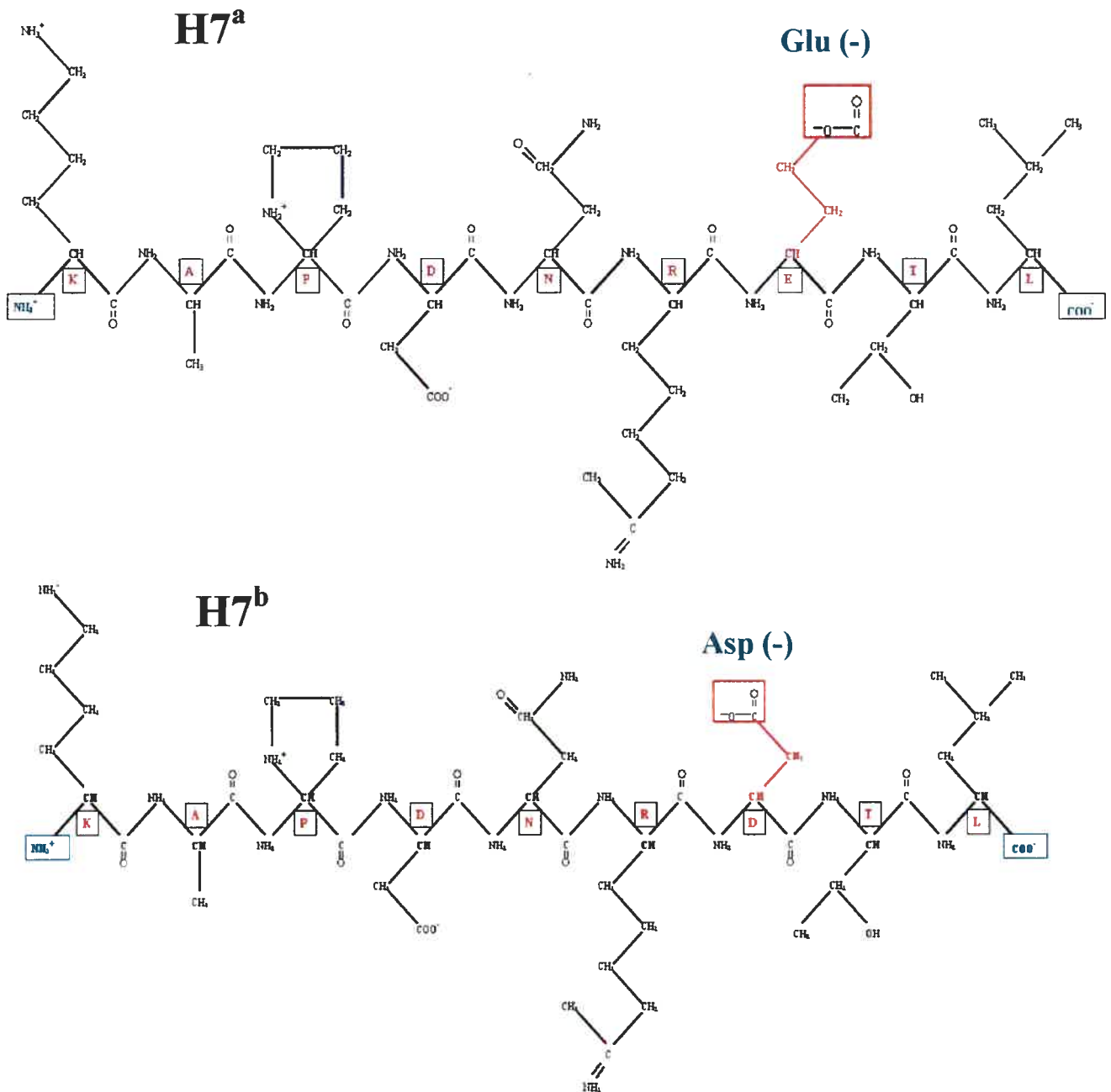
Pour ma part, je crois qu'il est important de garder à l'esprit que ce n'est seulement que dans de très rares cas, qu'une fréquence de précurseurs puisse déterminer l'issue de la dominance. Personnellement je crois que la fréquence de précurseur ne devrait plus être associée aux paramètres pouvant influencer le phénomène physiologique d'immunodominance et nous devrions dans ce cas faire référence à l'influence qu'une anomalie de répertoire peut avoir vis-à-vis les autres réponses impliquées. D'ailleurs, comme mentionné plus haut, ces cas sont souvent d'origine artificielle et non physiologique. Dans les rares cas physiologiques, bien qu'il est indispensable de démontrer la nature naïve des cellules impliquées, il reste qu'on peut se poser de sérieuses questions quant aux facteurs pouvant générer un répertoire comportant de telles anomalies.

### 3. Influence de la diversité du répertoire

La relation entre la diversité d'un répertoire et l'efficacité d'une réponse est complexe. L'élaboration du répertoire peut ainsi occuper une place imposante dans les processus de domination. D'ailleurs, relativement aux mécanismes de sélection, c'est l'identification de H7<sup>b</sup> (KAPDNRDTL)<sup>101</sup> (produit allélique de H7<sup>a</sup> (KAPDNRETL)) qui entraîna notre deuxième série de travaux. En effet, la dominance de H7<sup>a</sup> devait, selon le modèle de « *sélection-avidité* »<sup>76</sup>, être le fruit de l'absence d'expression d'un produit allélique. Or, la présence H7<sup>b</sup>, produit allélique exprimé en périphérie et fortement analogue à H7<sup>a</sup> (Figure 7, thèse) est paradoxale à un répertoire hautement diversifié<sup>117</sup>, ainsi qu'au statut de déterminant dominant.

En effet, comme le prétend le modèle de Choi *et al.*<sup>76</sup>, la dominance d'un épitope serait due à la grande diversité du répertoire qui lui est spécifique et suppose que l'expression d'un peptide du soi, hautement analogue à l'antigène donné entraîne une forte sélection négative limitant la diversité du répertoire et ayant comme conséquence de générer une réponse non-dominante. Ainsi, le paradoxe concernant la dominance de H7<sup>a</sup> et la présence de H7<sup>b</sup> nous a fortement poussé à décrypter définitivement la diversité du répertoire spécifique à H7<sup>a</sup> pour enfin être fixé sur la question.

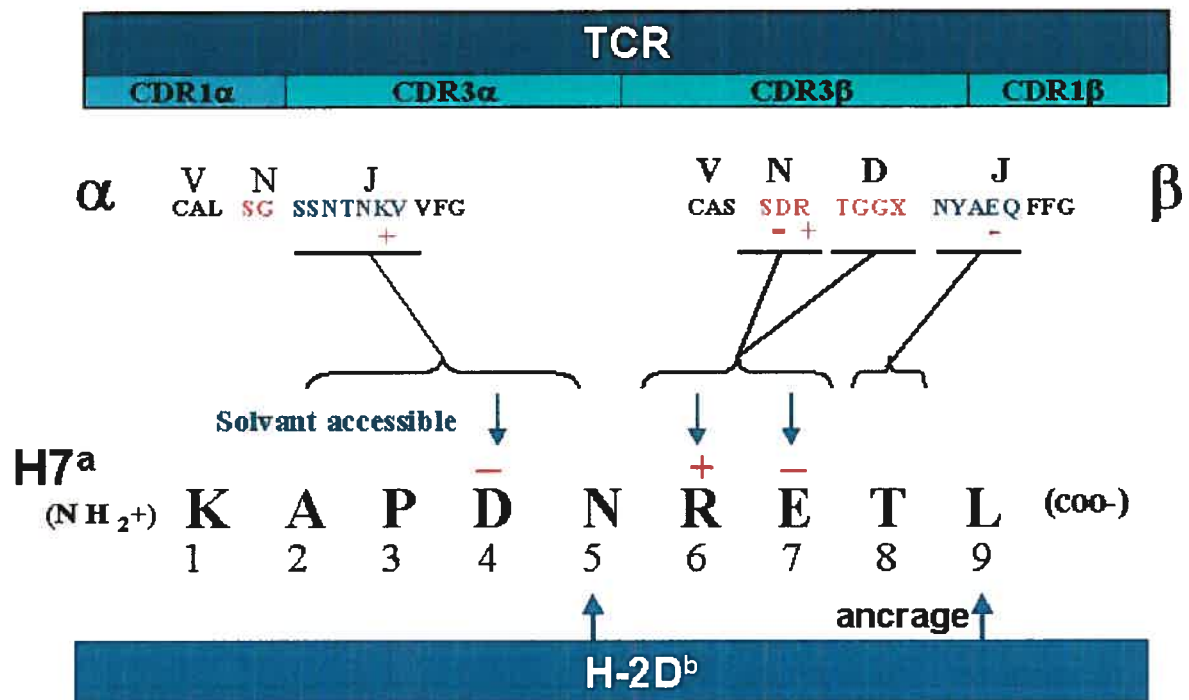
Bien que le modèle de Choi *et al.*<sup>76</sup> ait prédit un répertoire hautement diversifié pour H7<sup>a</sup> à cause de l'expression de H7<sup>b</sup>, l'analyse des familles de chaînes V $\alpha$  et V $\beta$  des TCR impliquées a révélé un nombre très restreint ainsi qu'une forte redondance d'utilisation des chaînes des familles V $\alpha$ 8 et V $\beta$ 8 (Figure 3, second article). Toutefois, l'implication d'une famille de chaînes en particulier n'est que l'indicateur d'un certain niveau d'oligoclonalité.



**Figure 7.** Structure (*backbone*) de H7<sup>a</sup> et de son allèle H7<sup>b</sup> se différenciant par un changement en P7 d'un résidu d'acide par glutamique pour un résidu d'acide aspartique se traduisant par une différence d'un groupement méthylène.

L'analyse des régions hypervariables nous a, quant à elle, démontré l'étroite diversité de la réponse à H7<sup>a</sup> (Table I, second article). En effet, la réponse à H7<sup>a</sup> implique non seulement un nombre très limité de régions CDR3 pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , mais implique également une forte analogie de séquences parmi les régions CDR3  $\beta$  entre elles (Table I, second article).

Nos analyses des régions hypervariables des TCR spécifiques à H7<sup>a</sup> ont démontré l'implication de seulement deux groupes de séquences CDR3 au niveau de la chaîne  $\alpha$  et d'un seul au niveau de la chaîne  $\beta$ .



**Figure 8.** Schéma proposé de l'interface et des interactions probables du TCR consensus et spécifique au ligand H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup>.

Le groupe de séquences de la chaîne  $\beta$  présente d'ailleurs une très forte analogie au niveau de la séquence des résidus, de la longueur de la région, des segments de jonction(J)/diversité(D) ainsi que des charges des résidus impliqués (Table I, second article). L'homologie des séquences nous a mené à mettre en évidence non seulement l'existence, pour H7<sup>a</sup>, d'une séquence consensus au niveau de la chaîne  $\beta$ , mais aussi le caractère public de ce TCR hautement conservé. Cette séquence consensuelle nous a également permis d'établir une ébauche de l'interface de reconnaissance avec H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup> ainsi que la correspondance des charges impliquées (Figure 8).

Cette restriction extrême du répertoire répondant à H7<sup>a</sup> représente à mon avis une preuve ferme de l'implication d'une sélection négative sévère de la part du peptide allélique et représente un superbe exemple que l'efficacité d'une réponse immune peut reposer uniquement sur la présence d'une quantité limitée de clones circulants en périphérie. Néanmoins, le fait que ce système de défense ne repose que sur si peu de clonotypes représente sans aucun doute un risque très élevé pour l'hôte, autant dans la cas d'évasion immune, de délétion clonotypique ou tout autres situations limitant l'activation des clones les plus performants.

Bien que l'expression d'un produit allélique entraînant une forte sélection négative semble être l'explication la plus probable de la restriction importante du répertoire à H7<sup>a</sup>, d'autres cas de diversité limitée impliquent d'autres mécanismes que nous ne pouvons exclure. En effet, l'emploi d'un nombre aussi restreint de séquences de TCR pourraient être également expliqué par une production thymique préférentielle,

comme dans le cas de Melan-A<sup>118</sup> ou encore par un biais lors du réarrangement des différents segments lors des événements de recombinaison menant au TCR<sup>119</sup>. Toutefois, cette dernière possibilité peut être mise de côté, compte tenu que plusieurs codons différents composent des régions CDR3 identiques. Cette redondance dans les séquences en acides aminés suggère ainsi davantage une restriction structurale particulière<sup>119</sup>. Les causes fondamentales de la restriction à H7<sup>a</sup> resteront à décrire.

