

Université de Montréal

**Réponse cellulaire pan-spécifique : analyse de la
présentation d'antigènes conservés du virus de
l'influenza**

par

Jean-Daniel Doucet

Département de sciences biomédicales
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en sciences biomédicales

Août, 2010

© Jean-Daniel Doucet, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Réponse cellulaire pan-spécifique : analyse de la présentation d'antigènes conservés
du virus de l'influenza**

présenté par :
Jean-Daniel Doucet

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-François Cailhier, président-rapporteur

Réjean Lapointe, directeur de recherche

Nathalie Labrecque, membre du jury

Résumé

Les méthodes de vaccination actuelles contre l'influenza, axées sur la réponse à anticorps dirigée contre des antigènes hautement variables, nécessitent la production d'un vaccin pour chaque nouvelle souche. Le défi est maintenant de stimuler simultanément une réponse cellulaire pan-spécifique ciblant des antigènes conservés du virus, tel que la protéine de la matrice (M1) ou la nucléoprotéine (NP). Or, la présentation antigénique de ces protéines est peu définie chez l'humain. Nous avons analysé la présentation endogène par les complexes majeurs d'histocompatibilité de classes (CMH)-I et -II de M1 et de NP.

Ainsi, les protéines M1 et NP ont été exprimées dans des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs). Notamment, des épitopes de M1 et de NP endogènes peuvent être présentées par CMH-I et -II, ce qui résulte en une activation respectivement de lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ précédemment isolés. Étant donné l'importance des lymphocytes T CD4⁺ dans la réponse cellulaire, nous avons cloné M1 ou NP en fusion avec des séquences de la protéine gp100 permettant la mobilisation vers les compartiments du CMH-II sans affecter la présentation par CMH-I. Des CPAs exprimant de façon endogène ces constructions modifiées ou sauvages ont ensuite été utilisées pour stimuler *in vitro* des lymphocytes T humains dont la qualité a été évaluée selon la production de cytokines et la présence de molécules de surface (ELISA ou marquage de cytokines intracellulaire). Nous avons observé une expansion de lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ effecteurs spécifiques sécrétant diverses cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF, MIP-1 β) dans des proportions comparables avec une présentation par CMH-II basale ou améliorée. Cette qualité indépendante du niveau de présentation endogène par CMH-II de M1 et de NP des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ suggère que cette présentation est suffisante à court terme.

En outre, la présentation endogène de M1 et NP a permis de stimuler des lymphocytes T spécifiques à des épitopes conservés du virus, tel qu'identifié à l'aide une méthode d'identification originale basée sur des segments d'ARNm, « mRNA PCR-based epitope chase (mPEC) ». Ensemble, ces nouvelles connaissances sur la présentation antigénique de M1 et de NP pourraient servir à établir de nouvelles stratégies vaccinales pan-spécifiques contre l'influenza.

Mots-clés

Influenza, Antigènes conservés, Protéine de la matrice M1, Nucléoprotéine (NP), Réponse immunitaire à médiation cellulaire, Présentation par complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), Sensibilisation de lymphocytes T *in vitro*, Lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, Cartographie d'épitope.

Abstract

New vaccines targeting hyper-variable influenza determinants must be prepared against every new strain. The challenge is now to develop influenza vaccines also eliciting a strong and sustained cytotoxic response against highly-conserved determinants such as the matrix (M1) and nuclear (NP) proteins. However, their antigenic presentation properties in humans are less defined. We, therefore, analyzed major histocompatibility complex class (MHC)-I and -II presentation of endogenously processed M1 and NP in human antigen presenting cells (APCs).

To do so, we used APCs endogenously-expressing the M1 and NP proteins. M1 and NP epitopes can be presented by MHC-I and -II, which results in the activation of previously-isolated antigen-specific CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes. Considering the importance of CD4⁺ T lymphocytes in the cellular immune response, we cloned M1 and NP proteins in fusion with gp100 MHC-II enhancing sequences, which do not disrupt MHC-I presentation. APCs expressing MHC-II-enhanced or wild type constructs were used to stimulate human T lymphocytes *in vitro* and quality of antigen presentation was evaluated on the basis of cytokine production and cell surface molecule expression (ELISA or intracellular cytokine staining). We expanded antigen-specific effector CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes which secreted pro-inflammatory cytokines (IFN- γ , TNF and MIP-1 β) to similar extents both with and without MHC-II enhancement. The quality of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes generated independent of the level of M1 and NP endogenous MHC-II presentation suggests that this presentation is sufficient for short-term T lymphocyte stimulation.

Thus, endogenous expression of M1 and NP have stimulated T lymphocytes specific to conserved influenza epitopes, as determined by an original identification technique based on mRNA segments called mRNA PCR-based epitope chase (mPEC). Overall, these new insights about T lymphocytes expanded following MHC-I and -II presentation of endogenous M1 and NP could prove useful for new complementary heterosubtypic vaccination strategies.

Keywords

Influenza virus, Conserved antigens, Matrix protein M1, Nucleoprotein (NP), Cellular immune response, Major histocompatibility complexes (MHC) presentation, T cell sensitization, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, Epitope mapping.

Table des matières

Résumé.....	iii
Mots-clés.....	iv
Abstract.....	v
Keywords.....	vi
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations.....	xv
Remerciements.....	xviii
Avant-propos.....	1
Chapitre 1. Introduction.....	2
1.1 Caractéristiques du virus de l'influenza.....	3
1.1.1 Caractéristiques générales du virus de l'influenza.....	3
1.1.1.1 Classification.....	3
1.1.1.2 Cycle de réplication et génétique.....	4
1.1.2 Épidémiologie du virus de l'influenza.....	6
1.1.2.1 Variabilité génétique.....	6
1.1.2.2 Infections animales et réassortiment génétique.....	7
1.1.2.3 Épidémie saisonnière.....	9
1.1.2.3.1 Tropisme.....	9
1.1.2.3.2 Symptômes et mortalité.....	10
1.1.2.4 Pandémies.....	10
1.1.2.4.1 La grippe espagnole de 1918.....	10
1.1.2.4.2 1957-58 : Grippe asiatique.....	14
1.1.2.4.3 1968 : Grippe de Hong-Kong.....	14
1.1.2.4.4 Menaces de pandémies actuelles.....	15
1.1.2.4.4.1 Grippe A H1N1.....	15
1.1.2.4.4.2 H5N1.....	18
1.2 Vaccination contre l'influenza.....	19

1.2.1 Efficacité limitée des vaccins saisonniers à sous-unités inactivés contre l'influenza	20
1.2.1.1 Population générale.....	20
1.2.1.2 Groupes à risque.....	21
1.2.2 Efficacité limitée des vaccins à sous-unités inactivés contre l'influenza en situation pandémique	22
1.2.2.1 Pandémie A/H1N1	22
1.2.2.2 H5N1	23
1.3 Protection hétérosubtypique contre le virus de l'influenza.....	24
1.3.1 Méthodes de vaccination alternatives	24
1.3.1.1 Méthodes homologuées alternatives de vaccination contre l'influenza.....	24
1.3.1.1.1 Vaccins à sous-unités inactivés adjuvés.....	24
1.3.1.1.2 Vaccins à base de virus vivants atténués (VVAs).....	25
1.3.1.2 Méthodes alternatives en développement de vaccination contre l'influenza.....	27
1.3.1.2.1 Vaccin à ADN	27
1.3.1.2.2 Particules pseudovirales et vecteurs viraux.....	29
1.3.1.2.3 Anticorps neutralisants.....	29
1.3.1.2.4 Immunité innée et vitamine D.....	30
1.3.1.2.5 Antiviraux de synthèse.....	31
1.3.2 Protection hétérosubtypique contre l'influenza : Réponse immunitaire à médiation cellulaire contre le virus de l'influenza.....	32
1.3.2.1 Modèles animaux	32
1.3.2.2 Humains	34
1.3.2.2.1 Protection offerte par la réponse immunitaire à médiation cellulaire hétérosubtypique	34
1.3.2.2.2 Étendue de la réponse immunitaire à médiation cellulaire hétérosubtypique	36
1.3.2.2.3 Réponse immunitaire à médiation cellulaire hétérosubtypique et personnes âgées.....	37

1.3.2.2.4 Stimulation d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire hétérosubtypique	37
1.3.3 Réponse immunitaire à médiation cellulaire mémoire efficace	38
1.3.3.1 Caractéristiques post-stimulation	38
1.3.3.1.1 Polyfonctionnalité	38
1.3.3.1.2 Marqueurs de surface cellulaire	39
1.3.3.2 Présentation antigénique initiale efficace.....	40
1.3.3.2.1 Cellules présentatrices d'antigène.....	40
1.3.3.2.2 Aide des lymphocytes T CD4 ⁺	42
1.3.4 Optimisation de la présentation par CMH-II : Mobilisation intracellulaire d'antigènes	44
1.3.4.1 Maturation extrinsèque des CPAs : adjuvants	44
1.3.4.2 Optimisation de la présentation antigénique endogène : séquences de mobilisation vers les endosomes de gp100	45
1.3.5 Hypothèse et objectifs du projet de maîtrise	47
1.3.5.1 Hypothèse.....	48
1.3.5.2 Objectifs	48
Chapitre 2. Manuscrit: Endogenously-expressed influenza A M1 and NP proteins are efficiently presented by class-I and-II major histocompatibility complexes	49
Summary	50
Introduction.....	51
Results.....	53
<i>Efficient presentation of MHC-I and -II epitopes derived from M1 and NP to human CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes</i>	53
<i>Expansion of human T lymphocytes by in vitro T cell sensitization with endogenously-expressed M1 and NP</i>	54
<i>Effector cytokine secretion of M1- and NP-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell.....</i>	55
<i>Phenotype of M1- and NP-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells</i>	56
Discussion	57
Materials and methods	61

References.....	65
Supplementary methods.....	77
Supplementary results.....	78
Supplementary figures and tables.....	79
Supplementary References.....	92
Chapitre 3. Discussion.....	93
3.1 Sommaire des résultats.....	93
3.2 Induction d'une réponse cellulaire efficace contre l'influenza.....	94
3.2.1 Choix du modèle expérimental.....	94
3.2.2 Importance de la réponse cellulaire contre l'influenza chez l'humain.....	96
3.2.2.1 Prérequis pour une réponse à médiation cellulaire mémoire efficace.....	97
3.2.2.1.1 Large éventail de cibles (A).....	97
3.2.2.1.2 Cytokines homéostatiques (B).....	98
3.2.2.1.3 Éviter l'immunodominance (C).....	98
3.2.2.1.4 Neutraliser les mécanismes antiviraux : Gène NS1 (D).....	99
3.2.2.2 Caractérisation des fonctions effectrices d'une réponse cellulaire efficace contre l'influenza.....	99
3.2.2.3 Caractérisation des marqueurs de surface d'une réponse cellulaire efficace contre l'influenza.....	100
3.2.2.4 Présentation croisée par CMH-II de M1 et NP dans la réponse cellulaire contre l'influenza chez l'humain.....	101
3.2.3 Induction d'une réponse cellulaire contre l'influenza chez l'humain.....	106
3.2.3.1 Vaccins actuels induisant une réponse cellulaire contre l'influenza.....	106
3.2.3.2 Fréquence d'administration.....	108
3.2.3.3 Identification d'épitopes conservés spécifiques au virus de l'influenza....	109
Chapitre 4. Conclusions et perspectives générales.....	112
Bibliographie.....	I