### **3.1. TCR hautement conservé et réactivité**

La diversité extrêmement limitée de la réponse à H7<sup>a</sup> et l'expression d'un produit allélique hautement analogue tel que H7<sup>b</sup> s'accordent avec la concept qu'une forte analogie entre un épitope et son produit allélique puisse impliquer une forte sélection négative et limiter la diversité du répertoire en question<sup>120</sup>.

Bien que le modèle de « *sélection-avidité* » s'accorde avec les travaux de Messaoudi<sup>84</sup> qui indiquent que des répertoires plus diversifiés impliqueraient des T répondant plus efficacement, nos résultats démontrent qu'une grande diversité n'est pas nécessaire à la génération de réponses immunodominantes et efficaces. D'ailleurs, la réponse à H7<sup>a</sup> a démontré sa remarquable efficacité par l'éradication de cellules néoplasiques hautement agressives<sup>121</sup>. De plus, cette réponse dominante génère en moyenne une population spécifique de près de 5 % des CD8<sup>+</sup> (au sommet de la réponse : 14 jours post-immunisation) (Figure 2, premier article). Cette observation montre que la diversité très restreinte de clonotypes spécifiques H7<sup>a</sup> est capable d'une expansion

clonale remarquable. Cette dernière est d'autant plus impressionnante qu'elle n'est pas générée à partir d'un nombre élevé de clones au départ.

Malgré le fait que le modèle de Choi *et al.*<sup>76</sup> postule une probabilité plus élevée de retrouver des cellules optimales dans un *grand* « échantillon » (*grande* diversité), il n'est pas exclu (et il pourrait même être très intéressant de proposer) que certains « échantillons », dont ceux spécifiques à H7<sup>a</sup>, puissent être composés presque essentiellement de cellules présentant des caractéristiques optimales de reconnaissance (affinité, avidité) ou d'activation. Par ailleurs, l'implication d'un TCR hautement conservé dans la forte réponse dominante à H7<sup>a</sup> s'inscrit bien dans des concepts récents qui associent de hauts degrés de conservation des TCR à de fortes réponses, voire l'immunodominance d'une réponse<sup>68:70</sup>.

Notons en ce sens le TCR humain LC13, spécifique à un épitope dominant d'EBV, qui présente une structure hyperconservée au niveau des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ <sup>69</sup>. Les auteurs suggèrent que l'efficacité de cette réponse dominante proviendrait de la structure tertiaire même du TCR : une structure qui contribuerait fortement à la dimérisation des complexes engagés favorisant les étapes d'activation. Bien que les auteurs suggèrent que les clones impliqués possèderaient des « *capacités supérieures* », je crois qu'un lien peut être proposé entre des caractéristiques structurales particulières de ce TCR et un avantage compétitif au niveau de l'activation ou encore de la reconnaissance<sup>68:69</sup>.

D'ailleurs, pour supporter cette hypothèse, d'un point de vue structural le concept de « *Complémentarité parfaite* » ou « *Best Fit* » propose que le niveau de diversité



reflèterait la sélection de caractéristiques structurales critiques pour la spécificité d'un TCR envers son ligand. Ce concept propose également, comme dans le cas de NP366/D<sup>b</sup>, que la reconnaissance de certains complexes requiert une structure tertiaire qui ne peut être retrouvée que dans un TCR très particulier<sup>122,123</sup>. Les auteurs proposent aussi qu'une réponse impliquant un TCR hautement conservé et public serait conséquence d'un engagement structural extrêmement restreint et précis.

Selon moi, cette possibilité serait à considérer dans le cas de H7<sup>a</sup> dont la structure tertiaire du TCR semble particulièrement importante étant donné l'implication de plusieurs codons différents qui composent des régions hypervariables identiques. Rappelons qu'une grande diversité de codons exprimant les mêmes acides aminés suggère une implication structurale très importante des chaînes du TCR lors du processus de sélection thymique.

### **3.2. Particularités de structure**

Concernant l'aspect structural de la reconnaissance, l'implication de structure particulière des épitopes présentés et des TCR correspondants ont été discutés par Davis *et al.*<sup>71</sup> et serait même, selon Stewart-Jones *et al.*<sup>70</sup> à la source de la dominance d'une réponse à l'influenza.

Bien que les auteurs des travaux portant sur le TCR JM22 proposent un lien entre la spécificité extrême, la conservation et la dominance, il semble que ce TCR présente une structure particulière (adaptée aux cavités très inhabituelles du complexe MP<sub>58</sub>-<sub>66</sub>/HLA-A2) et que l'épitope en question présenterait une « *simplicité structurale* »

inhabituelle. En effet, cette simplicité structurale d'un peptide, définie par Davis *et al.*<sup>70</sup> (*Featureless peptide*) comme caractérisant une séquence en acides aminés qui ne présente pas de chaîne moléculaire particulièrement longue (eg. : CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH<sup>-</sup>) ou encombrante (eg. : tyrosine) et pointant vers les régions hypervariables du TCR, impliquerait davantage de molécules d'eau à l'interface permettant des interactions plus efficaces en facilitant le transfert de charges positives et négatives<sup>70:71</sup>. D'ailleurs en ce sens, les travaux récents de Turner *et al.*<sup>124</sup> sur la réponse dominante et extrêmement restreinte à NP<sub>366</sub> ont démontré que le fait de « simplifier » structurellement un épitope avait pour conséquence de restreindre le répertoire répondant<sup>124</sup>. Les auteurs suggèrent également que les particularités inhabituelles de l'interaction limite la sélection positive.

Bien que pour notre part il soit difficile, autrement que par cristallographie, d'évaluer le niveau de « simplicité » de H7<sup>a</sup> (Figure 7), je crois que H7<sup>a</sup> présente une certaine simplicité, mais présente également en P6 une Arginine dont la chaîne azotée en terminale est particulièrement longue et selon notre modèle (Figure 8), serait probablement en contact avec l'Aspartate de la région D de la section CDR3 $\beta$ . Toutefois, ce contact suppose également un transfert de charge et il n'est pas improbable de considérer que l'efficacité de ce contact soit médié par des molécules d'eau. Il peut aussi être intéressant de considérer, comme dans le cas du TCR JM22, qu'il existe un changement conformationnel tellement particulier, qu'uniquement la combinaison spécifique d'un nombre très limité de TCR avec son ligand puisse réussir l'acrobatie permettant la signalisation. Toutes ces hypothèses ne pourraient se vérifier sans procéder à une étude cristallographique détaillée de l'interaction en question.

#### 4. *Cinétique de développement*

---

Parmi les mandats de notre première série de travaux, un des plus attendu visait à déterminer si le processus de domination impliquait une prolifération d'amplitude plus importante ou plus rapide de la part des cellules T spécifiques à l'épitope dominant. Or, dans un contexte de présentation individuel, nos résultats indiquent que les amplitudes prolifératives de H7<sup>a</sup> et HY sont pratiquement identiques (Figures 2, premier article). Ces résultats inattendus nous ont mené à envisager que des différences qualitatives plutôt que quantitatives pouvaient déterminer le résultat d'une compétition interclonale. D'ailleurs, mesurés individuellement au même un temps post-immunisation, des niveaux de production intracellulaire de perforine et d'expression à la surface cellulaire de O-glycan plus élevés chez les T spécifiques à H7<sup>a</sup> plutôt qu'à HY indiquent que les T spécifiques à HY présentent un potentiel cytolytique plus faible, malgré, rappelons-le, un potentiel prolifératif semblable aux T spécifiques à H7<sup>a</sup> (Figure 4, premier article).

Il est toutefois important de tenir compte du fait que certains travaux ont démontré que le développement des fonctions effectrices n'est pas nécessairement associé à l'expansion clonale<sup>125</sup>. Cette différence dans les niveaux de potentiels cytolytiques correspond également à des études qui ont permis d'observer des niveaux d'activités cytotoxiques bien différents relativement à l'épitope présenté<sup>35:99:100:126</sup>.

Mis à part les molécules impliquées dans le processus cytolytique, des observations semblables furent rapportées par Liu grâce à différentes réponses dominantes<sup>47</sup>. Certaines populations de cellules T initiaient plus rapidement la

production d'INF- $\gamma$  après le contact avec l'Ag<sup>47</sup>. Sans en préciser les mécanismes, les auteurs suggèrent que cette différence procure un avantage substantiel à certains clonotypes.

Ainsi, quelques soient les molécules impliquées, les travaux de Loyer *et al.* ont d'ailleurs permis d'observer que l'élimination des APC présentant uniquement un épitope non dominant (HY) était retardée comparativement aux APC présentant un épitope dominant<sup>41</sup>. Ceci serait la conséquence d'un développement plus lent ou moins efficace des fonctions effectrices comme le témoignent les résultats présentés ici.

Nous avons tenté, par la suite, de déterminer l'implication de la perforine dans le processus de domination (Figure 5, premier article). En effet, comme la disparition des APC suppose un arrêt de la compétition interclonale et ainsi l'arrêt de stimulations subséquente, nous avons supposé qu'une majeure partie de cette disparition pouvait provenir de l'action de la perforine libérée par les CTL. Toutefois, l'utilisation de souris PKO (déficientes en perforine) n'a toutefois pas permis de démontrer que ce mode de cytolysse était impliqué dans le processus. Nos sont par cependant appuyés par une étude de la réponse à *L. monocytogenes* menée chez des souris PKO (parue après nos premiers travaux) qui indique que l'absence de perforine n'a pas d'impact spécifique sur la hiérarchie de dominance<sup>42:43</sup>. L'ensemble de ces évidences suggère ainsi que d'autres mécanismes pourraient être impliqués. D'ailleurs, de précédents travaux ont déjà proposé qu'il existait d'autres voies d'élimination des APC indépendantes de la perforine et de Fas<sup>39:127</sup>.

#### **4.1. *Durée de contact T-APC***

Comme il est possible que les cellules T dirigées contre un épitope dominant puissent s'activer plus rapidement et prendre une avance dans le développement de leurs fonctions cytotoxiques, il serait également possible que ces cellules ne nécessitent pas un contact aussi prolongé avec l'APC. Des clonotypes qui s'activeraient plus rapidement que d'autres, pourraient ainsi se passer d'un contact aussi prolongé. Alors que pour d'autres clonotypes, un contact de plus longue durée serait indispensable à un développement aussi efficace des fonctions effectrices.

Cette hypothèse est d'ailleurs appuyée par une étude qui a démontré que de brefs contacts pouvaient entraîner le développement complet des fonctions cytotoxiques. En effet, pour les cellules OT-1 anti-OVA<sub>257</sub> impliquées dans une réponse dominante, deux heures de contact sont suffisantes, même qu'un contact de plus longue durée ne mène pas à un développement prolifératif ou fonctionnel supérieur<sup>110</sup>. D'un autre côté, la durée de la synapse peut parfois être beaucoup plus longue : entre 10 et 24 heures ont même déjà été nécessaires<sup>128</sup>. Il est donc possible que la formation effective de la synapse représente une étape clé et que des perturbations quelconques puissent mener à des retards ou à des absences dans le développement fonctionnel.

## 4.2. Interruption du contact T-APC

D'un autre point de vue, les travaux de Gett *et al.*<sup>129</sup> proposent un concept d'activation progressive dont l'intensité serait relative à la « *Fitness* » (« condition, état ») des clonotypes impliqués. Leurs travaux démontrent que l'interruption du contact peut mener à l'anergie ou encore à la mort cellulaire, contrairement à des contacts adéquats qui mènent à l'expression de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-xl. En ce sens, les travaux de Huppa *et al.*<sup>128</sup> démontrent également que l'interruption de la synapse entraîne la perte du contact dans de nombreux cas et supprime des mécanismes précoces de l'activation, telle la régulation du flux calcique.

Ces travaux soulignent ainsi l'importance de contacts adéquats, autant en ce qui a trait à la durée qu'à la qualité du signal. Bien que l'interférence physique entre clonotypes reste peu probable, il n'est pas exclu que certains mécanismes puissent nuire à la qualité du contact T-APC influençant le processus d'activation; cette hypothèse ayant déjà été proposée par Grufman *et al.*<sup>38</sup> Dans le cas de nos épitopes, la fréquence de précurseur n'étant aucunement élevée, il est très peu probable que l'interférence physique interclonale soit impliquée. Toutefois, je crois qu'il serait très intéressant d'étudier en temps réel, la durée du contact des cellules T CD8<sup>+</sup> lors de la rencontre d'un APC présentant les épitopes respectifs et ce, combiné à des techniques d'imageries permettant d'observer certains éléments de signalisation précoce ou d'expression protéique.