Annexe 1. Fonction des composantes du virus de l'influenza et leurs rôles dans la pathogenèse des virus H5N1 aviaire et pandémique H1N1 de 1918.....	XVIII
Annexe 2. Provenance des différents cas confirmés d'infection humaine par le virus H5N1 aviaire.....	XIX
Annexe 3. Schéma de la production d'un vaccin contre l'influenza à sous-unités inactivé.	XX
Annexe 4. Un des modèles actuels de la polyfonctionnalité des lymphocytes T mémoires pendant leur processus de différenciation.....	XXI
Annexe 5. Brief Communication: Identification of T cell epitopes by a novel mRNA PCR-based epitope chase technique	XXII
Curriculum vitae	XLVI

Liste des tableaux

Chapitre 2

Supplementary Table 1m. Amino acid conservancy in proteins from different well-known influenza A strains and clades.....	90
---	----

Chapitre 3

Tableau I. Prérequis généraux pour une réponse à médiation cellulaire mémoire efficace contre le virus de l'influenza.....	97
---	----

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1. Schéma du virion de l'influenza.	4
Figure 2. Cycle de réplication du virus de l'influenza.	5
Figure 3. Exemple de réassortiment génétique entre les virus 1 et 2 chez le porc.	7
Figure 4. Courbe de mortalité de la pandémie d'influenza de 1918.	13
Figure 5. Provenance des segments du virus H1N1 pandémique de 2009.	16
Figure 6. Schéma d'une souche recombinante atténuée du virus de l'influenza ayant acquis les gènes HA et NA d'une nouvelle souche circulante contre laquelle un vaccin VVA sera produit.	26
Figure 7. Exemple des 3 signaux requis pour l'activation d'un lymphocyte T CD4 ⁺ par une cellule présentatrice d'antigène.	40

Chapitre 2

Figure 1m. MHC-I and -II presentation of endogenously-expressed influenza M1 and NP.	69
Figure 2m. Characterization of human T lymphocytes expanded by <i>in vitro</i> sensitization with endogenously-expressed M1 and NP.	69
Figure 3m. Effector cytokine secretion by CD8 ⁺ T lymphocytes specific to M1 or NP, with or without enhancement of MHC-II presentation.	70
Figure 4m. Effector cytokine secretion by CD4 ⁺ T lymphocytes specific to M1 or NP, with or without enhancement of MHC-II presentation.	70
Figure 5. Surface effector phenotype of T lymphocytes specific to M1 or NP, with or without enhancement of MHC-II presentation.	71

Supplementary Figure 1m. Characterization of T lymphocytes expanded by <i>in vitro</i> sensitization with gp-M1 expressed by APCs.....	81
Supplementary Figure 2m. Gating for human ICS analysis.	83
Supplementary Figure 3m. Other effector arms employed by human T lymphocytes expanded by <i>in vitro</i> sensitization with endogenously-expressed M1 and NP.....	85
Supplementary Figure 4m. Surface effector phenotype of T lymphocytes specific to M1 or NP, with or without enhancement of MHC-II presentation.....	87
Supplementary Figure 5m. IFN- γ secretion by NP-specific murine effector CD8+ T lymphocytes.	89

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

CCR5 : C-C chemokines receptor type 5

CD : « Cluster of differentiation »

CD40-B: Lymphocytes B activés par le CD40L

CD40L : Ligand de CD40

CDC : « Center for disease control and prevention »

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe

CPA: Cellule présentatrice d'antigène

DC : Cellule dendritique

EBV-B: Lymphocytes B immortalisés par le virus Epstein-Barr

ELISpot : « Enzyme-linked immunosorbent spot »

Gp : Glycoprotéine

HA : Hémagglutinine

HLA : « Human Leukocyte Antigen »

HPAI : Virus de l'influenza aviaires hautement pathogènes

IFN: Interféron

Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine

IP : « Interferon inducible protein »

ISCOM : « Immune stimulating complex »

LPAI : Virus de l'influenza aviaires faiblement pathogènes

OMS : Organisation mondiale de la santé

PA : Polymérase acide

PB1 : Polymérase 1

PB2 : Polymérase 2

PBMC : Cellule mononucléaires du sang périphérique

M1 : Protéine de la matrice 1

M2 : Protéine de la matrice 2

MIP : « Macrophage inflammatory protein »
mPEC : « mRNA PCR-based epitope chase »
NA : Neuraminidase
NLS : Séquences de localisation nucléaire
NP : Nucléoprotéine
NS1 : Protéine non-structurale 1
NS2 : Protéine non-structurale 2
TCR: Récepteur des lymphocytes T
RNPv : Complexe ribonucléoprotéique viral
TAP : « Transporter associated with antigen processing »
TBK1 : TANK-binding kinase 1
Tcm : Lymphocyte T mémoire central
Tem : Lymphocyte T mémoire effecteur
Th1: « T-helper 1 »
TLR : Récepteurs de type Toll
TNF : « Tumor necrosis factor »
VVA : Vaccin à base de virus vivants atténués

À Christiane

Remerciements

La rédaction de ce mémoire a nécessité l'apport de nombreuses personnes. D'abord, je tiens à remercier toute ma famille dont le soutien tacite a réellement été la pierre d'assise de tout ce travail. Je tiens aussi à souligner la compréhension et la souplesse du directeur du programme de sciences biomédicales, le Dr Lajeunesse, qui m'a permis de terminer ma maîtrise malgré les circonstances. Le financement de plusieurs organismes (IRSC, FRSQ, CRCHUM, ICM et Immunologie-Montréal) a également été crucial. Ensuite, je me dois de mentionner individuellement les membres du laboratoire avec qui j'ai bâti ce mémoire :

Cécile, merci d'avoir initialement mis le projet sur les rails avant de me le léguer généreusement. Ne perds pas ta sympathique folie, sauf quand les gens essaient de lire, de manipuler ou d'écrire des articles.

Jessica, j'ai toujours apprécié la concision et l'efficacité de tes conseils, autant scientifiques que personnels. Merci *fillette*, j'ai beaucoup appris en te regardant.

Reuben, merci d'avoir été là, *men*, et d'avoir partagé avec moi tous ces moments de gars. Je vais sérieusement m'ennuyer de toi.

Laïla, c'est toujours un plaisir de discuter avec toi, particulièrement de sciences et de technologies. Un jour tu feras rire les gens. En attendant, poursuis en science au cas où le rire ne fonctionnerait pas.

Dominique, merci pour ta patience et ton soutien. Malgré ton défaitisme indéniable, mais grâce à ton soutien à tous les niveaux, j'ai pu terminer ma maîtrise et je t'en suis plus reconnaissant que tu ne le penses.

Mary, merci pour tous les efforts que tu as mis dans ce projet. Merci d'avoir été présente scientifiquement et personnellement. Merci aussi d'avoir exigé plus de moi. Tu as certainement contribué à ma progression.

Réjean, dernier, mais non le moindre, merci d'avoir fait preuve d'une grande patience et d'une grande compassion envers moi, tout en me poussant à me dépasser. Il faut que l'oiseau apprenne à voler par lui-même, mais il faut parfois le pousser en bas du nid.

Finalement, un merci incalculable à Christiane qui m'a stoïquement soutenu tout au long de ma maîtrise et à qui est dédié ce mémoire.

Avant-propos

Mon intérêt pour les stratégies originales de traitement du cancer m'a poussé à entreprendre des études de 2e cycle dans le laboratoire d'immuno-oncologie du Dr Réjean Lapointe, avec comme objectif de poursuivre en recherche dans ce domaine. Les circonstances m'ont amené à travailler sur le virus de l'influenza, sujet que j'ai appris à découvrir et à aimer à travers tout le processus ayant mené à ce mémoire.

Au-delà du virus de la grippe, j'ai également eu l'occasion de me familiariser avec les mécanismes fascinants du système immunitaire et les façons d'en optimiser le fonctionnement. Ces connaissances auxquelles j'ai été exposé ont stimulé ma curiosité scientifique qui, je l'espère, me suivra tout au long de ma carrière.

Chapitre 1. Introduction

Objectif général et structure du mémoire

En introduction, je présenterai les caractéristiques générales du virus de l'influenza en traitant de son cycle de réplication et de sa classification phylogénétique. En lien avec ces caractéristiques, je traiterai par la suite de l'épidémiologie du virus de l'influenza ainsi que de l'impact considérable des pandémies d'influenza modernes causées par le virus. J'aborderai ensuite les techniques de vaccination actuelles utilisées pour contrer l'influenza et soulignerai leurs limites. Afin de palier ces lacunes, je soulèverai la possibilité d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire mémoire pan-spécifique (hétérosubtypique) contre le virus de l'influenza et mentionnerai quelques caractéristiques d'une telle réponse efficace.

À travers le manuscrit du chapitre 2, je tenterai de mieux caractériser certains aspects méconnus de la présentation endogène d'antigènes conservés de la réponse immunitaire à médiation cellulaire pan-spécifique contre le virus de l'influenza. Je discuterai plus amplement des implications de ces résultats dans les chapitres 3 et 4. Finalement, on retrouve, en Annexe 5, un 2^e manuscrit traitant d'une méthode originale de cartographie d'épitopes ayant servi à identifier de nouvelles cibles conservées de l'influenza. En somme, l'objectif du présent mémoire est de caractériser la présentation d'antigènes conservés dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire dirigée contre le virus de l'influenza.

1.1 Caractéristiques du virus de l'influenza

1.1.1 Caractéristiques générales du virus de l'influenza

1.1.1.1 Classification

Le virus de l'influenza est un virus enveloppé à ARN simple brin négatif faisant partie de la famille des *orthomyxoviridae*. Il existe 3 types d'influenza, A, B et C, qui sont classés en fonction des séquences de leurs gènes codant pour les protéines de la matrice (M1) et la nucléoprotéine (NP), 2 gènes bien conservés à l'intérieur d'un même type viral (1) (voir section suivante). Les virus de type A et B sont généralement responsables des épidémies de grippe saisonnières, alors que les virus de type C ne sont que rarement associés à des cas d'infections humaines (1, 2). De plus, toutes les pandémies d'influenza du 20^e et du 21^e siècle ont été causées par un virus de type A (2). Par conséquent, tout au long de cet ouvrage, je référerai aux virus d'influenza de type A, sauf lorsque mentionné.

Le génome à ARN du virus de l'influenza est composé de 8 segments contenant 11 gènes codant chacun pour leur protéine respective (Figure 1 et Annexe 1). Parmi celles-ci, les glycoprotéines de surface hémagglutinine (HA) et neuraminidase (NA) sont particulièrement hypervariables en raison des erreurs fréquentes de la polymérase du virus. Les glycoprotéines HA et NA occupent un rôle majeur dans l'épidémiologie du virus de l'influenza, entre autres de par leur grande variabilité (voir section suivante). Pour cette raison, le polymorphisme antigénique de glycoprotéines HA et NA est utilisé comme critère de classement phylogénétique des virus de l'influenza en sous type. À l'heure actuelle, 16 différents HA (HA1-16) et 9 NA (NA1-9) ont été répertoriés (3). Ces sous-types, déterminés par les combinaisons entre les différents HA et NA, sont divisés en souches que l'on nomme en fonction du lieu, du numéro et de la date de leur isolement. Par exemple, une des souches de la pandémie de grippe H1N1 de 2009 isolée en Californie s'identifie comme suit : A/California/04/2009 (H1N1) (4). Dans le cas d'un virus autre qu'humain, l'animal hôte devra également être mentionné.

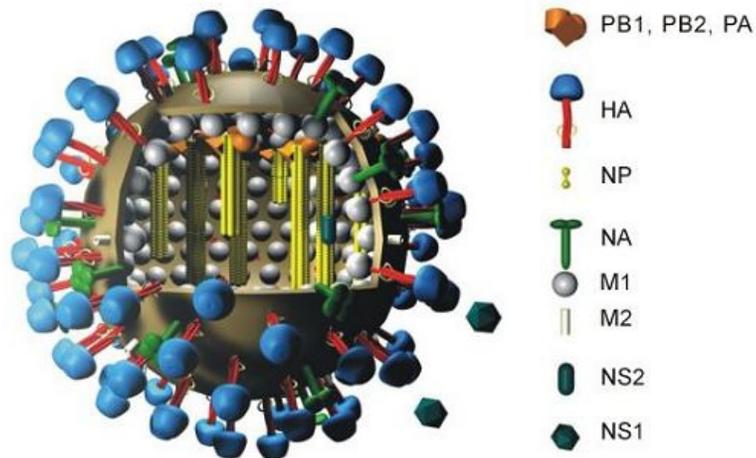


Figure 1. Schéma du virion de l'influenza.

Image provenant du Dr. Markus Eickmann, Institute for Virology, Marburg, Allemagne, utilisée avec permission. - <http://www.biografix.de>.

1.1.1.2 Cycle de réplication et génétique

Chez l'humain, le virus de l'influenza infecte principalement les cellules épithéliales du tractus respiratoire, la voie d'entrée du virus dans l'organisme. Celui-ci adhère aux cellules épithéliales par l'intermédiaire de la glycoprotéine HA qui lie les acides N-acétylneuraminiques (sialiques) présents au bout de glycoconjugués retrouvés à la surface de plusieurs types cellulaires (Figure 2, a). La glycoprotéine HA doit cependant être clivée par des protéases trypsiques extracellulaires retrouvées surtout dans les voies respiratoires humaines au niveau d'une arginine conservée afin d'être activée (5). À la suite de la liaison de HA aux acides sialiques, le virus est internalisé dans un endosome (b). L'acidité du pH endosomal amène un changement conformationnel de HA qui permet une fusion entre les membranes de l'endosome et du virus dépendante de la pompe à proton M2 (c). Le complexe ribonucléoprotéique viral (RNPv) composé des sous-unités PB1, PB2 et PA de l'ARN polymérase ARN dépendante, et de la nucléoprotéine (NP) est ainsi relâché dans le cytosol (6, 7). Par la suite, les séquences de localisation nucléaire (NLS) de NP permettent au complexe RNPv de pénétrer dans le noyau cellulaire (8) et de répliquer l'ARNv (d). Une partie de l'ARN synthétisé sert de gabarit pour la synthèse de nouveaux fragments d'ARN de sens négatif alors que l'autre partie, qui sert d'ARNm, est exportée vers le cytoplasme

pour la synthèse protéique (f). Les glycoprotéines HA et NA synthétisées *de novo* (g) sont ensuite dirigées vers la membrane cellulaire, alors que les protéines M1 et NP reviendront vers le noyau (h). Celles-ci joueront ensuite un rôle important dans l'export du noyau des RNPv (j) vers la membrane cellulaire où aura lieu l'assemblage (k). La protéine M1 se retrouve également dans le noyau en association avec les filaments d'actine (9), alors que NP est quasi exclusivement nucléaire durant la réplication (10). Une fois que les 8 segments d'ARN sont réunis à la membrane cellulaire, le virus bourgeonne par un processus probablement régulé par l'accumulation de la protéine M1. Finalement, la protéine NA clivera le récepteur d'acide sialique afin de permettre l'excrétion et la propagation du virus (6, 7).

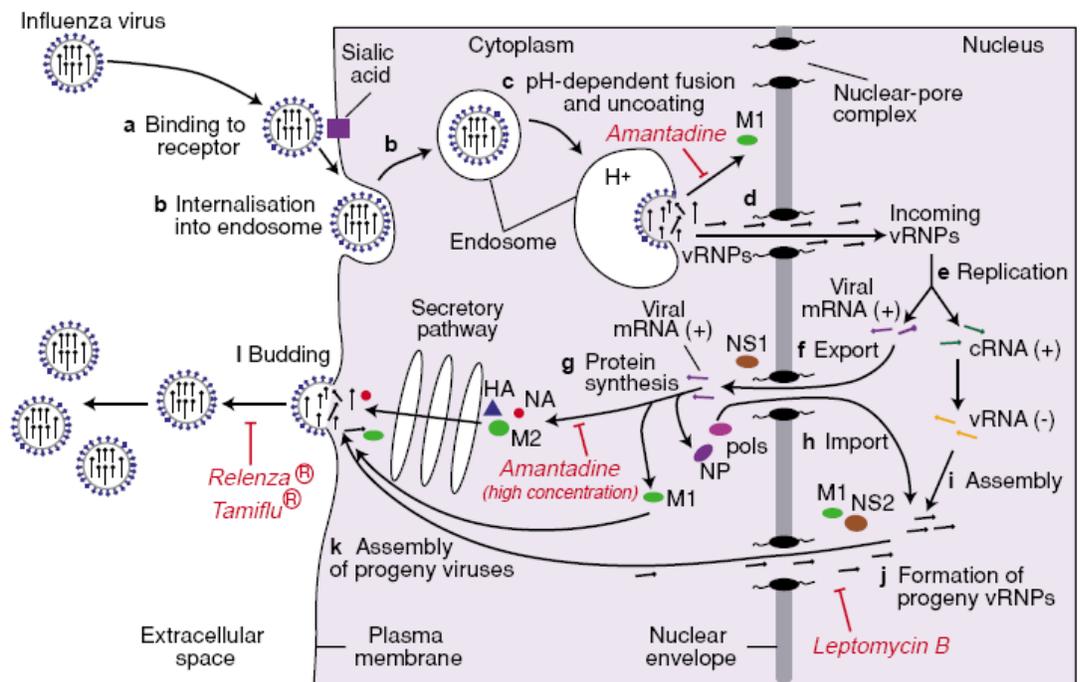


Figure 2. Cycle de réplication du virus de l'influenza.

Tirée de Whittaker, Expert review in molecular medicine, 2001 (6).

1.1.2 Épidémiologie du virus de l'influenza

1.1.2.1 Variabilité génétique

Le virus de l'influenza a une forte capacité de mutation qui s'explique par 2 phénomènes (11).

D'abord, le **glissement antigénique** (« **antigenic drift** ») est défini comme l'apparition de nouvelles souches virales capables d'échapper partiellement à la mémoire immunitaire acquise lors d'infections précédentes. Cette variation des antigènes s'explique par un taux élevé d'erreur de la polymérase virale qui ne possède pas de fonction de relecture, ce qui entraîne une accumulation de mutations dans le génome du virus de l'influenza (12). Ces mutations ne sont cependant généralement pas suffisantes pour entraîner l'apparition directe de nouveaux sous-types viraux.

Le réassortiment antigénique (« **antigenic shift** ») est quant à lui défini comme l'apparition d'un sous-type ou d'une souche d'influenza différente des virus en circulation pour lequel ou laquelle la population ne possède pas ou peu d'anticorps neutralisants. Par conséquent, ces virus peuvent facilement se propager. Les virus responsables des dernières pandémies provenaient notamment de réassortiment antigénique. Le réassortiment antigénique est généralement dû à un échange de fragments, typiquement HA et NA, entre différents sous-types du virus co-infectant un même hôte (voir Figure 3). De tels changements peuvent survenir entre des souches humaines et animales (par ex. souches aviaires et porcines) du virus. Les souches animales constituent ainsi un pool de nouveaux antigènes pour les virus humains.

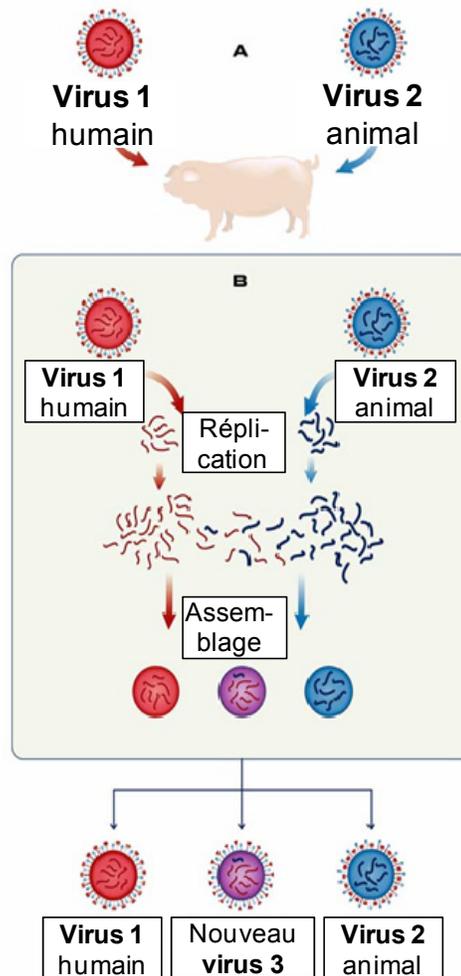


Figure 3. Exemple de réassortiment génétique entre les virus 1 et 2 chez le porc.

Adapté du site web www.learner.org.

Ensemble, le glissement et le réassortiment antigénique vont amener l'apparition de nouvelles souches pour lesquelles le système immunitaire humain est naïf et qui pourront rapidement se propager.

1.1.2.2 Infections animales et réassortiment génétique

L'influenza, causée par le virus du même nom, peut infecter certains types d'oiseaux tels que la volaille domestique (virus aviaire), certains mammifères dont l'homme (virus humain) et le porc (« swine flu virus » ou virus porcin). Il existe d'importantes différences entre les virus affectant les humains et les autres animaux,

particulièrement en ce qui a trait aux virus aviaires. En effet, les virus aviaires possèdent une spécificité pour des récepteurs d'acides sialiques en liaison terminale $\alpha 2,3$ avec un résidu de galactose, alors que les virus humains possèdent plutôt une spécificité pour des acides sialiques en liaison $\alpha 2,6$ (13). De plus, les protéases trypsiques permettant l'activation du récepteur du virus de l'influenza se retrouvent principalement au niveau de l'épithélium intestinal des oiseaux, alors qu'elles sont au niveau des voies respiratoires chez l'humain (5). Ainsi, les spécificités particulières des récepteurs HA des virus aviaires et humains se traduisent par différents sites anatomiques d'infection.

Certains animaux possèdent cependant les 2 types de récepteurs $\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$. Le porc peut être co-infecté au niveau de ses voies respiratoires à la fois par les virus aviaires et humains. Il a d'ailleurs longtemps été perçu comme un incubateur de recombinaison pour les virus humains et aviaires responsables de l'apparition de nouvelles souches d'influenza adaptées à l'homme. Récemment, il a été découvert qu'en situation de forte promiscuité les virus aviaires pouvaient se transmettre directement à l'homme (14). Les acides sialiques en liaison $\alpha 2,3$, auxquels sont spécifiques les virus aviaires, peuvent se retrouver dans les voies respiratoires inférieures humaines. Ils sont cependant présents en plus faibles quantités que les acides sialiques en liaison $\alpha 2,6$ et plus profondément dans le tractus respiratoire, ce qui explique la plus faible efficacité de l'infection des humains par les virus aviaires (7). Ainsi, l'élevage et la vente de volaille vivante dans les marchés auraient joué un rôle majeur dans la transmission du virus H5N1 hautement virulent (voir section 1.2.2.2). Certains virus possèdent également une double spécificité aviaire et humaine (voir section 1.1.2.4.1) pouvant contribuer à la propagation du virus.