## 5. Reconnaissance périphérique et conséquences fonctionnelles

Comme nos travaux de nature plus quantitative nous ont menés sur une piste davantage qualitative, c'est l'étude des mécanismes de survie périphérique qui ont attiré notre attention et qui ont été à l'origine de la suite de notre investigation.

Les travaux en question ont permis de mettre en évidence l'existence d'une stimulation suboptimale et continue procurée par les complexes CMHp du soi en périphérie. Il est connu que cette stimulation contribue à la survie des cellules T à les maintenir dans un état de sensibilité optimale dans l'attente de la reconnaissance d'un Ag étranger<sup>105,106</sup>. Cette stimulation suboptimale fut mise en évidence par le maintien d'un niveau basal de phosphorylation des chaînes CD3 $\zeta$  et cette phosphorylation, si faible soit-elle, contribuerait significativement au développement prolifératif et fonctionnel des cellules T naïves. De façon étonnante, ces travaux indiquent également qu'il existe des différences de réactivité parmi les clonotypes, selon leur niveau respectif de phosphorylation basale. Nous avons ainsi émis comme hypothèse que ce mécanisme de préparation du signal dictant le niveau d'activation pouvait être à l'origine de différents niveaux d'activation qui existent (vitesse d'activation ou intensité du signal) parmi les différents clonotypes lors d'un contexte d'activation.

Bien qu'il nous ait été impossible, faute de techniques expérimentales suffisamment sensibles, de déterminer ce niveau de phosphorylation chez les clonotypes spécifiques à H7<sup>a</sup> ou HY dans un répertoire pré-immun, nous avons utilisé comme marqueur indirect la densité de surface de la molécule CD5<sup>130</sup>. Les travaux de Smith *et*

*al.*<sup>131</sup> ont démontré que l'expression du CD5 est modulée par la reconnaissance de complexes CMHp en périphérie en plus d'indiquer que cette expression est proportionnelle à l'avidité des signaux reçus par le TCR.

Par contre, aucune corrélation ne fut observée entre les expansions clonales des populations T naïves spécifiques (à H7<sup>a</sup> et à HY) et leur niveau d'expression du CD5. Ces résultats indiquent que les clonotypes dirigés contre H7<sup>a</sup> ne bénéficient pas d'une stimulation périphérique par des antigènes du soi leur procurant une réactivité supérieure à ceux dirigés contre HY (Figure 1, second article).

Cependant, nos résultats qui démontrent que les cellules T CD5<sup>low/int</sup> prolifèrent davantage s'accordent bien avec des observations précédentes qui démontrent qu'une faible expression du CD5 serait associée à une plus grande réactivité<sup>131</sup> et que le CD5 serait considéré comme une molécule de régulation négative<sup>132:133</sup>. De plus, les résultats de Kassiotis *et al.*<sup>133</sup> démontrent qu'il existe parfois des divergences entre l'expression du CD5 et l'avidité de reconnaissance des complexes CMHp du soi. Compte tenu des différentes divergences qui existe dans la littérature concernant l'expression du CD5 et la reconnaissance du soi je crois, que néanmoins que l'interprétation de nos résultats doivent, pour le moment être prise avec prudence. D'autres expérimentations plus directes seront indispensables pour définitivement trancher la question de l'implication de la reconnaissance du soi dans le processus d'immunodomination.

Il demeure néanmoins que la stimulation périphérique suboptimale représente une avenue particulièrement intéressante pour expliquer des différences d'activation.



D'ailleurs, les travaux de Slifka *et al.*<sup>134</sup> sur l'influence de l'avidité dans le développement fonctionnel suggèrent également qu'un « pré-assemblage » de la cascade de transduction du signal constituerait un des paramètres les plus importants de l'activation, plus important même que l'avidité de reconnaissance.

L'implication de nouvelles stratégies ou techniques expérimentales sera, à mon avis, indispensable pour éclaircir plus adéquatement l'implication de ce facteur dans le succès d'une compétition interclonale.

## 6. Interaction TCR-ligand

Bien qu'il existe un monde entre l'interaction d'un TCR avec son ligand et l'élimination de l'APC, l'avidité et l'affinité intrinsèque de cette interaction sont connues pour leur influence dans le processus d'activation de cellules T naïves. D'ailleurs l'équipe de Kalergis *et al.* a récemment démontré que l'activation de cellules T est influencée par la densité de l'épitope présenté et la cinétique d'interaction du complexe TCR-CMH-peptide<sup>135</sup>. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que la cinétique d'interaction du complexe TCR-CMH-peptide puisse constituer, dans le processus d'activation, un avantage compétitif menant à l'élimination des APC. D'ailleurs, Derby *et al.*<sup>136</sup> ont démontré, dans un modèle d'infection viral au vaccinia virus, que les APC présentant des épitopes qui impliquent une forte avidité de reconnaissance sont éliminées plus rapidement que les autres<sup>136</sup>. L'avidité permettrait également d'expliquer comment de faibles densités d'épitopes, reconnues toutefois par des TCR d'affinité forte ou optimale, puissent tout de même mener à des activations efficaces<sup>129</sup>.

## 6.1. Cinétique de dissociation

Partie intégrante de l'avidité, l'affinité totale ( $K_d$ ) d'une interaction est généralement associée à l'activité biologique des cellules T. Néanmoins, plusieurs équipes ont davantage corrélé une lente cinétique de dissociation (« *off-rate* » représenté par le  $k_{off}$ ) avec un développement fonctionnel plus efficace<sup>137</sup>. Ces travaux ont été réalisés par immobilisation des ligands (*Surface Plasmon Resonance*, *SPR*, *Biacore*®)<sup>137,138</sup> et/ou encore par corrélation avec des tétramères de classe I<sup>139</sup>. Même si cette dernière technique semble indirecte, les travaux de Crawford *et al.*<sup>140</sup> ont néanmoins corrélé avec précision les mesures de propriétés cinétiques obtenues par *SPR* avec les stratégies de marquages obtenues avec les tétramères.

Toutefois, seuls les travaux de Alams *et al.*<sup>137</sup> ont comparé des résultats d'association/dissociation réalisés avec des tétramères de classe I composés de différents peptides et compte tenu des difficultés de synthèse des tétramères ainsi que de l'instabilité de certaines combinaisons CMHp, nous avons procédé à d'imposantes validations pour s'assurer de la pertinence des résultats ici présentés. En effet, comme l'interprétation de ces résultats repose essentiellement sur l'intensité du signal de fluorescence, il est possible que des lots de tétramères, n'émettant pas une fluorescence optimale ou ayant subi une tétramérisation moins optimale durant la synthèse, puissent poser des biais importants. Il fut ainsi confirmé qu'à quantité identique de tétramères, les intensités mesurées étaient non seulement identiques parmi les tétramères H7<sup>a</sup> et HY mais également parmi les différents lots de tétramères utilisés. L'ensemble des mesures

d'intensité fut également normalisé par la densité de TCR et de CD8<sup>+</sup> à la surface des cellules marquées. En résumé, toutes les précautions et validations les plus rigoureuses ont été faites pour s'assurer l'absence de biais.

L'analyse, par tétramères des propriétés cinétiques de dissociation n'a toutefois pas permis d'observer une différence significative entre les vitesses de dissociation des tricomplexes TCR-H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup> et TCR-HY/D<sup>b</sup> (Figure 4, second article). Cette absence de différence démontre que ce paramètre cinétique ne favorise pas le processus d'activation des clonotypes spécifiques à H7<sup>a</sup> vis-à-vis ceux spécifique à HY. Nos résultats s'accordent d'ailleurs avec quelques cas dont la vitesse de dissociation ne présente aucune influence sur le développement de la réponse<sup>4,141</sup>. De plus, bien que les travaux de Kersh *et al.*<sup>142</sup> aient démontré qu'il existe une corrélation entre la dissociation et le développement fonctionnel, leurs travaux soulignent également que cette corrélation n'est pas absolue et serait davantage représentée par des évidences distales comme le ratio de phosphorylation de p23/p21. En effet, ces derniers travaux, indiquent qu'une phosphorylation complète de la chaîne  $\zeta$ , souvent associée à une dissociation plus lente que la moyenne, est l'étape déterminante à une stimulation cellulaire efficace.

Autre résultat intéressant : l'importante variance observée parmi les cinétiques de dissociations relatives à HY ou H7<sup>a</sup>. Comme la cinétique est relative à des interactions bien précises entre les résidus de l'interface, une telle variance, notamment pour H7<sup>a</sup> peut sembler paradoxale à la restriction élevée de cette réponse. Toutefois, de telles variations furent également déjà observées dans une réponse de diversité restreinte<sup>64</sup> indiquant qu'aucune corrélation simple ne peut être établie.

## 6.2. Cinétique d'association

La cinétique d'association d'un TCR avec son ligand est plus susceptible aux conditions thermiques d'un système et également plus lente que la dissociation. Cette étape cinétique est également caractérisée par un profil bi-phasique qui indique une transition conformationnelle impliquant un changement structural indispensable à l'engagement diagonal du TCR avec son ligand<sup>143</sup>.

Une seconde stratégie de marquage aux tétramères nous a, cette fois, démontré étonnamment que les clonotypes spécifiques à H7<sup>a</sup> présentent une cinétique d'association significativement plus rapide que ceux spécifiques à HY (Figure 4, second article). Cette différence importante dans les propriétés cinétiques suggère que l'association, évènement primaire de la reconnaissance, peut avoir une influence dans le processus d'activation et, par la même occasion, dans celui de domination.

Peu de travaux ont étudié l'implication de la première étape de la cinétique d'engagement. Ceux de Kalergis *et al.*<sup>144</sup> ont examiné les conséquences de mutations ponctuelles dans la région CD3 $\beta$  de TCR restreints à K<sup>b</sup> sur le développement fonctionnel et prolifératif. Comparativement aux TCR natifs, ils ont démontré, que le mutant G97A, qui présente pourtant une cinétique de dissociation identique, montre une cinétique d'association plus rapide associée à une réponse supérieure. Les auteurs indiquent également qu'une augmentation de la vitesse d'association augmente l'efficacité de l'engagement primaire du TCR avec son ligand. Relativement à ces mêmes travaux, Lee *et al.* ont par ailleurs suggéré que l'augmentation de la cinétique

d'association pourrait être reliée à des caractéristiques qualitatives menant à une formation plus rapide ou plus adéquate de la synapse<sup>145</sup>.

### **6.3. Cinétique d'association, synapse et dimérisation des TCR**

Parmi les étapes de formation de la synapse, la dimérisation des TCR est reconnue comme étant déterminante aux étapes précoces d'engagement, permettant même à l'avidité d'augmenter de 20 à 50 fois. Ce phénomène est appelé la *Maturation de l'Avidité*<sup>134:146:147</sup>. D'ailleurs, les travaux de Bachman et Ohashi suggèrent que bien qu'une phosphorylation basale puisse être à l'origine d'une survie périphérique, c'est la dimérisation des TCR qui serait nécessaire à la formation optimale du signal<sup>148</sup>. Ainsi, certains travaux ont même établi des liens entre une dimérisation plus efficace d'un TCR hautement conservé et une activation supérieure qui mènerait à la dominance de la réponse en question<sup>69</sup>.

### **6.4. Cinétique d'association et énergie d'adaptation structurale**

D'intéressants travaux sur les propriétés cinétiques de mutants du TCR 2C ont suggéré que l'augmentation de la cinétique d'association corrèle avec des changements conformationnels qui impliquent moins d'énergie et/ou une complémentarité structurale plus adéquate<sup>149</sup>. Un cas analogue fut également observé lors de la maturation de l'affinité des anticorps qui résulte, dans ce cas, non seulement en l'augmentation de la complémentarité des régions hypervariables, mais également en l'augmentation de la cinétique d'association<sup>150</sup>. D'ailleurs, les travaux de Holler *et al.*<sup>149</sup> indiquent qu'une

association plus rapide du TCR avec son ligand serait liée à une réduction de la variété de régions hypervariables et une réduction de réactivités croisées.