Les oiseaux aquatiques, tels que le canard, constituent une autre des cibles principales du virus de l'influenza fortement impliquée dans la propagation du virus. Contrairement à la volaille domestique, l'infection des oiseaux aquatiques par un virus aviaire de l'influenza est asymptomatique. Ils agissent ainsi comme réservoir naturel du virus de l'influenza qui peut sécréter le virus jusqu'à 3 semaines post-infection. La migration saisonnière des canards sur de longues distances et leur tendance à s'établir en périphérie des villes facilite ainsi la diffusion du virus entre les populations humaines. À

titre d'exemple, la propagation du virus H5N1 en Asie du Sud-Est pourrait être associée au déplacement de certaines espèces de canards résistantes à ce sous-type viral (15).

Finalement, le cochon d'Inde et le furet peuvent être infectés par les virus de l'influenza humains. L'infection de ces animaux par le virus de l'influenza présente plusieurs similitudes avec l'humain, ce qui en fait d'excellents modèles d'étude, particulièrement dans le cas du furet (16, 17). En effet, contrairement à la souris, le furet peut être infecté par les virus humains dans les mêmes régions des voies respiratoires par l'intermédiaire des mêmes récepteurs d'acides sialiques $\alpha 2,6$. Ils transmettent par ailleurs le virus de la même façon que l'homme et ont des symptômes similaires (18, 19).

En résumé, il existe de nombreux hôtes pour les virus aviaires et humains de l'influenza de type A qui constituent une véritable banque de nouveaux virus pouvant muter et se propager à grande échelle chez l'homme. Comme mentionnés plus loin, tous les précédents virus pandémiques caractérisés comportaient au moins une nouvelle composante d'origine animale.

1.1.2.3 Épidémie saisonnière

1.1.2.3.1 Tropisme

Le virus de l'influenza est responsable des épidémies de grippe durant la saison hivernale des hémisphères nord et sud (2). Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce tropisme hivernal de la grippe. L'air froid et sec (20-40 % d'humidité) de l'hiver favorise la stabilité et la propagation du virus par l'intermédiaire de fines gouttelettes d'eau (20, 21). Le mucus des voies pulmonaires est également asséché en hiver, ce qui pourrait favoriser la propagation du virus. D'autre part, la promiscuité augmente en hiver en raison de la température et de la période scolaire, ce qui favoriserait la propagation du virus entre les individus (2). Cette augmentation de la promiscuité serait en partie responsable de la recrudescence de l'influenza dans les tropiques pendant la saison des pluies.

Le modèle Hope-Simpson propose quant à lui un mécanisme indépendant du climat. Ce modèle suggère qu'une diminution de la vitamine D conjointement à une moindre inactivation du virus causée par une plus faible irradiation aux UVs en période hivernale puisse amener une diminution de l'activité du système immunitaire. (22-24). Quoiqu'il en soit, la saisonnalité de la grippe n'est pas complètement élucidée, mais semble multifactorielle.

1.1.2.3.2 Symptômes et mortalité

Ce sont majoritairement les sous-types HA1-3 et NA1-2 du virus de l'influenza qui infectent l'Homme. Ces infections se traduisent par des symptômes incluant la fièvre, une toux sèche, des raideurs musculaires et une gorge enrouée (25) qui se déclarent environ 2 jours après l'infection et peuvent durer jusqu'à 10 jours. Plus de 3 millions d'individus par an seront affectés sévèrement par l'influenza à travers le monde dont 250 000 à 500 000 en décèderont (26), généralement de pneumonies causées par une infection bactérienne secondaire au virus. Au Canada, cela représente de 2000 à 8000 morts par saison grippale (25). Ces décès surviennent généralement parmi les groupes à risque qui comprennent, entre autres, les individus âgés de 2 ans et moins et de 65 ans et plus (Figure 4a), affectés par des maladies chroniques (cardiaques, pulmonaires, diabète, etc.) ou immunodéprimés (26, 27). Ainsi, bien que la majorité de la population récupère rapidement d'une infection par le virus de l'influenza, une vaste partie de la population est à risque chaque saison grippale, ce qui se traduit annuellement par des milliers de morts. À ces décès doivent s'ajouter ceux qui surviennent lors des pandémies du virus de l'influenza et qui comprennent souvent des adultes en bonne santé.

1.1.2.4 Pandémies

1.1.2.4.1 La grippe espagnole de 1918

Impact : La pandémie d'influenza H1N1 de 1918, communément appelée grippe espagnole, constitue de loin la plus importante jamais répertoriée. Le virus H1N1 pandémique de 1918 s'est d'abord propagé dans certains pays du nord de l'Europe au printemps de 1918 pour une première vague modérément agressive du virus, suivi de 2

autres vagues beaucoup plus répandues et meurtrières plus tard dans la même année (28). La présence de plusieurs vagues d'infection du virus est d'ailleurs caractéristique de la plupart des pandémies d'influenza et illustrerait la coévolution de l'immunité de l'hôte et de l'immunogénicité du virus.

Au total, entre 1918 et 1920, on estime que la pandémie d'influenza aurait causé entre 50 et 100 millions de décès (29). Durant cette période, le tiers de la population mondiale de l'époque aurait présenté des symptômes grippaux; le taux de mortalité aurait été de plus de 2,5 %, pour un taux d'attaque¹ clinique de 20-60 %. En comparaison, la grippe saisonnière présente généralement un taux de mortalité inférieure à 0,1 % et un taux d'attaque de 10-20 %. Considérant l'impact majeur de la pandémie d'influenza H1N1 de 1918, celle-ci sert de scénario catastrophe référence en prévision de pandémies futures (30).

Origine : Tous les segments du virus H1N1 pandémique de 1918 proviennent de souches aviaires, ce qui souligne l'importance des oiseaux dans l'introduction de virus nouveaux à l'homme. D'autre part, contrairement à ce que son nom laisse croire, le lieu exact d'éclosion de la grippe espagnole reste encore inconnu, bien que la Chine ou les camps militaires américains semblent les lieux d'origine les plus probables de cette pandémie (2).

Mémoire immunitaire : La courbe de mortalité en fonction de l'âge de la pandémie de 1918 est particulièrement inhabituelle (Figure 4b). Le taux de mortalité a augmenté dans tous les groupes d'âge par rapport à la grippe saisonnière, affectant tel qu'à l'habitude plus sévèrement les très jeunes enfants et les personnes âgées. Par contre, une plus forte proportion de jeunes adultes de 15 à 40 ans a été affectée, comparativement aux enfants de 4 à 14 ans et aux adultes de 40 à 65 ans.

La présence d'une mémoire immunitaire parmi les adultes de 40 à 65 ans a été proposée pour expliquer le plus bas taux de mortalité de ce groupe d'âge comparativement aux jeunes adultes (31). Entre 1889 - année de la pandémie d'influenza précédente - et 1918, un sous-type viral H3 aurait vraisemblablement circulé dans la population humaine²

¹ Proportion de gens infectés parmi les gens ayant été en contact ou à risque d'avoir contracté le virus

² Dédruit par la présence d'anticorps spécifique à ce sous-type chez des individus ayant vécu à cette pandémie

(32). Avant 1889, il a été suggéré qu'un virus relié à celui de 1918 de sous-type H1 aurait circulé et pour lequel les gens de 40 à 65 ans auraient conservé, une certaine immunité en 1918. Aucune preuve n'existe cependant de la présence d'un tel sous-type H1 avant 1889. Néanmoins, il est à noter qu'une infection préalable au virus de 1918 à conférer une protection contre le virus chez l'humain. Barry *et al* ont montré que des soldats américains et britanniques affectés par la première vague du virus H1N1 de 1918, moins virulente, furent substantiellement protégés contre la deuxième vague plus meurtrière du virus (33). Il est donc plausible que les personnes âgées de 40 à 65 ans aient bénéficié d'une telle protection en ayant été précédemment infectés par un virus apparenté à celui de 1918, si un virus du même sous-type a bel et bien circulé avant 1889. Une protection hétérosubtypique entre 2 virus différents induite par une réponse cellulaire pan-spécifique est également plausible, tel que nous le verrons plus loin (voir section 1.3.2) et pourrait en partie expliquer la moins grande vulnérabilité des adultes plus âgées pendant la pandémie de 1918.

D'autre part, les enfants de 5 à 14 ans ont été moins touchés par le virus, comme c'est d'ailleurs le cas pour plusieurs autres infections telles que la tuberculose ou le virus de la varicelle. À titre d'exemple, dans certains villages d'Alaska, où la population adulte était complètement naïve aux précédentes souches d'influenza circulantes, seules les enfants survécurent. On définit ce phénomène où les enfants sont souvent protégés contre des infections fortement virulentes comme l'âge d'or immunologique. Le mécanisme de cette protection n'est cependant pas encore clair (31) et sort du cadre de cet ouvrage.

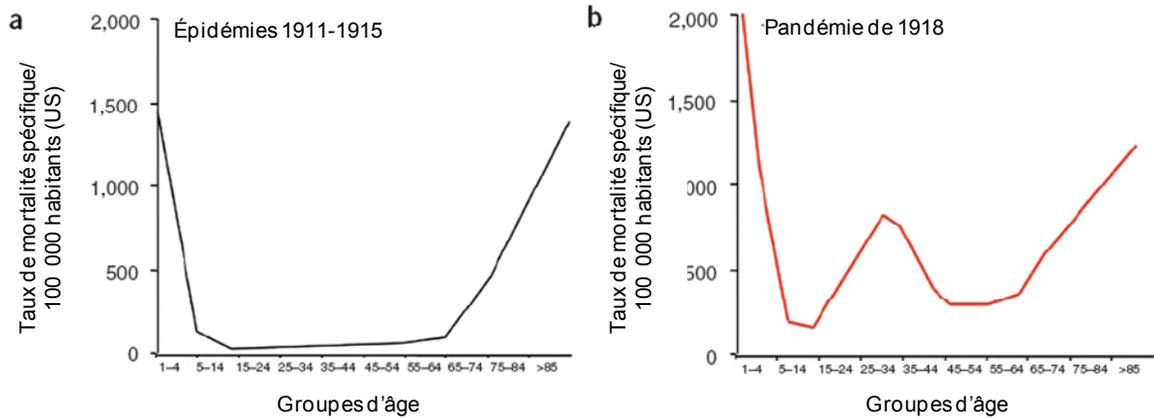


Figure 4. Courbe de mortalité de la pandémie d'influenza de 1918.

a) Taux de mortalité spécifique à la grippe par 100 000 habitants aux États-Unis pendant (a) les épidémies de 1911-1915 et (b) la pandémie de 1918. Adapté d'Ahmed, Oldstone et Palese, *Nature Immunology*, 2007 (31).

Virulence : La reconstitution récente du virus H1N1 pandémique de 1918 à partir de tissus conservés (34, 35) a permis d'élucider partiellement sa virulence. Ainsi, la recombinaison des différents segments génétiques du virus H1N1 pandémique de 1918 avec d'autres virus saisonniers a permis d'établir l'importance des gènes HA, NA, PB1 (36, 37) et potentiellement de NS1 dans la pathogénicité du virus (Annexe 1) dans différents modèles animaux. Par exemple, le gène HA possède un motif d'acides aminés basiques permettant de faciliter l'activation du récepteur du virus à l'aide de protéases plus ubiquitaires que les protéases trypsiques. De plus, la mutation (E190D) confère au virus H1N1 pandémique de 1918 une double spécificité pour les humains et les oiseaux, facilitant ainsi sa propagation dans la nature. Ces caractéristiques du virus H1N1 pandémique de 1918 amènent une réplication incontrôlée du virus qui mène à une importante sécrétion de cytokines par le système immunitaire appelée « tempête de cytokines ». Celle-ci peut mener à une hyperactivation des cellules immunitaires (par. ex. macrophages) qui est délétère dans différents modèles animaux et cultures cellulaires humaines. Le rôle de la « tempête de cytokines » dans la pathogénèse du virus n'est cependant pas clairement établi (37-39).

En résumé, le virus H1N1 pandémique de 1918 possédait un fort potentiel de réplication. Le système immunitaire prompt, mais naïf des jeunes adultes aurait pu s'emballer contre le virus de 1918 sans jamais arriver à contrôler sa propagation, ce qui expliquerait le taux de mortalité plus élevé des jeunes adultes. En contrepartie, les adultes plus âgées auraient quant à eux eu un certain degré d'immunité acquise contre le virus qui aurait permis leur protection.

À partir de 1920, le virus H1N1 pandémique de 1918 finit par perdre de sa virulence, probablement en raison de l'immunité acquise par les survivants et de mutations dans le virus. Ainsi, différents variants du virus H1N1 persistèrent chez le porc et l'humain jusqu'en 1957 (40).

1.1.2.4.2 1957-58 : Grippe asiatique

Impact et origine : La pandémie de 1957-58 s'est d'abord déclarée près de Guizhou en Chine au mois de février et est par conséquent communément appelée la « grippe asiatique ». Le virus n'a cependant pris des proportions pandémiques qu'à l'automne de 1957 où l'hémisphère nord a été à son tour affecté. Une deuxième vague d'infection a également été observée en janvier 1958. Certains pays, dont les États-Unis, furent affectés par une troisième vague à l'hiver 1962 (41). Au total, la pandémie de 1957 causa près de 2 millions de morts (42), principalement parmi les personnes âgées.

L'origine de cette pandémie fut mieux caractérisée que celle de 1918 à cause des développements en culture cellulaire et en virologie. Dès mai 1957, le nouveau virus de sous-type H2N2, formé à la suite d'une recombinaison entre un virus aviaire retrouvé chez le canard et un virus humain, a pu être isolé. De nouveaux gènes aviaires (H2, N2 et PB1) furent ainsi incorporés dans un virus humain qui se propagea à travers le monde, dont un gène N2 hyperactif. Ce virus H2N2 remplaça pendant plusieurs années la lignée des virus H1N1 de 1918 qui circulaient à l'époque (43).

1.1.2.4.3 1968 : Grippe de Hong-Kong³

³ La forte propagation initiale de ce virus dans Hong-Kong lui valut le nom.

Impact et origine : En 1968, un nouveau sous-type du virus de l'influenza en Asie du Sud-est apparut chez l'humain. (43). Le virus H2N2 qui circulait toujours depuis la précédente pandémie incorpora alors de nouveaux gènes aviaires, H3 et PB1, soulignant encore une fois l'importance des virus aviaires dans l'apparition de pandémies humaines d'influenza (37, 40). Au total, la pandémie de 1968 causa près de 1 million de morts (42). De façon très intéressante, une immunité préalable contre N2 semble avoir protégé une partie de la population contre le virus, freinant ainsi sa propagation. Il est également à noter que ce virus pouvait se propager chez plusieurs espèces d'animaux, ce qui a pu contribuer à sa propagation (43).

Le sous-type viral H3N2 d'influenza continue aujourd'hui de circuler à travers le monde. Par ailleurs, la lignée H1N1 du virus pandémique de 1918 a refait surface lors de la pseudopandémie de 1977 et co-circule toujours aujourd'hui avec le sous-type H3N2 (43).

1.1.2.4.4 Menaces de pandémies actuelles

Actuellement, ce sont principalement les sous-types H3N2 et H1N1 qui circulent chez l'humain et qui sont responsables des différentes épidémies saisonnières. Certaines des nouvelles souches de ces sous-types viraux peuvent de surcroit devenir pandémiques, comme ce fût le cas avec la grippe H1N1 de 2009, bien qu'aux États-Unis ce soit les virus H3N2 qui ont été responsables de 80 % des décès liés à l'influenza dans les années ayant précédé cette pandémie (44). En plus des virus humains, d'autres virus de l'influenza d'origine aviaire, tels que le sous-type H5N1 qui circule actuellement en Asie du Sud-Est et en Afrique du Nord, constituent une menace importante.

1.1.2.4.4.1 Grippe A H1N1

Origine : Les précédentes pandémies d'influenza ont été causées par des virus ayant au moins une composante aviaire. La pandémie de grippe A/H1N1 qui s'est déclarée au Mexique au printemps 2009 ne fait pas exception. Cette pandémie a en effet été causée par un virus recombinant provenant d'un croisement entre un virus porcin triple ressortissant et un virus nord-américain composé de segments aviaires (NA et M), humains et porcins, apparu en 1998 (45). De complexes réarrangements entre des virus de différentes origines

animales (Figure 4) ont ainsi menés à l'apparition d'un nouveau virus (souche référence A/California/04/09 (H1N1)) pour lequel l'humain n'avait pas ou peu d'immunité acquise et qui a ainsi pu se propager rapidement.

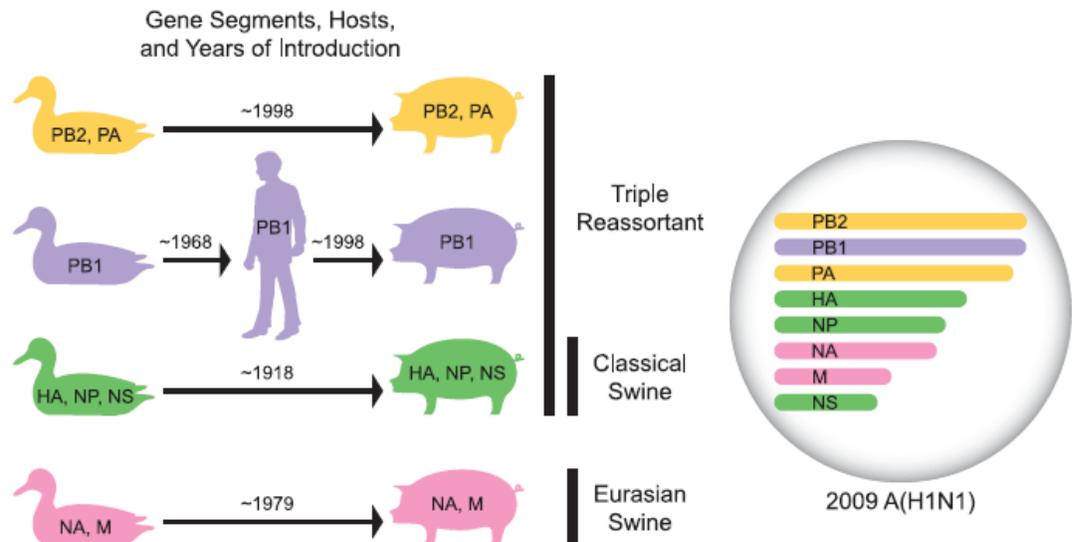


Figure 5. Provenance des segments du virus H1N1 pandémique de 2009.

Tiré de Garten *et al*, *Science*, 2009 (45).

Impact : Au moment d'écrire ce mémoire, le virus H1N1 pandémique de 2009 avait affecté 214 pays, causant plus de 18 500 décès confirmés en laboratoire (46). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) ayant cessé la confirmation laboratoire systématique des infections et recommandé aux malades sans complications d'éviter tout contact direct avec autrui, il est difficile d'évaluer le nombre précis de cas d'infection. Le dernier rapport de l'OMS du 27 novembre 2009 faisait état de plus de 620 000 cas confirmés d'influenza H1N1 pandémique (47). L'OMS évaluait le nombre total d'infections à plusieurs millions au moment d'écrire ce mémoire. Bien que des études plus approfondies soient nécessaires, il semble qu'une plus forte proportion de jeunes adultes et d'enfants a été affectée de façon sévère par ce nouveau virus. À titre d'exemple, au Mexique, plus de 80 % des décès seraient survenus parmi des gens âgés de 15 à 59 ans (48). De plus, l'âge moyen des patients admis aux soins intensifs en raison du nouveau

virus H1N1 est de 38 ans⁴, alors que la plupart ne présentaient pas de conditions médicales prédisposantes (49). À l'inverse, des patients âgés sans condition médicale particulière ont rarement été sévèrement affectés par le virus (49). Ce phénomène n'est pas sans rappeler la pandémie de 1918 où les adultes plus âgés furent moins affectés par le virus que les plus jeunes, possiblement en raison d'une protection induite par une précédente infection. D'ailleurs, environ 30 % des adultes de plus de 60 ans possèdent des anticorps réagissant contre le nouveau virus H1N1 avant infection ou vaccination, comparativement à près de 5 % pour les adultes plus jeunes (50, 51). Ces pourcentages restent faibles et d'autres mécanismes de protection pan-spécifique sont à considérer pour expliquer la plus grande résistance des adultes plus âgés (voir section 1.3).

Le taux de mortalité de la pandémie de H1N1 de 2009 reste relativement faible comparativement à certaines autres pandémies. À cet effet, le virus H1N1 de 2009 ne possède pas certains des facteurs de virulence connus du virus de l'influenza que l'on retrouve dans l'Annexe 1. Il reste que le nouveau virus H1N1 possède, dans différents modèles animaux, une plus grande virulence (16, 52, 53) ainsi qu'une facilité de propagation égale ou supérieure aux virus saisonniers (16, 54). À ce titre, il faut mentionner que le virus s'est d'abord propagé chez l'humain à l'extérieur de sa saison d'infection habituelle et qu'il a principalement affecté sévèrement les plus jeunes. La virulence de ce virus H1N1 pourrait également augmenter à la suite d'une mutation et causer une vague subséquente d'infection plus mortelle telle qu'observée lors de précédentes pandémies. En outre, des virus de sous-type H5N1 aviaires circulent toujours en Asie du Sud-Est et en Afrique du Nord. Une potentielle recombinaison entre un virus H5N1 extrêmement virulent et le nouveau virus H1N1 pandémique de 2009 hautement transmissible inquiète fortement les autorités médicales mondiales qui suivent de près l'évolution de ces virus (55, 56).

⁴ Statistique incluant les États-Unis, l'Espagne, le Canada, le Mexique, l'Australie et la Nouvelle-Zélande.