Il peut être intéressant de constater que nos résultats indiquent une similitude conceptuelle intéressante : la réponse à H7<sup>a</sup> est hyperconservée (Table 1, second article) et ne présente aucune reconnaissance croisée même envers un peptide qui ne diffère que par un groupement méthylène (-CH<sub>2</sub>) (Figure 2, second article et Figure 2, thèse). De plus, bien que les travaux relatifs à la diversité et l'implication fonctionnelle d'un TCR hautement conservé ne discutent pas de l'implication d'une cinétique d'association plus rapide, il semble néanmoins que le concept du « *Best Fit* » s'applique bien à un besoin minimal d'énergie lors de l'association<sup>151</sup>. Il n'est pas exclu que la reconnaissance à H7<sup>a</sup> implique des caractéristiques semblables.

Par ailleurs, récemment les travaux de Chen *et al.* ont démontré que l'augmentation de la qualité structurale de l'engagement d'un TCR avec son ligand avait pour conséquence de permettre aux cellules T de polariser plus rapidement leurs molécules cytolitiques vers la cible suite au contact avec cette dernière<sup>152</sup>. Les auteurs suggèrent que leur ligand modifié permet d'optimiser la formation de la synapse et la signalisation qui s'y déroule.

Bien que peu de travaux puissent actuellement nous fournir des évidences qu'une cinétique d'association plus rapide puisse être directement impliquée dans un mécanisme favorisant le processus de domination, nos résultats à ce sujet suggèrent néanmoins que des événements proximaux associés à la cinétique d'association

pourraient être déterminants dans le processus d'élaboration d'une réponse dominante vis-à-vis une réponse non-dominante. Que ces mécanismes soient attribuables à la formation de la synapse, l'oligomérisation des TCR ou encore simplement un engagement plus efficace du TCR avec son ligand, l'influence et la nature même de ces événements dans un développement fonctionnel plus rapide resteront à préciser.

Par ailleurs, avec les éléments de la machinerie de signalisation largement identifiés, l'imagerie au niveau de cellules vivantes est devenue une méthode de choix pour reconstruire les séquences spatio-temporelles et pourrait être fort utile pour les études à venir.

L'influence des propriétés cinétiques resteront à étudier. La sélection ou synthèse de TCR mutés présentant des cinétiques d'association identiques mais respectivement associés à des réponses dominantes ou non-dominantes pourrait permettre de déterminer de façon directe l'implication de cette propriété cinétique dans le processus de domination.

### ***6.5. Dissociation / Association et Affinité intrinsèque***

Dans une perspectives différentes, si l'on met en équation les cinétiques observées selon  $K_d = K_{off}/K_{on}$  on peut également conclure que pour des valeurs de dissociations semblables, un  $K_{on}$  plus élevé implique une valeur  $K_d$  plus faible. Or, une valeur  $K_d$  plus faible signifie également une affinité intrinsèque plus importante. Nos résultats indiquent que l'interaction des TCR avec H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup> implique une affinité plus élevée que celle retrouvée dans l'interaction HY/D<sup>b</sup>.

Malgré l'absence de corrélation simple entre l'affinité intrinsèque ( $K_d$ ) et le développement fonctionnel, il reste remarquable de constater qu'en absence d'instruments, tel le Biacore<sup>®</sup> SPR, nous arrivons tout de même à obtenir des indications relatives à ces deux interactions moléculaires.

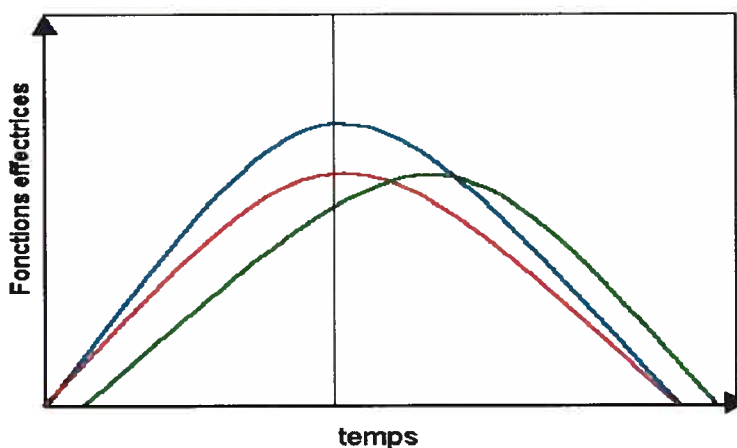
## 7. De l'activation aux fonctions effectrices

Nous avons couvert, dans ce document, l'ensemble des facteurs et paramètres actuellement reconnus pour influencer l'activation et le développement fonctionnel des cellules T CD8<sup>+</sup> naïves dans un contexte de compétition intercellulaire. Nos derniers résultats nous ont également permis d'associer un élément de la cinétique d'interaction à celle de l'activation. Ainsi, la cinétique particulière de l'interaction de certains couples TCR-ligand, permettrait l'activation 'plus rapide' des fonctions effectrices, menant à l'élimination des APC : étape clé du processus de domination.

Personnellement, je crois que l'activation 'plus rapide' des fonctions effectrices peut toutefois résulter de plusieurs scénarios. Des clonotypes dirigés contre un épitope non-dominant (Figure 9, **en vert**) pourraient présenter un retard dans le développement de leurs fonctions effectrices vis-à-vis les clonotypes dirigés contre un épitope dominant (Figure 9, **en bleu**). Cette différence pourrait ainsi permettre aux clonotypes dirigés contre des épitopes dominants d'éliminer les APC ne laissant pas la chance aux cellules dirigées contre les épitopes sous-dominants de s'activer, de développer adéquatement leurs fonctions effectrices et de proliférer.



Une autre possibilité serait que tous les clonotypes démarrent le développement de leur fonctions effectrices en même temps, mais que ceux dirigés contre l'épitope dominant les développent plus rapidement que ceux spécifiques à un déterminant non-dominant (la différence entre le démarrage du processus effectif et le développement optimal des fonctions effectrices est significative dans cette dernière hypothèse) (Figures 9, **en rouge**). D'ailleurs, bien que les profils prolifératifs de nos épitopes modèles semblent se superposer, cette hypothèse est supportée par une différence légère, mais significative, dans la cinétique de prolifération qui indique que la prolifération dirigée contre H7<sup>a</sup> serait plus rapide (Figure 5, second article).



**Figure 9.** Schéma hypothétique de la cinétique de développement des fonctions effectrices de réponse dominante (en bleu) et non-dominantes (en rouge et en vert).

De très faibles variations de la cinétique proliférative de développement, comme observés dans la Figure 5 du second article peuvent néanmoins impliquer une grande influence sur l'amplitude globale de la réponse proliférative. D'ailleurs, les travaux de

De Boer et Perelson<sup>67</sup> basés sur des modèles mathématiques de réponses T CD8<sup>+</sup> suggèrent l'hypothèse que de très faibles différences dans la cinétique de prolifération des clonotypes, ou encore sur le délai que peut prendre un clonotype à s'activer, peuvent avoir de grandes répercussions (de l'ordre d'un log) sur l'amplitude de la réponse. Ces évidences expliqueraient l'importante différence proliférative observée lors de situations d'immunodomination.

### ***7.1. Développement fonctionnel l'expression des gènes impliqués***

Bien que les conséquences possibles d'une cinétique d'association plus rapide soient nombreuses, nous croyons que les événements proximaux et ceux qui en découlent resteront à préciser quant à leur impact direct sur le processus d'activation menant à la dominance. L'analyse de l'expression des gènes chez les clonotypes impliqués dans des réponses dominantes et non-dominantes pourrait permettre de mettre en lumière l'implication de molécules ou mécanismes encore inconnus à ce jour pour leur implication. À mon avis, une analyse semblable devrait être réalisée dans un contexte permettant l'étude des patrons géniques de cellules T naïves spécifiques à des temps aussi précoces que de quelques secondes à quelques minutes, suite à la reconnaissance, ce qui représente indéniablement un nouveau défi technologique.

## 8. *Implications Immunothérapeutiques*

---

L'immunothérapie connaît des succès mitigés depuis plusieurs années et il est encore aujourd'hui difficile de générer une réponse suffisamment efficace pour éradiquer des cellules tumorales<sup>103</sup>. Le problème résiderait à la fois dans l'efficacité de la reconnaissance d'élimination des cellules tumorales par les cellules T CD8<sup>+</sup>. La tolérance au soi et l'identification de cibles hautement immunogènes sont indéniablement deux obstacles à résoudre et dont les solutions restent difficiles à concilier<sup>102</sup>.

L'efficacité de l'utilisation des AgMiH comme cibles immunothérapeutiques fut observée lors de transplantation de cellules hématopoïétiques allogéniques dont l'effet GVL en est d'ailleurs une preuve indéniable<sup>153</sup>. Néanmoins, l'effet GVL ainsi que les lymphocytes pouvant être simultanément transférés peuvent également mener les cellules T à reconnaître et réagir contre les cellules du soi pouvant entraîner de graves complications<sup>103</sup>. Parmi les éléments susceptibles d'aider à dissocier les deux réactions, l'implication d'un nombre minimal de cibles permettrait d'éviter au mieux les réactions dues aux reconnaissances indésirables (réactions croisées et celles issues du phénomène d'*antigen spreading*). Toutefois, il est nécessaire que ces cibles stimulent les cellules T qui leur sont spécifiques de façon à permettre l'élaboration d'une réponse suffisamment agressive pour éradiquer les cellules tumorales. Le processus d'immunodomination qui permet de concilier la génération d'un nombre très limité de réponses combiné à la reconnaissance des Ag les plus immunogènes semble théoriquement remplir ces conditions<sup>103</sup>.

### ***8.1. Preuves de l'efficacité thérapeutique de la réponse dominante***

Parmi les différents projets élaborés par l'équipe du Dr Perreault, les travaux portant sur la caractérisation d'un essai immunothérapeutique nous ont permis de déterminer l'importance que l'immunodominance occupait parmi les différentes cibles testées. En effet, nous avons mis à l'épreuve les réponses à différentes cibles dans le but d'éliminer des cellules tumorales EL4, connues comme étant parmi les des cellules tumorales les plus agressives<sup>26</sup>.

L'injection de cellules tumorales EL4 dans différentes souris nous a permis de discriminer les différents Ag reconnus par les hôtes et d'établir lequel de ces Ag était en mesure de stimuler adéquatement leur cellules T CD8 pour permettre la survie des souris en question. La réponse primaire aux cellules EL4 injectées dans des souris B6 est dirigées contre 6 TAA<sup>154</sup>, alors que la réponse primaire contre une souris C57/B10.H7<sup>a</sup> l'est à la fois contre les 6 mêmes TAA et conjointement contres des AgMiH du locus H9 reconnus comme non-dominants<sup>155</sup>. L'injection des cellules EL4 dans des souris C57/B10.H7<sup>b</sup> naïves permet quant à elle de stimuler les cellules T dirigées contre notre Ag modèle H7<sup>a</sup>. Comme ce dernier n'est que le seul Ag qui diffère des autres combinaisons (Figure 1a, Article 3), la mort de 100% des souris B6 et B10.H7<sup>a</sup> comparativement à la survie de 30% de souris B10.H7<sup>b</sup> (jusqu'à 40 jours après l'injection des cellules EL4) nous indiquent que H7<sup>a</sup> entraîne une réponse non seulement plus efficace que les TAA, mais aussi plus efficace qu'avec l'addition de AgMiH non-dominants. Ces résultats sont d'autant plus remarquables qu'ils démontrent que H7<sup>a</sup> est efficace dans un contexte dont la stimulation est faite *in vivo* dans un répertoire naïf.

Lors d'une stimulation préalable aux mêmes combinaisons d'Ag, il est impressionnant de constater que la réponse à H7<sup>a</sup> mène à la survie de la totalité (100%) des souris B10.H7<sup>b</sup> immunisées et injectées par cellules EL4 (Figure 1b, Article 3), alors que celles répondant uniquement aux TAA et aux AgMiH non-dominants n'atteignent qu'un taux de survie que de 20%.

La survie des souris répondant à H7<sup>a</sup> présente enfin une preuve indéniable et tangible non seulement de l'importance qu'est l'immunodominance dans processus d'élaboration de stratégies thérapeutiques, mais nous démontre que l'immunothérapie peut obtenir des résultats parfaits (100% de survie).

Quant à l'analyse de la cinétique d'expansion lors d'injection de cellules EL4 à des souris immunisées, il est intrigant par contre d'observer que le développement de la réponse spécifique contre H7<sup>a</sup> présente un profil en deux phases permettant notamment d'observer la réponse secondaire à H7<sup>a</sup> qui atteint un premier sommet en 5 jours (Figure 2b, Article 4). Par contre chez des souris B10.H7<sup>b</sup> naïves ce développement se produit beaucoup plus lentement comparativement aux immunisations faites avec des splénocytes arborant H7<sup>a</sup> (Figure 2, Article 1). Cette lenteur probablement due à une dissémination différente et aux caractéristiques particulières des cellules tumorales permet à la réponse à H7<sup>a</sup> d'atteindre un plateau stable après 15 jours post injection des cellules EL4, et ce, sans indication de résorption de la réponse (Figure 2b, Article 4). Il est important de considérer que les cellules EL4 peuvent en effet présenter des caractéristiques influençant le processus de domination. Parmi ces caractéristiques, notons le nombre de copies présentées à la surface des cellules en question dont la mesure de la densité de H7<sup>a</sup> présenté pourrait peut-être nous apporter des informations

complémentaires et relatives à l'implication de la dominance dans une stratégie immunothérapeutique.

## **8.2. Réalité du transfert adoptif**

L'immunothérapie repose sur l'efficacité des cellules T à reconnaître et à éliminer des cellules tumorales solides ou circulantes. La stimulation des cellules T peut se faire directement *in vivo* ou peut aussi être effectuée *in vitro* ce qui implique le transfert des cellules stimulées dans l'hôte atteint. Cette dernière stratégie permet de stimuler plus efficacement les cellules T en question et de les sélectionner plus adéquatement préalablement au transfert adoptif<sup>103</sup>. Ainsi, dans un contexte où la réalité de traitement d'un individu atteint de leucémie impliquerait une immunodéplétion suivie d'une greffe de cellules de moelle osseuse, la stratégie de transfert adoptif de cellules préalablement stimulées contre des TAA ou des AgMiH représente une alternative des plus intéressante. Nos travaux ont en ce sens permis de vérifier si la dominance de notre Ag modèle peut aussi être une caractéristique indispensable à l'efficacité de cette stratégie thérapeutique.

Nos résultats indiquent que la stimulation préalable de cellules T contre des AgMiH du locus H9 démontre que ces Ag non-dominants ne permettent pas la survie des souris en question (Figure 4, Article 3) et lorsque des TAA sont ajoutés à la combinaison, seulement 20% des souris survivent au traitement démontrant l'incapacité de ces cibles à générer une réponse protectrice. Cependant, lorsque la même stratégie est réalisée par la stimulation unique de H7<sup>a</sup> (cellule de souris B10.H7<sup>b</sup> stimulées par des cellules B10.H7<sup>a</sup> et transférées pour répondre aux cellules EL4), nos résultats démontrent que la totalité

(100%) des souris survivent aux cellules EL4 (Figure 4, Article 3). Ce remarquable résultat peut s'expliquer notamment par l'absence totale d'expansion des cellules EL4 injectées (Figure 3a, Article 4), contrairement à la reconnaissance des TAA qui permettent d'observer l'expansion croissante de cellules tumorales (Figure 3a, Article 4) qui résulte en un taux de mortalité de 100% des souris (Figure 4, Article 3).

La stimulation des cellules T B10.H7<sup>b</sup> par H7<sup>a</sup> faite avant le transfert démontre sans aucun doute que le contrôle des cellules tumorales est absolu et prévient tout risque de développement tumoral ultérieur.

L'analyse de la cinétique d'expansion des cellules T spécifiques à H7<sup>a</sup> (parmi les splénocytes) suite à l'injection de cellules EL4 chez des receveurs ayant subis un transfert des cellules B10.H7<sup>b</sup> pré stimulées (Figure 3b, Article 4), montre un profil semblable à une immunisation primaire, atteignant un sommet 15 jour après l'injection des EL4. Bien que ce résultat puisse sembler étonnant compte tenu de la stimulation préalable des cellules transférées, il reste qu'il est possible que le transfert physique, la dissémination des cellules et l'influence de l'expansion homéostatique post transfert puisse altérer leur cinétique d'expansion.

### ***8.3. Autre perspective immunothérapeutique***

Parmi l'ensemble de nos essais, la stimulation préalable par peptide (H7<sup>a</sup>) à l'injection de cellules EL4 (Figure 2, Article 3), nous démontre qu'il serait intéressant d'envisager d'adopter cette stratégie comme traitement dans l'éventualité où un patient présenterait, par l'identification d'un marqueur précoce quelconque, des indications relatives au

développement en cours de cellules tumorales. Il serait indispensable par contre de stimuler les cellules T par un Ag permettant de générer un répertoire de cellules mémoires suffisamment efficace pour prévenir le développement tumoral. Dans le cas de transplantation de greffe de moelle, les cas de rechute peuvent survenir des mois ou même des années suite à une greffe de cellules hématopoïétiques, il est donc nécessaire pour une rémission continue que les cellules T mémoires générées persistent le plus longtemps possible.



## CONCLUSION

---

L'ensemble de nos travaux visait ainsi à déterminer l'existence et l'influence de différents facteurs susceptibles de contribuer au succès d'une rivalité interclonale dont l'enjeu est l'élimination d'une APC commune co-présentant des déterminants immunogènes. Nous avons étudié les deux aspects de la réponse T CD8<sup>+</sup>, soit les facteurs associés à la présentation et les caractéristiques intrinsèques aux cellules répondantes. Cependant, c'est à l'interface de ces deux niveaux, soit au cœur même des moments les plus précoces de la reconnaissance, que nos résultats ont mis en lumière une propriété physico-chimique susceptible d'être à l'origine du processus.

L'analyse de l'ensemble de la littérature sur l'immunodominance, combinée à nos expérimentations nous permet finalement de conclure que le processus de domination n'implique pas de facteur quantitatif tel que la fréquence de précurseurs, mais implique des différences qualitatives retrouvées au cœur même de la reconnaissance et ayant d'importants impacts sur le développement fonctionnel. Les propriétés cinétiques de l'interaction du TCR avec son ligand procureraient un développement fonctionnel plus rapide de certains clonotypes plutôt que d'autres.

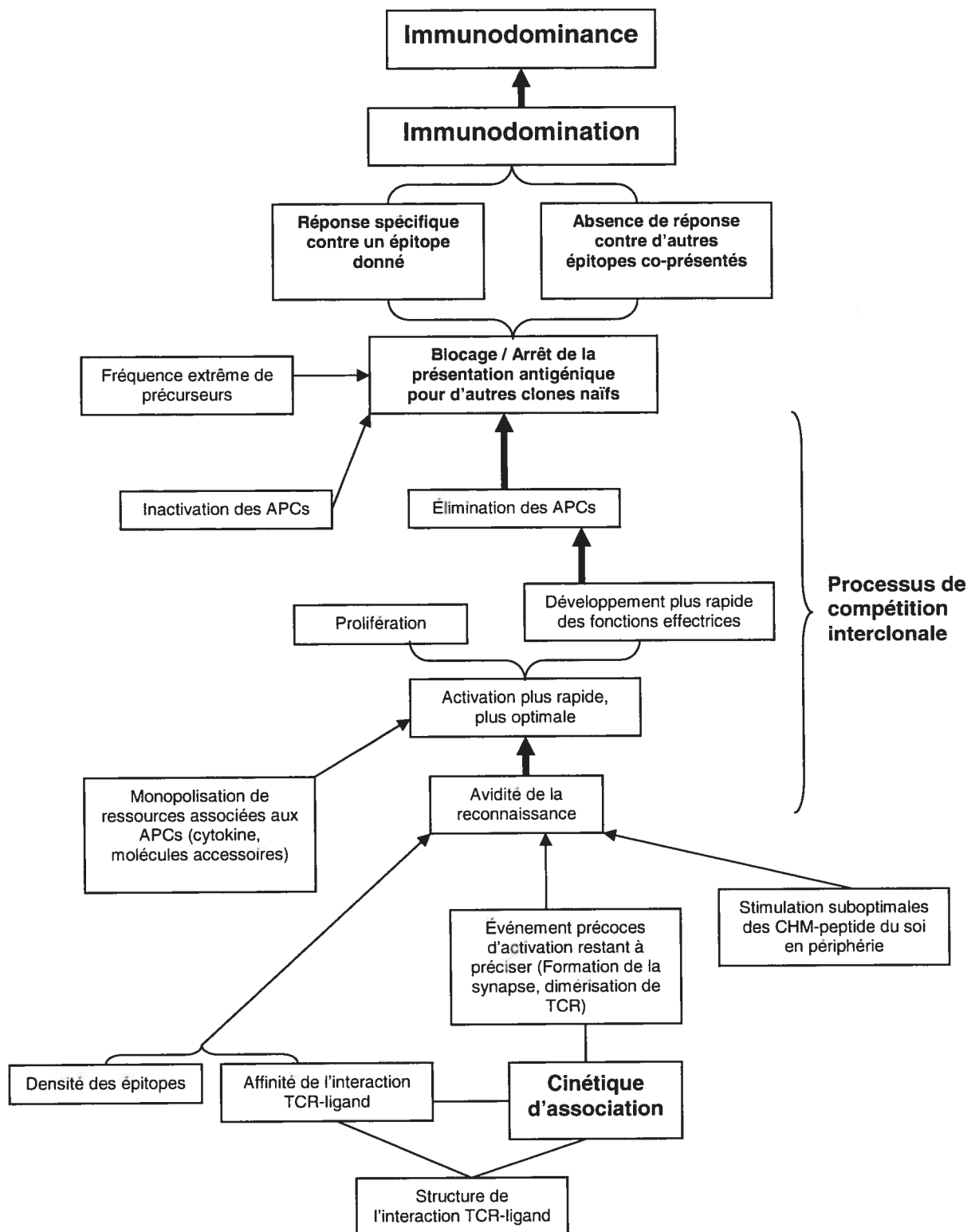
Nos travaux mettent également en lumière l'importance que peuvent avoir les mécanismes proximaux d'activation dans une compétition interclonale et dans les processus contribuant à la domination d'une réponse T CD8<sup>+</sup> sur une autre.

## *Vision globale et perspectives*

Le « immunodominologistes » ont pour la plupart, toujours portée leur vision des causes de l'immunodominance vers les aspects propres à la présentation antigénique plutôt qu'aux caractéristiques des cellules T répondantes. Cette perception qui tendra sûrement à changer dans les prochaines années résulte probablement du manque de ressources technologiques permettant d'étudier les cellules spécifiquement impliquées ou encore des niveaux moléculaires, telle l'interface TCR-CMHp.

L'ensemble des travaux et des interprétations présentées dans le présent document, illustre bien que le processus d'immunodomination est soumis à une influence multifactorielle comme le démontre bien la vue d'ensemble du schéma de la Figure 10. Nous avons démontré que dans certains cas, des caractéristiques proprement cellulaires peuvent influencer la dominance et que dans d'autres cas l'influence ne semble attribuable qu'à des caractéristiques moléculaires. Nos travaux font également la synthèse des niveaux d'influence des facteurs, tant au niveau de la reconnaissance antigénique, qu'au processus de la compétition interclonale pour les APC, puis enfin à la résultante qu'est la dominance d'une réponse envers une autre (Figure 10).

Mais nos travaux vont encore plus loin que la perception du rôle des cellules répondantes ou de la présentation et introduise dans l'étude globale de l'immunodominance le point de départ même de la réponse immune adaptative, c'est-à-dire l'interaction moléculaire entre un récepteur, le TCR, et son ligand spécifique, le complexe CHMp.



**Figure 10.** Schéma récapitulatif hypothétique de l'ensemble du processus d'immunodomination menant à la dominance.

L'ensemble des travaux et interprétations présentées dans le présent document démontre bien la complexité du système adaptatif et souligne le grand nombre de paramètres susceptibles d'influencer la survie même de l'hôte. Les données de nature fondamentale présentées dans ce document nécessiteront de nombreuses adaptations avant de pouvoir être applicables au niveau thérapeutique. Mais il est fort à parier que les concepts exposés pourront éventuellement être mis à contribution dans les méthodes et technologies futures impliquées dans sélection de cibles optimales dans l'élaboration de vaccins. D'ailleurs, d'un point de vue thérapeutique actuel, le caractère immunodominant d'une réponse représente sans aucun doute un important indicateur quant au potentiel d'une cible immunothérapeutique et la détermination des caractéristiques de la réponse dominante est l'avenue de choix vers cette solution.