1.1.2.4.4.2 H5N1

Origine et impact : En 1997, un nouveau virus de sous-type H5N1 a entraîné, à Hong-Kong, la mort d'un nombre anormalement élevé de volailles domestiques. Ce nouveau virus H5N1 aviaire a également infecté directement 18 humains - dont 6 décédèrent - malgré la faible spécificité habituelle des virus aviaires pour les humains (voir section 1.1.2). Une éradication massive de plus d'un million de volailles domestiques a permis de contenir temporairement la propagation du virus H5N1. Celui-ci a néanmoins continué de se propager chez les oiseaux sauvages jusqu'à ce qu'il réémerge en 2003 et se répande dans la volaille domestique de l'Asie du Sud-Est, de l'Afrique du Nord et du Moyen-Orient (voir Annexe 2) par l'intermédiaire d'oiseaux migrateurs (37).

Le virus a également continué sa propagation chez l'humain, particulièrement en situation de forte promiscuité entre les humains et la volaille. Entre 2003 et le moment de rédaction de ce mémoire, 504 cas d'infections humaines au virus H5N1 aviaire ont été répertoriés, dont 299 ont causé la mort (57). Une virulence pour l'instant de loin supérieure à celle du virus H1N1 de la pandémie dévastatrice de 1918.

Virulence : L'extraordinaire virulence du virus H5N1 aviaire s'explique par plusieurs de ses composantes, dont certaines sont partagées avec le virus H1N1 de la pandémie de 1918 (voir Annexe 1). Le récepteur HA du virus H5N1 aviaire possède le même motif basique que le virus H1N1 de la pandémie de 1918 (voir section 1.1.2.4.1). Il pourrait également inhiber, en partie, la réponse des lymphocytes T CD8⁺ en supprimant l'expression de la perforine. Une adaptation du virus H5N1 aviaire aux humains par une mutation dans le récepteur HA pourrait diminuer sa virulence (58). Or, seulement 3 substitutions d'acides aminés sont suffisantes pour que le virus s'adapte à l'homme (59), ce qui laisse croire que le virus pourrait s'acclimater à l'homme sans altérer de façon majeure ses caractéristiques.

D'autres composantes du virus H5N1 aviaire, similaires à celles du virus H1N1 de la pandémie de 1918, sont également impliquées dans sa pathogenèse (voir Annexe 1) et entraînent également une importante « tempête de cytokines » (37-39).

De façon générale, seuls les sous-types HA5⁵ et HA7 des virus aviaires de l'influenza peuvent être hautement pathogènes (HPAI). Par contre, des sous-types aviaires moins virulents du virus de l'influenza (LPAI), tel que le sous-type H9N2, qui circule aussi dans la volaille de l'Asie, peuvent constituer un pool de nouveaux antigènes auxquels l'humain est naïf.

Considérant la menace passée et actuelle que représentent les virus aviaires de l'influenza, l'OMS procède, depuis quelques années, au développement de vaccins contre différentes souches références du sous-type viral H5N1 et, plus récemment, du sous-type viral H9N2, à l'instar de ce qui est fait pour les vaccins saisonniers (60). Bien que plusieurs souches de vaccins soient prêtes pour la production de masse, aucune réserve n'existe pour le moment, ni aucune certitude quant à la souche responsable de la prochaine pandémie.

1.2 Vaccination contre l'influenza

Selon le « Center for disease control and prevention » (CDC) américain et l'OMS, la vaccination est le moyen de prévention le plus efficace contre l'influenza et ses complications (27, 61), particulièrement face à un virus pandémique potentiellement virulent et hautement transmissible.

Le système immunitaire humain est formé de deux branches : l'immunité innée, qui reconnaît des composantes conservés parmi plusieurs pathogènes, et l'immunité adaptative, qui reconnaît composantes spécifiques à un pathogène donné (62). Les vaccins contre le virus de l'influenza induisent principalement une réponse adaptative contre le virus. Plus particulièrement, les vaccins saisonniers traditionnels induisent une réponse dite humorale, c'est-à-dire médiée par des anticorps ciblant des antigènes de surface.

Néanmoins, des travaux récents ont mis en lumière l'importance de l'activation initiale du système afin d'induire une réponse immunitaire adaptative robuste (63-65). Ainsi, des adjuvants capables d'activer le système immunitaire inné sont de plus en plus utilisés en vaccination (66, 67).

⁵ Le sous-type HA5 peut aussi être faiblement pathogène (LPAI), comme c'est le cas parmi les souches qui circule en Amérique du Nord [35]

Certains vaccins induisent également une réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire contre le virus. Bien qu'elle nécessite l'apprêtement des antigènes viraux exprimés dans une cellule infectée, une telle réponse s'avère très prometteuse en vaccination anti-influenza, tel qu'il en sera question plus loin.

1.2.1 Efficacité limitée des vaccins saisonniers à sous-unités inactivés contre l'influenza

Les vaccins inactivés actuels sont produits dans des œufs selon une technique développée dans les années 1930 et 1940 et qui s'est standardisée dans les années 1980 (voir Annexe 3). Les vaccins saisonniers sont trivalents, contenant une souche d'influenza A/H1N1, une souche d'influenza A/H3N2 et une souche d'influenza B, un sous-type qui peut être impliqué dans les épidémies saisonnières de l'influenza, mais qui n'a jusqu'à maintenant été responsable d'aucune pandémie. Ils sont généralement composés de sous-unités purifiées de ces virus et dosées en fonction de la quantité de la glycoprotéine HA, l'antigène principal du vaccin (61). Au Canada, on recommande le vaccin aux individus à risque et à leurs proches, aux femmes enceintes, aux communautés éloignées et aux travailleurs de la santé (68). Aux États-Unis, les enfants de 6 à 18 ans ont récemment été ajoutés à cette liste, étant donné leur rôle de vecteur dans la propagation du virus dû à la promiscuité dans les milieux scolaires (27). Bien que ces vaccins soient largement utilisés, la protection qu'ils confèrent reste variable.

1.2.1.1 Population générale

De façon générale, lorsque les souches vaccinales correspondent aux souches d'influenza en circulation, les vaccins (à sous-unités) inactivés protègent de 70 à 90 %⁶ des adultes en santé contre le virus (69).

⁶ L'efficacité des vaccins est généralement déduite du titre d'anticorps mesuré par un essai d'inhibition de l'hémagglutination de globules rouges. Une inhibition à une dilution de 1:40 diminue d'au moins 50 % les risques d'infection à l'influenza. On considère qu'il y a protection ou séroconversion lorsque le titre d'anticorps est inférieur à 1:40 [48].

Comme mentionné précédemment, les glycoprotéines de surface HA et NA ciblées par les vaccins à sous-unités inactivés sont hypervariables. Or, le temps de production actuelle minimale des vaccins inactivés est de l'ordre de 4 mois (70), bien que des techniques de culture alternatives puissent permettre de réduire légèrement ce temps de production (71). Ainsi, la composition des vaccins inactivés contre l'influenza doit être modifiée annuellement en fonction des prévisions de l'OMS. Malheureusement, ces prévisions sont imprécises, malgré les nombreux changements de souches proposés. À titre d'exemple, dans les 14 années ayant précédé 2009, il y a eu 15 changements dans la composition du vaccin de l'hémisphère Nord. Néanmoins, 12 mésappariements entre les souches du vaccin et celles qui circulent ont minimalement eu lieu (72). Une certaine protection croisée peut être observée à l'occasion entre différentes souches apparentées (73). Cependant, celle-ci est difficilement prévisible, marginale et inefficace contre une souche plus éloignée du virus, comme ce fut le cas avec le virus H1N1 pandémique de 2009.

1.2.1.2 Groupes à risque

Chez les personnes avec conditions médicales prédisposantes et chez les jeunes enfants, 2 groupes plus à risques de complications, la protection offerte par les vaccins à sous-unités inactivés est généralement légèrement inférieure à 70 % (27, 73). De plus, chez les très jeunes enfants, plusieurs doses de vaccins inactivés peuvent être nécessaires pour stimuler leur système immunitaire encore naïf (27).

Chez les personnes âgées, la protection offerte par les vaccins inactivés a récemment été contestée, particulièrement chez celles à mobilité réduite. En effet, la plupart des études sur l'efficacité des vaccins inactivés chez les personnes âgées contiennent un biais favorable au vaccin introduit par le meilleur état de santé des personnes âgées se déplaçant pour recevoir le vaccin comparativement à celles ne le recevant pas (74). D'autres études contrôlées composées de groupes plus homogènes ou de personnes âgées frêles ont tout de même identifié une baisse de l'ordre de 50 % des hospitalisations et des décès à la suite de la vaccination contre l'influenza (27, 73, 75). Bien que le niveau réel de

protection des vaccins inactivés contre l'influenza soit toujours sujet à débat, il reste que ces vaccins sont indéniablement moins efficaces chez les personnes âgées.

En résumé, la protection offerte par les vaccins inactivés saisonniers actuels contre l'influenza est très variable et moins efficace chez les groupes à risque, tels que les personnes âgées. De plus, il est difficile de prévoir les souches qui circuleront, particulièrement celles qui seront responsables d'une éventuelle pandémie.

1.2.2 Efficacité limitée des vaccins à sous-unités inactivés contre l'influenza en situation pandémique

Il est difficile de prévoir la souche d'influenza qui sera responsable de la prochaine pandémie. L'OMS surveille de près l'évolution des virus humains et aviaires et prépare également des souches vaccinales potentielles (60). Il reste néanmoins impossible de prédire le cours de l'évolution des virus de l'influenza, et donc de stocker des doses de vaccins préventives. Ainsi, la course à la préparation de vaccins en prévention d'une pandémie d'influenza se fait actuellement avec une longueur de retard sur le virus. Les deux plus récentes menaces de pandémies, la grippe A/H1N1 de 2009 et le virus H5N1 circulant illustrent bien cette situation.

1.2.2.1 Pandémie A/H1N1

D'abord, les premières doses du vaccin contre la grippe H1N1 de 2009 n'ont été disponibles que pour la deuxième vague du virus, et ce, malgré une mobilisation de tous les fabricants de vaccins mondiaux et une logistique impressionnante de distribution. En fait, la capacité mondiale annuelle actuelle de production de vaccin contre l'influenza ne couvre dans un scénario idéal que 85 % de la population mondiale (76). Ainsi, le vaccin n'a pu être rapidement fourni en quantité suffisante pour la population mondiale, et ce, en dépit de l'utilisation d'adjuvants à base de squalène ayant permis d'augmenter le nombre de doses disponible du virus (voir section 1.3.1.1.1). Un an après l'éclosion de la pandémie, le vaccin était toujours en processus de distribution dans certains pays du tiers-monde (70).

Il faut tout de même mentionner que la vaccination contre le virus H1N1 pandémique de 2009 a empêché une plus forte propagation du virus et potentiellement prévenue de nombreux décès. Chez les adultes de 18 à 64 ans, par exemple, le vaccin non-adjuvanté induit, 21 jours après son injection, un taux d'anticorps considéré protecteur dans 95 à 100 % des cas (77). Les gens vaccinés ont donc été protégés contre le nouveau virus pandémique, ce qui a diminué sa propagation pendant la deuxième vague et protégé par conséquent les groupes à risques. Des modèles informatiques appuient d'ailleurs un effet bénéfique de la vaccination anti-pandémique (78).

Malgré une propagation mondiale rapide, le virus H1N1 pandémique de 2009 était de faible virulence. Un virus plus virulent aurait pu entraîner des décès bien avant que le premier vaccin ne soit prêt.