Guillaume Roy

## RÉFÉRENCES

---

1. Cresswell, P., N. Bangia, T. Dick, and G. Diedrich. 1999. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol.Rev.* 172:21-28.
2. Solheim, J. C. 1999. Class I MHC molecules: assembly and antigen presentation. *Immunol.Rev.* 172:11-19.
3. Gascoigne, N. R. and T. Zal. 2004. Molecular interactions at the T cell-antigen-presenting cell interface. *Curr.Opin.Immunol.* 16:114-119.
4. Garcia, K. C., M. D. Tallquist, L. R. Pease, A. Brunmark, C. A. Scott, M. Degano, E. A. Stura, P. A. Peterson, I. A. Wilson, and L. Teyton. 1997. Alphabeta T cell receptor interactions with syngeneic and allogeneic ligands: affinity measurements and crystallization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:13838-13843.
5. Davis, M. M., J. J. Boniface, Z. Reich, D. Lyons, J. Hampl, B. Arden, and Y. Chien. 1998. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 16:523-544.
6. Harty, J. T., A. R. Tvinnereim, and D. W. White. 2000. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu.Rev.Immunol.* 18:275-308.
7. Busch, D. H., I. M. Pilip, S. Vijh, and E. G. Pamer. 1998. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity.* 8:353-362.
8. Murali-Krishna, K., J. D. Altman, M. Suresh, D. J. Sourdive, A. J. Zajac, J. D. Miller, J. Slansky, and R. Ahmed. 1998. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity.* 8:177-187.
9. Harty, J. T. and M. J. Bevan. 1999. Responses of CD8(+) T cells to intracellular bacteria. *Curr.Opin.Immunol.* 11:89-93.
10. Shresta, S., C. T. Pham, D. A. Thomas, T. A. Graubert, and T. J. Ley. 1998. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr.Opin.Immunol.* 10:581-587.
11. Belz, G. T., P. G. Stevenson, and P. C. Doherty. 2000. Contemporary analysis of MHC-related immunodominance hierarchies in the CD8+ T cell response to influenza A viruses. *J.Immunol.* 165:2404-2409.
12. Gallimore, A., T. Dumrese, H. Hengartner, R. M. Zinkernagel, and H. G. Rammensee. 1998. Protective immunity does not correlate with the hierarchy of virus-specific cytotoxic T cell responses to naturally processed peptides. *J.Exp.Med.* 187:1647-1657.
13. Wettstein, P. J. and D. W. Bailey. 1982. Immunodominance in the immune response to "multiple" histocompatibility antigens. *Immunogenetics* 16:47-58.
14. Perreault, C., D. C. Roy, and C. Fortin. 1998. Immunodominant minor histocompatibility antigens: the major ones. *Immunol.Today* 19:69-74.
15. Smith, C. A., C. M. Graham, and D. B. Thomas. 1994. Immunodominance correlates with T-cell receptor (alpha beta) gene usage in the class II-restricted response to influenza haemagglutinin. *Immunology* 82:343-350.

16. Lo-Man, R., J. P. Langeveld, P. Martineau, M. Hofnung, R. H. Meloen, and C. Leclerc. 1998. Immunodominance does not result from peptide competition for MHC class II presentation. *J.Immunol.* 160:1759-1766.
17. Berger, M. A. and R. Korngold. 1997. Immunodominant CD4+ T cell receptor Vbeta repertoires involved in graft-versus-host disease responses to minor histocompatibility antigens. *J.Immunol.* 159:77-85.
18. Sercarz, E. E., P. V. Lehmann, A. Ametani, G. Benichou, A. Miller, and K. Moudgil. 1993. Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu.Rev.Immunol.* 11:729-766.
19. Grufman, P., E. Z. Wolpert, J. K. Sandberg, and K. Karre. 1999. T cell competition for the antigen-presenting cell as a model for immunodominance in the cytotoxic T lymphocyte response against minor histocompatibility antigens. *Eur.J.Immunol.* 29:2197-2204.
20. Price, G. E., R. Ou, H. Jiang, L. Huang, and D. Moskophidis. 2000. Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant variants in influenza A virus pneumonia. *J.Exp.Med.* 191:1853-1867.
21. Koenig, S., A. J. Conley, Y. A. Brewah, G. M. Jones, S. Leath, L. J. Boots, V. Davey, G. Pantaleo, J. F. Demarest, C. Carter, and . 1995. Transfer of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes to an AIDS patient leads to selection for mutant HIV variants and subsequent disease progression. *Nat.Med.* 1:330-336.
22. Goulder, P. J., R. E. Phillips, R. A. Colbert, S. McAdam, G. Ogg, M. A. Nowak, P. Giangrande, G. Luzzi, B. Morgan, A. Edwards, A. J. McMichael, and S. Rowland-Jones. 1997. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat.Med.* 3:212-217.
23. Achour, A., J. Michaelsson, R. A. Harris, J. Odeberg, P. Grufman, J. K. Sandberg, V. Levitsky, K. Karre, T. Sandalova, and G. Schneider. 2002. A structural basis for LCMV immune evasion: subversion of H-2D(b) and H-2K(b) presentation of gp33 revealed by comparative crystal structure analyses. *Immunity.* 17:757-768.
24. Schreiber, H., T. H. Wu, J. Nachman, and W. M. Kast. 2002. Immunodominance and tumor escape. *Semin.Cancer Biol.* 12:25-31.
25. Deng, Y., J. W. Yewdell, L. C. Eisenlohr, and J. R. Bennink. 1997. MHC affinity, peptide liberation, T cell repertoire, and immunodominance all contribute to the paucity of MHC class I-restricted peptides recognized by antiviral CTL. *J.Immunol.* 158:1507-1515.
26. Pion, S., G. J. Christianson, P. Fontaine, D. C. Roopenian, and C. Perreault. 1999. Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocyte responses: explanation for the immunodominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens. *Blood* 93:952-962.
27. Fairchild, P. J. 1999. Reversal of immunodominance among autoantigenic T-cell epitopes. *Autoimmunity* 30:209-221.
28. Pion, S., P. Fontaine, M. Desaulniers, J. Jutras, J. G. Filep, and C. Perreault. 1997. On the mechanisms of immunodominance in cytotoxic T lymphocyte responses to minor histocompatibility antigens. *Eur.J.Immunol.* 27:421-430.
29. Yewdell, J. W. and M. Del Val. 2004. Immunodominance in TCD8+ responses to viruses: cell biology, cellular immunology, and mathematical models. *Immunity.* 21:149-153.

30. Yewdell, J. W. and J. R. Bennink. 1999. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu.Rev.Immunol.* 17:51-88.
31. Mitchison, N. A. 1992. Specialization, tolerance, memory, competition, latency, and strife among T cells. *Annu.Rev.Immunol.* 10:1-12.
32. Kedl, R. M., W. A. Rees, D. A. Hildeman, B. Schaefer, T. Mitchell, J. Kappler, and P. Marrack. 2000. T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J.Exp.Med.* 192:1105-1113.
33. Sandberg, J. K., P. Grufman, E. Z. Wolpert, L. Franksson, B. J. Chambers, and K. Karre. 1998. Superdominance among immunodominant H-2Kb-restricted epitopes and reversal by dendritic cell-mediated antigen delivery. *J.Immunol.* 160:3163-3169.
34. Probst, H. C., T. Dumrese, and M. F. van den Broek. 2002. Cutting edge: competition for APC by CTLs of different specificities is not functionally important during induction of antiviral responses. *J.Immunol.* 168:5387-5391.
35. Chen, W., L. C. Anton, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell. 2000. Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity.* 12:83-93.
36. Kedl, R. M., J. W. Kappler, and P. Marrack. 2003. Epitope dominance, competition and T cell affinity maturation. *Curr.Opin.Immunol.* 15:120-127.
37. Niedermann, G., S. Butz, H. G. Ihlenfeldt, R. Grimm, M. Lucchiari, H. Hoschutzky, G. Jung, B. Maier, and K. Eichmann. 1995. Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity.* 2:289-299.
38. Grufman, P., J. K. Sandberg, E. Z. Wolpert, and K. Karre. 1999. Immunization with dendritic cells breaks immunodominance in CTL responses against minor histocompatibility and synthetic peptide antigens. *J.Leukoc.Biol.* 66:268-271.
39. Wong, P. and E. G. Pamer. 2003. Feedback regulation of pathogen-specific T cell priming. *Immunity.* 18:499-511.
40. Hermans, I. F., D. S. Ritchie, J. Yang, J. M. Roberts, and F. Ronchese. 2000. CD8<sup>+</sup> T cell-dependent elimination of dendritic cells in vivo limits the induction of antitumor immunity. *J.Immunol.* 164:3095-3101.
41. Loyer, V., P. Fontaine, S. Pion, F. Hetu, D. C. Roy, and C. Perreault. 1999. The in vivo fate of APCs displaying minor H antigen and/or MHC differences is regulated by CTLs specific for immunodominant class I-associated epitopes. *J.Immunol.* 163:6462-6467.
42. Badovinac, V. P., A. R. Tvinnereim, and J. T. Harty. 2000. Regulation of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science* 290:1354-1358.
43. Badovinac, V. P. and J. T. Harty. 2000. Adaptive immunity and enhanced CD8<sup>+</sup> T cell response to *Listeria monocytogenes* in the absence of perforin and IFN-gamma. *J.Immunol.* 164:6444-6452.
44. Whitmire, J. K., J. T. Tan, and J. L. Whitton. 2005. Interferon-gamma acts directly on CD8<sup>+</sup> T cells to increase their abundance during virus infection. *J.Exp.Med.* 201:1053-1059.

45. Rodriguez, F., S. Harkins, M. K. Slifka, and J. L. Whitton. 2002. Immunodominance in virus-induced CD8(+) T-cell responses is dramatically modified by DNA immunization and is regulated by gamma interferon. *J.Virol.* 76:4251-4259.
46. Slifka, M. K., F. Rodriguez, and J. L. Whitton. 1999. Rapid on/off cycling of cytokine production by virus-specific CD8+ T cells. *Nature* 401:76-79.
47. Liu, F., J. L. Whitton, and M. K. Slifka. 2004. The rapidity with which virus-specific CD8+ T cells initiate IFN-gamma synthesis increases markedly over the course of infection and correlates with immunodominance. *J.Immunol.* 173:456-462.
48. Hugues, S., L. Fetler, L. Bonifaz, J. Helft, F. Amblard, and S. Amigorena. 2004. Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat.Immunol.* 5:1235-1242.
49. Kedl, R. M., B. C. Schaefer, J. W. Kappler, and P. Marrack. 2002. T cells down-modulate peptide-MHC complexes on APCs in vivo. *Nat.Immunol.* 3:27-32.
50. Freitas, A. A. and B. Rocha. 2000. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu.Rev.Immunol.* 18:83-111.
51. Chen, W., J. R. Bennink, P. A. Morton, and J. W. Yewdell. 2002. Mice deficient in perforin, CD4+ T cells, or CD28-mediated signaling maintain the typical immunodominance hierarchies of CD8+ T-cell responses to influenza virus. *J.Virol.* 76:10332-10337.
52. Choi, E. Y., G. J. Christianson, Y. Yoshimura, T. J. Sproule, N. Jung, S. Joyce, and D. C. Roopenian. 2002. Immunodominance of H60 is caused by an abnormally high precursor T cell pool directed against its unique minor histocompatibility antigen peptide. *Immunity.* 17:593-603.
53. Simpson, E. and D. Roopenian. 1997. Minor histocompatibility antigens. *Curr.Opin.Immunol.* 9:655-661.
54. Levitsky, V., Q. J. Zhang, J. Levitskaya, and M. G. Masucci. 1996. The life span of major histocompatibility complex-peptide complexes influences the efficiency of presentation and immunogenicity of two class I-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes in the Epstein-Barr virus nuclear antigen 4. *J.Exp.Med.* 183:915-926.
55. Fu, T. M., L. M. Mylin, T. D. Schell, I. Bacik, G. Russ, J. W. Yewdell, J. R. Bennink, and S. S. Tevethia. 1998. An endoplasmic reticulum-targeting signal sequence enhances the immunogenicity of an immunorecessive simian virus 40 large T antigen cytotoxic T-lymphocyte epitope. *J.Virol.* 72:1469-1481.
56. Chen, W., S. Khilko, J. Fecondo, D. H. Margulies, and J. McCluskey. 1994. Determinant selection of major histocompatibility complex class I-restricted antigenic peptides is explained by class I-peptide affinity and is strongly influenced by nondominant anchor residues. *J.Exp.Med.* 180:1471-1483.
57. Chen, W., C. C. Norbury, Y. Cho, J. W. Yewdell, and J. R. Bennink. 2001. Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J.Exp.Med.* 193:1319-1326.
58. Valitutti, S. and A. Lanzavecchia. 1997. Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunol.Today* 18:299-304.