1.2.2.2 H5N1

Depuis la réémergence du virus en 2003, des vaccins candidats ont été développés et testés par différents manufacturiers, en collaboration avec l'OMS et divers autres organismes nationaux, en prévision d'une adaptation d'un virus H5N1 à l'homme. Outre la dérive antigénique qui mène à l'apparition de nouveaux clades⁷ de la souche initiale du virus H5N1, la vaccination contre les virus aviaires H5N1 présente plusieurs obstacles (79).

D'abord, les méthodes de vaccination actuelles impliquent la réplication du virus dans des œufs de poule. Or, le virus aviaire H5N1 est également très virulent chez la poule, ce qui, en période de pandémie, risque de diminuer la quantité de volaille disponible. D'ailleurs, les souches de H5N1 utilisés pour la fabrication doivent être mutées afin de diminuer leur virulence et les risques inhérents à la fabrication du vaccin, et d'augmenter le rendement de production virale par œufs (71). Différentes méthodes alternatives homologuées de fabrication du vaccin dans des lignées cellulaires offrent une meilleure capacité de production (80), mais sont encore peu répandues dans l'industrie. L'utilisation de techniques de génétique inverse peut permettre d'accélérer dans une certaine mesure le processus de sélection d'une souche vaccinale sécuritaire et de haut rendement (71).

⁷ Une sous-classification d'une souche du virus de l'influenza, dans le cas présent de la souche H5N1.

Bien que les vaccins contre les souches de H5N1 aviaires soient généralement sécuritaires, ils sont peu immunogènes. La plupart d'entre eux nécessite l'injection de 2 fortes doses du vaccin à quelques semaines d'intervalle (79) ou l'usage d'adjuvants à base d'huile de squalène (voir section 1.3.1.1.1). Ces adjuvants peuvent également induire des anticorps à plus large spectre contre les virus H5N1 (63). Quoiqu'il soit peu probable que ces anticorps reconnaissent différents sous-types du virus de l'influenza, les vaccins adjuvantés à base d'huile de squalène montrent un certain avantage en ce qui a trait à une protection hétérosubtypique dont il sera question plus loin (voir section 1.3.2).

En résumé, les méthodes de vaccination traditionnelles contre le virus de l'influenza comportent des lacunes, principalement considérant l'apparition de nouveaux virus virulents. Des cibles et des méthodes de vaccination alternatives engendrant une réponse plus vaste et incluant des antigènes plus conservés entre les différentes souches sont actuellement envisagées.

1.3 Protection hétérosubtypique contre le virus de l'influenza

1.3.1 Méthodes de vaccination alternatives

1.3.1.1 Méthodes homologuées alternatives de vaccination contre l'influenza

1.3.1.1.1 Vaccins à sous-unités inactivés adjuvantés

Les adjuvants permettent d'augmenter la réponse immunitaire contre un immunogène co-injecté. Les vaccins saisonniers contre l'influenza ne contiennent généralement pas d'adjuvant, puisqu'ils sont suffisamment immunogènes. Par contre, en situation de pandémie où il est primordial de maximiser l'utilisation des antigènes disponibles ou encore lorsque la souche vaccinale est peu immunogène, comme dans le cas du H5N1, les adjuvants peuvent s'avérer une solution pertinente. Malheureusement, les adjuvants classiques à base de sels d'aluminium n'apportent qu'une modeste augmentation de l'immunogénicité des vaccins, du moins pour ce qui est des virus du sous-type H5N1 (71).

De nouveaux adjuvants à base d'émulsion d'huile de squalène permettent cependant une augmentation substantielle de la réponse immunitaire (71). De tels adjuvants, qui incluent le MF59⁸ ou l'AS03⁹, permettent de réduire de plus de moitié la quantité d'antigènes utilisés chez l'humain. Au cours de la dernière décennie, ces adjuvants ont été administrés à plus de 20 millions d'individus sans effets secondaires graves répertoriés. De plus, l'usage d'adjuvant à base de squalène permet d'augmenter le taux de séroconversion et d'élargir la spécificité des anticorps produits. Par exemple, un vaccin adjuvanté contre un virus H5N1 de clade 1 réagira également contre des virus de clade 2 (63). Il est peu probable que ces anticorps induits réagissent contre des virus de sous-types différents (immunité hétérosubtypique) (81). Néanmoins, la maturation des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) induite par les adjuvants à base de squalène favorise également la stimulation d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire (82) (voir section 1.3.4.1). Cette réponse a le potentiel d'offrir une protection hétérosubtypique (voir section 1.3.2). Finalement, d'autres formes d'adjuvants, tels que les « immune stimulating complexes » (ISCOMs), dont le cholestérol et la saponine qu'ils contiennent agissent de concert comme immunogènes, sont en ce moment en développement et pourraient être utilisés dans un avenir rapproché (71).

1.3.1.1.2 Vaccins à base de virus vivants atténués (VVAs)

Composition et administration : L'utilisation de VVAs est une approche vaccinale utilisée contre plusieurs virus afin d'engendrer une immunité plus adaptée au virus vivant. Des VVAs contre l'influenza sont actuellement homologués par la « Food and Drug Administration » pour les personnes âgées de 2-49 ans sans risque de complication (par ex. : Flumist[®]). Ceux-ci sont constitués de virus recombinants possédant les glycoprotéines HA et NA de la souche vaccinale cible et le reste du génome d'un autre virus « adapté au froid », c'est-à-dire qui se réplique de façon optimale entre 25 °C et 33 °C (Figure 6). Ainsi, la réplication de tels virus à température corporelle humaine n'est que limitée et

⁸ Novartis, contient également deux surfactants, le tween 80 et le span 85, dans un tampon de citrate

⁹ Glaxo-Smith-Kline, adjuvant présent dans le vaccin distribué au Canada pendant la pandémie de grippe H1N1 de 2009 contenant également de la vitamine E, du tween 80 et du thimérosal (agent de conservation)

généralement asymptomatique. Ces quelques cycles de réplication permettent tout de même une expression endogène de toutes les protéines virales, dont les glycoprotéines HA et NA provenant d'une nouvelle souche contre laquelle on désire immuniser la population (27, 71, 83). Les vaccins saisonniers à base de virus vivants atténués contre l'influenza sont composés, à l'instar des vaccins à sous-unités inactivés, de 3 souches. Par contre, à la différence des vaccins à sous-unités inactivés, les VVAs sont injectés dans les voies nasales sous forme de gouttelettes. Les virus atténués infectent ainsi l'épithélium nasopharyngien et stimulent une réponse mucoale agissant directement au site d'entrée du virus.

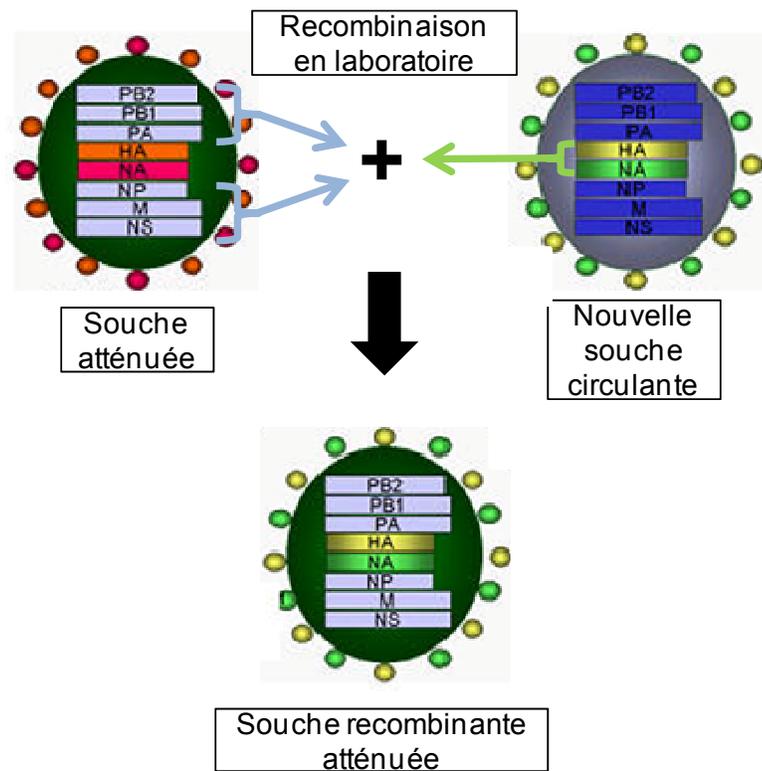


Figure 6. Schéma d'une souche recombinante atténuée du virus de l'influenza ayant acquis les gènes HA et NA d'une nouvelle souche circulante contre laquelle un vaccin VVA sera produit.

Adaptée du site web : <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/Chem%20and%20Society/Influenza/vaccinereassort.jpg>.

Efficacité : De façon générale, bien que cela dépende des saisons et des groupes d'âge, les vaccins à base de VVAs contre l'influenza ont une efficacité comparable aux vaccins à sous-unités inactivés pour prévenir une infection homosubtypique d'influenza chez l'adulte (27, 73). Chez les jeunes enfants admissibles (2 à 4 ans), les VVAs contre l'influenza sont cependant significativement plus efficaces que les vaccins à sous-unités inactivés en prévention contre des souches d'influenza homologues et dérivés du vaccin (84).

L'avantage des VVAs réside d'une part dans leur induction d'anticorps muqueux (immunoglobulines (Ig)A) (83) qui possèdent une spécificité plus large que les anticorps circulants de types IgG induits par la vaccination traditionnelle. D'autre part, les VVAs induisent une réponse immunitaire à médiation cellulaire de plus grande magnitude que les vaccins traditionnels (85, 86), bien qu'elle reste modeste (87). Comme discuté plus loin, une telle réponse cellulaire hétérosubtypique optimisée pourrait contribuer à une protection pan-spécifique contre l'influenza (section 1.3.2).

D'autre part, un virus vivant est plus susceptible de stimuler l'inflammasome (88), un senseur viral de l'immunité innée essentielle à la protection contre le virus de l'influenza (89), agissant ainsi lui-même comme adjuvant.

1.3.1.2 Méthodes alternatives en développement de vaccination contre l'influenza

Afin de pallier les limitations des méthodes de vaccination actuelles, différentes techniques alternatives sont en développement; quelques-unes d'entre elles sont relevées dans cette section.

1.3.1.2.1 Vaccin à ADN

Mécanisme : Les vaccins à ADN sont constitués d'ADN plasmidique codant des gènes donnés. À la suite de son injection intramusculaire, l'ADN plasmidique sera pris en charge par certaines cellules résidentes (musculaire ou dendritiques) qui exprimeront les gènes codés par l'ADN. Cette expression endogène permet de stimuler à la fois la production d'anticorps et une réponse immunitaire à médiation cellulaire (90, 91).

Le principal avantage des vaccins à ADN provient de la rapidité à laquelle ils peuvent être produits (90, 92). En situation pandémique, une telle réduction du temps de production des vaccins pourrait s'avérer cruciale. En outre, les vaccins à ADN sont stables sur de longues périodes, ce qui faciliterait le stockage de doses préventives (71, 93).

De plus, les vaccins à ADN sont sécuritaires, malgré les inquiétudes qu'ils ont soulevées au départ quant à l'introduction de mutation dans le génome. Chez les animaux, l'insertion potentielle des vaccins à ADN dans le génome n'augmente pas de façon significative le taux de mutation. Trois vaccins à ADN sont d'ailleurs déjà homologués pour différentes pathologies animales (90). Chez les humains, différents essais cliniques impliquant des milliers de volontaires montrent que les vaccins à ADN sont bien tolérés et sans effets secondaires répertoriés (90).