59. Sykulev, Y., M. Joo, I. Vturina, T. J. Tsomides, and H. N. Eisen. 1996. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity*. 4:565-571.
60. Vijh, S. and E. G. Pamer. 1997. Immunodominant and subdominant CTL responses to *Listeria monocytogenes* infection. *J.Immunol.* 158:3366-3371.
61. Vijh, S., I. M. Pilip, and E. G. Pamer. 1998. Effect of antigen-processing efficiency on in vivo T cell response magnitudes. *J.Immunol.* 160:3971-3977.
62. Crotzer, V. L., R. E. Christian, J. M. Brooks, J. Shabanowitz, R. E. Settlage, J. A. Marto, F. M. White, A. B. Rickinson, D. F. Hunt, and V. H. Engelhard. 2000. Immunodominance among EBV-derived epitopes restricted by HLA-B27 does not correlate with epitope abundance in EBV-transformed B-lymphoblastoid cell lines. *J.Immunol.* 164:6120-6129.
63. Badovinac, V. P., B. B. Porter, and J. T. Harty. 2002. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat.Immunol.* 3:619-626.
64. Savage, P. A., J. J. Boniface, and M. M. Davis. 1999. A kinetic basis for T cell receptor repertoire selection during an immune response. *Immunity*. 10:485-492.
65. Busch, D. H. and E. G. Pamer. 1999. T cell affinity maturation by selective expansion during infection. *J.Exp.Med.* 189:701-710.
66. Rees, W., J. Bender, T. K. Teague, R. M. Kedl, F. Crawford, P. Marrack, and J. Kappler. 1999. An inverse relationship between T cell receptor affinity and antigen dose during CD4(+) T cell responses in vivo and in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:9781-9786.
67. De Boer, R. J. and A. S. Perelson. 1994. T cell repertoires and competitive exclusion. *J.Theor.Biol.* 169:375-390.
68. Kjer-Nielsen, L., C. S. Clements, A. W. Purcell, A. G. Brooks, J. C. Whisstock, S. R. Burrows, J. McCluskey, and J. Rossjohn. 2003. A structural basis for the selection of dominant alphabeta T cell receptors in antiviral immunity. *Immunity*. 18:53-64.
69. Kjer-Nielsen, L., C. S. Clements, A. G. Brooks, A. W. Purcell, M. R. Fontes, J. McCluskey, and J. Rossjohn. 2002. The structure of HLA-B8 complexed to an immunodominant viral determinant: peptide-induced conformational changes and a mode of MHC class I dimerization. *J.Immunol.* 169:5153-5160.
70. Stewart-Jones, G. B., A. J. McMichael, J. I. Bell, D. I. Stuart, and E. Y. Jones. 2003. A structural basis for immunodominant human T cell receptor recognition. *Nat.Immunol.* 4:657-663.
71. Davis, M. M. 2003. The problem of plain vanilla peptides. *Nat.Immunol.* 4:649-650.
72. Thatcher, T. H., D. P. O'Brien, S. Altuwaijri, and R. K. Barth. 2000. Increasing the frequency of T-cell precursors specific for a cryptic epitope of hen-egg lysozyme converts it to an immunodominant epitope. *Immunology* 99:235-242.
73. Zippelius, A., M. J. Pittet, P. Batard, N. Rufer, M. de Smedt, P. Guillaume, K. Ellefsen, D. Valmori, D. Lienard, J. Plum, H. R. MacDonald, D. E. Speiser, J. C. Cerottini, and P. Romero. 2002. Thymic selection generates a large T cell pool recognizing a self-peptide in humans. *J.Exp.Med.* 195:485-494.

74. Pittet, M. J., D. Valmori, P. R. Dunbar, D. E. Speiser, D. Lienard, F. Lejeune, K. Fleischhauer, V. Cerundolo, J. C. Cerottini, and P. Romero. 1999. High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J.Exp.Med.* 190:705-715.
75. Dutoit, V., V. Rubio-Godoy, M. J. Pittet, A. Zippelius, P. Y. Dietrich, F. A. Legal, P. Guillaume, P. Romero, J. C. Cerottini, R. A. Houghten, C. Pinilla, and D. Valmori. 2002. Degeneracy of antigen recognition as the molecular basis for the high frequency of naive A2/Melan-a peptide multimer(+) CD8(+) T cells in humans. *J.Exp.Med.* 196:207-216.
76. Choi, E. Y., Y. Yoshimura, G. J. Christianson, T. J. Sproule, S. Malarkannan, N. Shastri, S. Joyce, and D. C. Roopenian. 2001. Quantitative analysis of the immune response to mouse non-MHC transplantation antigens in vivo: the H60 histocompatibility antigen dominates over all others. *J.Immunol.* 166:4370-4379.
77. Ehl, S., P. Klenerman, R. M. Zinkernagel, and G. Bocharov. 1998. The impact of variation in the number of CD8(+) T-cell precursors on the outcome of virus infection. *Cell Immunol.* 189:67-73.
78. Smith, A. L., M. E. Wikstrom, and G. B. Fazekas de St. 2000. Visualizing T cell competition for peptide/MHC complexes: a specific mechanism to minimize the effect of precursor frequency. *Immunity.* 13:783-794.
79. Moudgil, K. D., D. Sekiguchi, S. Y. Kim, and E. E. Sercarz. 1997. Immunodominance is independent of structural constraints: each region within hen eggwhite lysozyme is potentially available upon processing of native antigen. *J.Immunol.* 159:2574-2579.
80. Connolly, J. M. 1994. The peptide p2Ca is immunodominant in all recognition of Ld by beta chain variable region V beta 8+ but not V beta 8- strains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:11482-11486.
81. Daly, K., P. Nguyen, D. L. Woodland, and M. A. Blackman. 1995. Immunodominance of major histocompatibility complex class I-restricted influenza virus epitopes can be influenced by the T-cell receptor repertoire. *J.Virol.* 69:7416-7422.
82. Nikolich-Zugich, J., M. K. Slifka, and I. Messaoudi. 2004. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat.Rev.Immunol.* 4:123-132.
83. Casanova, J. L., J. C. Cerottini, M. Matthes, A. Necker, H. Gournier, C. Barra, C. Widmann, H. R. MacDonald, F. Lemonnier, B. Malissen, and . 1992. H-2-restricted cytolytic T lymphocytes specific for HLA display T cell receptors of limited diversity. *J.Exp.Med.* 176:439-447.
84. Messaoudi, I., J. A. Guevara Patino, R. Dyal, J. LeMaout, and J. Nikolich-Zugich. 2002. Direct link between mhc polymorphism, T cell avidity, and diversity in immune defense. *Science* 298:1797-1800.
85. Malarkannan, S., P. P. Shih, P. A. Eden, T. Horng, A. R. Zuberi, G. Christianson, D. Roopenian, and N. Shastri. 1998. The molecular and functional characterization of a dominant minor H antigen, H60. *J.Immunol.* 161:3501-3509.
86. Mendoza, L. M., P. Paz, A. Zuberi, G. Christianson, D. Roopenian, and N. Shastri. 1997. Minors held by majors: the H13 minor histocompatibility locus defined as a peptide/MHC class I complex. *Immunity.* 7:461-472.

87. Mendoza, L. M., G. Villaflor, P. Eden, D. Roopenian, and N. Shastri. 2001. Distinguishing self from nonself: immunogenicity of the murine H47 locus is determined by a single amino acid substitution in an unusual peptide. *J.Immunol.* 166:4438-4445.
88. Ostrov, D. A., M. M. Roden, W. Shi, E. Palmieri, G. J. Christianson, L. Mendoza, G. Villaflor, D. Tilley, N. Shastri, H. Grey, S. C. Almo, D. Roopenian, and S. G. Nathenson. 2002. How H13 histocompatibility peptides differing by a single methyl group and lacking conventional MHC binding anchor motifs determine self-nonself discrimination. *J.Immunol.* 168:283-289.
89. Campos-Lima, P. O., V. Levitsky, M. P. Imreh, R. Gavioli, and M. G. Masucci. 1997. Epitope-dependent selection of highly restricted or diverse T cell receptor repertoires in response to persistent infection by Epstein-Barr virus. *J.Exp.Med.* 186:83-89.
90. Pewe, L. L., J. M. Netland, S. B. Heard, and S. Perlman. 2004. Very diverse CD8 T cell clonotypic responses after virus infections. *J.Immunol.* 172:3151-3156.
91. Cole, G. A., T. L. Hogg, and D. L. Woodland. 1994. The MHC class I-restricted T cell response to Sendai virus infection in C57BL/6 mice: a single immunodominant epitope elicits an extremely diverse repertoire of T cells. *Int.Immunol.* 6:1767-1775.
92. Busch, D. H., I. Pilip, and E. G. Pamer. 1998. Evolution of a complex T cell receptor repertoire during primary and recall bacterial infection. *J.Exp.Med.* 188:61-70.
93. Johnston, S. L. and P. J. Wettstein. 1998. Spectratyping of TCR expressed by CTL-infiltrating male antigen (HY)-disparate allografts. *J.Immunol.* 160:3374-3384.
94. Brehm, M. A., A. K. Pinto, K. A. Daniels, J. P. Schneck, R. M. Welsh, and L. K. Selin. 2002. T cell immunodominance and maintenance of memory regulated by unexpectedly cross-reactive pathogens. *Nat.Immunol.* 3:627-634.
95. Malarkannan, S., T. Horng, P. Eden, F. Gonzalez, P. Shih, N. Brouwenstijn, H. Klinge, G. Christianson, D. Roopenian, and N. Shastri. 2000. Differences that matter: major cytotoxic T cell-stimulating minor histocompatibility antigens. *Immunity.* 13:333-344.
96. Eden, P. A., G. J. Christianson, P. Fontaine, P. J. Wettstein, C. Perreault, and D. C. Roopenian. 1999. Biochemical and immunogenetic analysis of an immunodominant peptide (B6dom1) encoded by the classical H7 minor histocompatibility locus. *J.Immunol.* 162:4502-4510.
97. Perreault, C., J. Jutras, D. C. Roy, J. G. Filep, and S. Brochu. 1996. Identification of an immunodominant mouse minor histocompatibility antigen (MiHA). T cell response to a single dominant MiHA causes graft-versus-host disease. *J.Clin.Invest* 98:622-628.
98. Bachmann, M. F., E. Sebzda, T. M. Kundig, A. Shahinian, D. E. Speiser, T. W. Mak, and P. S. Ohashi. 1996. T cell responses are governed by avidity and co-stimulatory thresholds. *Eur.J.Immunol.* 26:2017-2022.
99. Appay, V., D. F. Nixon, S. M. Donahoe, G. M. Gillespie, T. Dong, A. King, G. S. Ogg, H. M. Spiegel, C. Conlon, C. A. Spina, D. V. Havlir, D. D. Richman, A. Waters, P. Easterbrook, A. J. McMichael, and S. L. Rowland-Jones. 2000. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J.Exp.Med.* 192:63-75.
100. Spencer, J. V. and T. J. Braciale. 2000. Incomplete CD8(+) T lymphocyte differentiation as a mechanism for subdominant cytotoxic T lymphocyte responses to a viral antigen. *J.Exp.Med.* 191:1687-1698.

101. McBride, K., C. Baron, S. Picard, S. Martin, D. Boismenu, A. Bell, J. Bergeron, and C. Perreault. 2002. The model B6(dom1) minor histocompatibility antigen is encoded by a mouse homolog of the yeast STT3 gene. *Immunogenetics* 54:562-569.
102. Schuster, M., A. Nechansky, and R. Kircheis. 2006. Cancer immunotherapy. *Biotechnol.J.* 1:138-147.
103. Perreault, C. and S. Brochu. 2002. Adoptive cancer immunotherapy: discovering the best targets. *J.Mol.Med.* 80:212-218.
104. Ernst, B., D. S. Lee, J. M. Chang, J. Sprent, and C. D. Surh. 1999. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity.* 11:173-181.
105. Stefanova, I., J. R. Dorfman, and R. N. Germain. 2002. Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* 420:429-434.
106. Dorfman, J. R., I. Stefanova, K. Yasutomo, and R. N. Germain. 2000. CD4+ T cell survival is not directly linked to self-MHC-induced TCR signaling. *Nat.Immunol.* 1:329-335.
107. Altman, J. D., P. A. Moss, P. J. Goulder, D. H. Barouch, M. G. McHeyzer-Williams, J. I. Bell, A. J. McMichael, and M. M. Davis. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274:94-96.
108. Bousso, P. and E. Robey. 2003. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat.Immunol.* 4:579-585.
109. Gunzer, M., A. Schafer, S. Borgmann, S. Grabbe, K. S. Zanker, E. B. Brocker, E. Kampgen, and P. Friedl. 2000. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity.* 13:323-332.
110. van Stipdonk, M. J., E. E. Lemmens, and S. P. Schoenberger. 2001. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat.Immunol.* 2:423-429.
111. Bousso, P., A. Casrouge, J. D. Altman, M. Haury, J. Kanellopoulos, J. P. Abastado, and P. Kourilsky. 1998. Individual variations in the murine T cell response to a specific peptide reflect variability in naive repertoires. *Immunity.* 9:169-178.
112. Karanikas, V., C. Lurquin, D. Colau, N. van Baren, C. De Smet, B. Lethe, T. Connerotte, V. Corbiere, M. A. Demoitie, D. Lienard, B. Dreno, T. Velu, T. Boon, and P. G. Coulie. 2003. Monoclonal anti-MAGE-3 CTL responses in melanoma patients displaying tumor regression after vaccination with a recombinant canarypox virus. *J.Immunol.* 171:4898-4904.
113. Sherritt, M. A., J. Gardner, S. L. Elliott, C. Schmidt, D. Purdie, G. Deliyannis, W. R. Heath, and A. Suhrbier. 2000. Effect of pre-existing cytotoxic T lymphocytes on therapeutic vaccines. *Eur.J.Immunol.* 30:671-677.
114. Srinivasan, A., J. Foley, and S. J. McSorley. 2004. Massive number of antigen-specific CD4 T cells during vaccination with live attenuated Salmonella causes interclonal competition. *J.Immunol.* 172:6884-6893.
115. Bousso, P., F. Lemaitre, J. Bilsborough, and P. Kourilsky. 2000. Facing two T cell epitopes: a degree of randomness in the primary response is lost upon secondary immunization. *J.Immunol.* 165:760-767.

116. Bouso, P., J. P. Levrard, P. Kourilsky, and J. P. Abastado. 1999. The composition of a primary T cell response is largely determined by the timing of recruitment of individual T cell clones. *J.Exp.Med.* 189:1591-1600.
117. Casanova, J. L. and J. L. Maryanski. 1993. Antigen-selected T-cell receptor diversity and self-nonsel homology. *Immunol.Today* 14:391-394.
118. Dietrich, P. Y., P. R. Walker, A. L. Quiquerez, G. Perrin, V. Dutoit, D. Lienard, P. Guillaume, J. C. Cerottini, P. Romero, and D. Valmori. 2001. Melanoma patients respond to a cytotoxic T lymphocyte-defined self-peptide with diverse and nonoverlapping T-cell receptor repertoires. *Cancer Res.* 61:2047-2054.
119. Wallace, M. E., M. Bryden, S. C. Cose, R. M. Coles, T. N. Schumacher, A. Brooks, and F. R. Carbone. 2000. Junctional biases in the naive TCR repertoire control the CTL response to an immunodominant determinant of HSV-1. *Immunity.* 12:547-556.
120. Bouneaud, C., P. Kourilsky, and P. Bouso. 2000. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity.* 13:829-840.
121. Fontaine, P., G. Roy-Proulx, L. Knafo, C. Baron, D. C. Roy, and C. Perreault. 2001. Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat.Med.* 7:789-794.
122. Kedzierska, K., S. J. Turner, and P. C. Doherty. 2004. Conserved T cell receptor usage in primary and recall responses to an immunodominant influenza virus nucleoprotein epitope. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:4942-4947.
123. McHeyzer-Williams, L. J., J. F. Panus, J. A. Mikszta, and M. G. McHeyzer-Williams. 1999. Evolution of antigen-specific T cell receptors in vivo: preimmune and antigen-driven selection of preferred complementarity-determining region 3 (CDR3) motifs. *J.Exp.Med.* 189:1823-1838.
124. Turner, S. J., K. Kedzierska, H. Komodromou, N. L. La Gruta, M. A. Dunstone, A. I. Webb, R. Webby, H. Walden, W. Xie, J. McCluskey, A. W. Purcell, J. Rossjohn, and P. C. Doherty. 2005. Lack of prominent peptide-major histocompatibility complex features limits repertoire diversity in virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell populations. *Nat.Immunol.* 6:382-389.
125. Laouar, Y. and I. N. Crispe. 2000. Functional flexibility in T cells: independent regulation of CD4<sup>+</sup> T cell proliferation and effector function in vivo. *Immunity.* 13:291-301.
126. Gea-Banacloche, J. C., S. A. Migueles, L. Martino, W. L. Shupert, A. C. McNeil, M. S. Sabbaghian, L. Ehler, C. Prussin, R. Stevens, L. Lambert, J. Altman, C. W. Hallahan, J. C. de Quiros, and M. Connors. 2000. Maintenance of large numbers of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells in HIV-infected progressors and long-term nonprogressors. *J.Immunol.* 165:1082-1092.
127. Sutton, V. R., D. L. Vaux, and J. A. Trapani. 1997. Bcl-2 prevents apoptosis induced by perforin and granzyme B, but not that mediated by whole cytotoxic lymphocytes. *J.Immunol.* 158:5783-5790.
128. Huppa, J. B., M. Gleimer, C. Sumen, and M. M. Davis. 2003. Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nat.Immunol.* 4:749-755.
129. Gett, A. V., F. Sallusto, A. Lanzavecchia, and J. Geginat. 2003. T cell fitness determined by signal strength. *Nat.Immunol.* 4:355-360.

130. Kieper, W. C., J. T. Burghardt, and C. D. Surh. 2004. A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J.Immunol.* 172:40-44.
131. Smith, K., B. Seddon, M. A. Purbhoo, R. Zamoyska, A. G. Fisher, and M. Merkenschlager. 2001. Sensory adaptation in naive peripheral CD4 T cells. *J.Exp.Med.* 194:1253-1261.
132. Wong, P., G. M. Barton, K. A. Forbush, and A. Y. Rudensky. 2001. Dynamic tuning of T cell reactivity by self-peptide-major histocompatibility complex ligands. *J.Exp.Med.* 193:1179-1187.
133. Kassiotis, G., R. Zamoyska, and B. Stockinger. 2003. Involvement of avidity for major histocompatibility complex in homeostasis of naive and memory T cells. *J.Exp.Med.* 197:1007-1016.
134. Slifka, M. K. and J. L. Whitton. 2001. Functional avidity maturation of CD8(+) T cells without selection of higher affinity TCR. *Nat.Immunol.* 2:711-717.
135. Gonzalez, P. A., L. J. Carreno, D. Coombs, J. E. Mora, E. Palmieri, B. Goldstein, S. G. Nathanson, and A. M. Kalergis. 2005. T cell receptor binding kinetics required for T cell activation depend on the density of cognate ligand on the antigen-presenting cell. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:4824-4829.
136. Derby, M. A., J. Wang, D. H. Margulies, and J. A. Berzofsky. 2001. Two intermediate-avidity cytotoxic T lymphocyte clones with a disparity between functional avidity and MHC tetramer staining. *Int.Immunol.* 13:817-824.
137. Alam, S. M., G. M. Davies, C. M. Lin, T. Zal, W. Nasholds, S. C. Jameson, K. A. Hogquist, N. R. Gascoigne, and P. J. Travers. 1999. Qualitative and quantitative differences in T cell receptor binding of agonist and antagonist ligands. *Immunity.* 10:227-237.
138. Lyons, D. S., S. A. Lieberman, J. Hampl, J. J. Boniface, Y. Chien, L. J. Berg, and M. M. Davis. 1996. A TCR binds to antagonist ligands with lower affinities and faster dissociation rates than to agonists. *Immunity.* 5:53-61.
139. Dutoit, V., P. Guillaume, J. C. Cerottini, P. Romero, and D. Valmori. 2002. Dissecting TCR-MHC/peptide complex interactions with A2/peptide multimers incorporating tumor antigen peptide variants: crucial role of interaction kinetics on functional outcomes. *Eur.J.Immunol.* 32:3285-3293.
140. Crawford, F., H. Kozono, J. White, P. Marrack, and J. Kappler. 1998. Detection of antigen-specific T cells with multivalent soluble class II MHC covalent peptide complexes. *Immunity.* 8:675-682.
141. Baker, B. M., S. J. Gagnon, W. E. Biddison, and D. C. Wiley. 2000. Conversion of a T cell antagonist into an agonist by repairing a defect in the TCR/peptide/MHC interface: implications for TCR signaling. *Immunity.* 13:475-484.
142. Kersh, G. J., E. N. Kersh, D. H. Fremont, and P. M. Allen. 1998. High- and low-potency ligands with similar affinities for the TCR: the importance of kinetics in TCR signaling. *Immunity.* 9:817-826.
143. Gakamsky, D. M., I. F. Luescher, and I. Pecht. 2004. T cell receptor-ligand interactions: a conformational preequilibrium or an induced fit. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:9063-9066.

144. Kalergis, A. M., N. Boucheron, M. A. Doucey, E. Palmieri, E. C. Goyarts, Z. Vegh, I. F. Luescher, and S. G. Nathenson. 2001. Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. *Nat.Immunol.* 2:229-234.
145. Lee, S. J., Y. Hori, J. T. Groves, M. L. Dustin, and A. K. Chakraborty. 2002. Correlation of a dynamic model for immunological synapse formation with effector functions: two pathways to synapse formation. *Trends Immunol.* 23:492-499.
146. Fahmy, T. M., J. G. Bieler, M. Edidin, and J. P. Schneck. 2001. Increased TCR avidity after T cell activation: a mechanism for sensing low-density antigen. *Immunity.* 14:135-143.
147. Margulies, D. H. 2001. TCR avidity: it's not how strong you make it, it's how you make it strong. *Nat.Immunol.* 2:669-670.
148. Bachmann, M. F. and P. S. Ohashi. 1999. The role of T-cell receptor dimerization in T-cell activation. *Immunol.Today* 20:568-576.
149. Holler, P. D., L. K. Chlewicki, and D. M. Kranz. 2003. TCRs with high affinity for foreign pMHC show self-reactivity. *Nat.Immunol.* 4:55-62.
150. Manivel, V., N. C. Sahoo, D. M. Salunke, and K. V. Rao. 2000. Maturation of an antibody response is governed by modulations in flexibility of the antigen-combining site. *Immunity.* 13:611-620.
151. van der Merwe, P. A. and S. J. Davis. 2003. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 21:659-684.
152. Chen, J. L., G. Stewart-Jones, G. Bossi, N. M. Lissin, L. Wooldridge, E. M. Choi, G. Held, P. R. Dunbar, R. M. Esnouf, M. Sami, J. M. Boulter, P. Rizkallah, C. Renner, A. Sewell, P. A. van der Merwe, B. K. Jakobsen, G. Griffiths, E. Y. Jones, and V. Cerundolo. 2005. Structural and kinetic basis for heightened immunogenicity of T cell vaccines. *J.Exp.Med.* 201:1243-1255.
153. Barrett, A. J., O. Ringden, M. J. Zhang, A. Bashey, J. Y. Cahn, M. S. Cairo, R. P. Gale, A. Gratwohl, F. Locatelli, R. Martino, K. R. Schultz, and P. Tiberghien. 2000. Effect of nucleated marrow cell dose on relapse and survival in identical twin bone marrow transplants for leukemia. *Blood* 95:3323-3327.
154. Pion, S., P. Fontaine, C. Baron, M. Gyger, and C. Perreault. 1995. Immunodominant minor histocompatibility antigens expressed by mouse leukemic cells can serve as effective targets for T cell immunotherapy. *J.Clin.Invest* 95:1561-1568.
155. Festing, M. F. and T. H. Roderick. 1989. Correlation between genetic distances based on single loci and on skeletal morphology in inbred mice. *Genet.Res.* 53:45-55.