En contrepartie, les vaccins à ADN sont généralement moins immunogènes que les autres vaccins. L'utilisation de motifs internes au vaccin à ADN¹⁰ comme adjuvant peut augmenter de façon importante l'immunogénicité des vaccins à ADN. Ces motifs stimuleront la production d'interférons (IFN) de type 1 essentiels pour l'activité optimale des vaccins à ADN (voir section 3.2.2.1.3) (93) principalement par les cellules dendritiques (DCs) plasmacytoïdes (62). L'utilisation d'adjuvants externes est également envisageable (90).

Efficacité : Dans différents modèles animaux, des vaccins à ADN ciblant l'antigène de surface hypervariable HA démontrent une bonne immunogénicité. Un vaccin de ce type est d'ailleurs en essai clinique de phase I chez l'humain afin d'évaluer son innocuité et son immunogénicité (91, 94). Des résultats préliminaires chez l'humain montrent une production d'anticorps légèrement plus faible que par la vaccination traditionnelle, mais une stimulation des lymphocytes T chez la plupart des individus (91).

¹⁰ À titre d'exemple, les motifs CpG activent la voie du TLR-9. La structure de forme B (hélice à pas de gauche) de l'ADN double brin active les hélicases RIG-I ou MDA5 de façon dépendante de la signalisation par la protéine kinase TBK1.

En outre, des vaccins à ADN ciblant des épitopes plus conservés du virus de l'influenza, tels que M1 et NP (voir chapitre 2, manuscrit, « Supplementary Table 1 »), par une réponse immunitaire à médiation cellulaire permettent d'induire une protection contre le virus de l'influenza dans plusieurs modèles animaux (souris, furet et poulet) (95-98). Cette protection soit non stérile, c'est-à-dire qu'elle ne permet pas d'éliminer les agents pathogènes avant leur infection, avant que le pathogène ne soit répliqué dans l'hôte. Néanmoins, une telle réponse permet une survie contre des souches hétérologues létales du virus (protection hétérosubtypique), comme certaines souches du virus aviaire H5N1. Il est peu probable que la réponse humorale stérile induite par les vaccins traditionnels permette une telle protection hétérosubtypique (81). Il sera discuté plus en détail de la réponse immunitaire à médiation cellulaire hétérosubtypique plus loin.

1.3.1.2.2 Particules pseudovirales et vecteurs viraux

Différents vecteurs viraux (par ex. poxvirus ou adénovirus à réplication déficiente) (71) ou particules pseudovirales contenant des antigènes de l'influenza ont été développés comme plateforme de vaccination contre l'influenza. De telles stratégies peuvent induire une protection contre des doses létales du virus de l'influenza dans des modèles animaux et peuvent également stimuler une réponse immunitaire à médiation cellulaire contre le virus (99, 100). Néanmoins, la difficulté de production de ces types de vaccins les rend moins attrayants pour une immunisation prompte en situation de pandémie.

1.3.1.2.3 Anticorps neutralisants

De façon très intéressante, des anticorps à spécificité hétérosubtypique dirigés contre des régions conservées de la tige charnière de la protéine HA du virus de l'influenza ont récemment été produits (101, 102). Ces anticorps peuvent réagir *in vitro* à la fois contre certains virus aviaires H5N1 et contre le virus H1N1 de la pandémie de 1918 (102). En outre, dans certaines circonstances, des anticorps réagissant contre le virus de la pandémie de grippe H1N1 de 2009 peuvent être induits par une infection au virus de l'influenza H1N1 saisonnier (103).

Néanmoins, le virus de l'influenza continue de circuler d'année en année en dépit de la vaccination et du fait qu'une portion considérable de la population ait déjà été infectée. Manifestement, les méthodes de vaccination ne stimulent pas efficacement la production d'anticorps à spécificité hétérosubtypique pour l'instant. La région de la tige charnière de la protéine HA est une cible très prometteuse pour des anticorps ou encore pour d'éventuels agents de synthèse qui pourrait être utilisé en situation d'épidémie aigüe. Par contre, il est difficilement envisageable d'utiliser le transfert d'anticorps ou encore l'utilisation d'agents chimiques en prophylaxie pré-pandémique.

D'autre part, un rôle des anticorps anti-NA dans une protection hétérosubtypique a été proposé (voir section 1.1.2.4.3). Au cours des dernières décennies, la glycoprotéine NA a été moins susceptible à la dérive antigénique que HA (11). Or, les vaccins actuels sont dosés en fonction de la quantité de HA uniquement, rendant la quantité de NA variable. La présence d'anticorps anti-NA est donc moins fréquente que les anticorps anti-HA (104). Une stratégie de vaccination impliquant spécifiquement NA et excluant l'effet dominant de la glycoprotéine HA pourrait s'avérer une stratégie d'immunisation complémentaire intéressante. Il reste néanmoins que la protection offerte par les anticorps anti-NA¹¹ reste plus modeste que celle offerte par les anticorps anti-HA (105). Une vaccination contre NA risquerait également d'exercer une pression évolutive sur ce gène et d'augmenter sa variabilité.

Des anticorps neutralisants contre la protéine fortement conservée M2 ont également montré des résultats prometteurs dans certaines études précliniques (106). L'efficacité de ces anticorps reste cependant à évaluer chez l'humain.

1.3.1.2.4 Immunité innée et vitamine D

Certains groupes ont proposé un rôle pour la vitamine D dans l'activation de l'immunité innée dans la réponse immunitaire contre l'influenza. Il est cependant peu probable que l'immunité innée soit suffisante contre un virus hautement virulent ou à fort potentiel de propagation. En effet, si la vitamine D induite par la lumière solaire permet, du

¹¹ ne préviennent pas l'infection, mais inhibent la propagation virale.

moins en partie, d'expliquer la saisonnalité des épidémies du virus de l'influenza en améliorant la réponse innée (24), celle-ci n'a tout de même pu empêcher les virus H1N1 pandémiques de 1918 et de 2009 de se propager au printemps et au début de l'été où l'ensoleillement est fort. Néanmoins, l'activation de l'immunité innée particulièrement par l'usage d'adjuvants ou d'activateurs des récepteurs de type « Toll » (TLRs) reste essentielle à une bonne immunogénicité d'un vaccin, fort probablement en permettant la maturation des CPAs qui activeront par la suite la réponse immunitaire acquise (voir section 1.3.4.1).

De plus, il a récemment été montré que la vitamine D facilite l'activation induite par la signalisation par le récepteur des lymphocytes T (TCR) (107), ce qui appuie, selon le modèle de Hope-Simpson, un rôle des lymphocytes T dans le contrôle saisonnier du virus de l'influenza.

1.3.1.2.5 Antiviraux de synthèse

Des inhibiteurs de la sialidase NA (par ex. oseltamivir) et de la pompe à proton M2 (par ex. amantadine) ont été développés afin de minimiser la propagation et les symptômes de la grippe. Par contre, ceux-ci doivent être administrés dans les 48 heures suivant l'infection initiale du virus. Le taux de mutation élevé du virus lui a cependant permis de rapidement acquérir une résistance à ces antiviraux (108). Ainsi, dans le cas de l'oseltamivir, une seule mutation ponctuelle H274Y est suffisante au virus pour développer une résistance (109). Certaines souches du sous-type H5N1 (110) et d'autres du virus H1N1 de la pandémie de 2009 (111) ont d'ailleurs déjà développé une résistance contre certains antiviraux. Considérant la progression rapide de la résistance aux antiviraux, l'utilité de ces composés est pour le moins incertaine.

En terminant, il est à noter que la plupart des vaccins capables d'induire une réponse hétérosubtypique contre l'influenza (VVA, Vaccins à ADN) implique une réponse à médiation cellulaire, dont il sera traité dans le prochain chapitre et ce, grâce à une expression endogène (intracellulaire) de protéines du virus.

1.3.2 Protection hétérosubtypique contre l'influenza : Réponse immunitaire à médiation cellulaire contre le virus de l'influenza

L'homologie de séquence d'acides aminés de la glycoprotéine de surface HA est aussi faible que 40 % entre des souches distantes (voir chapitre 2, manuscrit, « Supplementary Table 1 »). La plupart de ces variations surviennent dans la tête globulaire de HA, où se situe le site de liaison aux acides sialiques ciblés par les anticorps neutralisants. Bien que seuls ces anticorps permettent une protection dite « stérile » contre le virus de l'influenza, d'autres cibles doivent être conjointement envisagées afin de pallier le mésappariement d'un vaccin ou l'émergence rapide d'une nouvelle souche d'influenza virulente. Les protéines structurales M1 et NP du virus de l'influenza sont conservés à plus de 90 % chez différentes souches éloignées du virus (voir Chapitre 2, manuscrit, « Supplementary Table 1 »).

Étant donné la localisation à l'intérieur du virus des protéines M1 et NP, celles-ci doivent être apprêtées par une cellule infectée ou par une CPA. Cela sous-entend que le virus doit avoir amorcé sa réplication avant de pouvoir être ciblé par des lymphocytes T, les principaux médiateurs de la réponse cellulaire spécifiques à M1 et à NP. Ainsi, une telle réponse cellulaire ne confère pas une immunité stérile. Elle peut cependant atténuer la propagation de virus de souches hétérologues (81) et diminuer les symptômes inhérents, comme cela est observé chez les animaux et l'humain.

1.3.2.1 Modèles animaux

Les antigènes du virus de l'influenza sont d'abord pris en charge dans les voies respiratoires (ou dans le tissu périphérique où un vaccin a été injecté) par les CPAs. Ces dernières mûrissent sous l'influence de ligands du virus de l'influenza en CPAs compétentes (voir section éponyme) et migrent vers l'organe lymphoïde le plus près où ils activeront les lymphocytes T, les acteurs principaux de la réponse immunitaire à médiation cellulaire (62).

Dans plusieurs modèles animaux (souris, poulet, furet, et cochon d'Inde), une telle réponse immunitaire à médiation cellulaire corrèle avec une diminution de la charge virale et une protection contre le virus de l'influenza (112-115). De plus, dans certains modèles

murins, la réponse cellulaire est le principal mécanisme de protection hétérosubtypique contre le virus de l'influenza (81).

Souris : Chez la souris, le transfert adoptif de lymphocytes T CD8⁺ permet une protection non stérile contre des charges virales autrement létales. Des vaccins à ADN (voir section éponyme) induisant une réponse immunitaire à médiation cellulaire contre des antigènes conservés du virus de l'influenza permettant une protection similaire. À l'inverse, lorsque les lymphocytes T CD8⁺ sont déplétés, de plus grandes charges virales sont observées dans les poumons, ce qui entraîne des symptômes plus sévères et une plus grande mortalité.

La protection est principalement médiée par les lymphocytes T CD8⁺, mais également, en partie, par les lymphocytes T CD4⁺, de par leur rôle dans l'activation des lymphocytes B producteurs d'anticorps et, surtout, dans l'activation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (116, 117). Les lymphocytes T agissent en lysant les cellules infectées afin de diminuer la propagation du virus, mais aussi en sécrétant différentes cytokines effectrices (par ex. IFN- γ) qui agiront directement sur les cellules infectées, ou encore qui recruteront d'autres cellules effectrices.

Bien qu'un nombre suffisant de lymphocytes T doit être présent directement dans les voies respiratoires afin de contrôler le virus (118), le modèle murin, ainsi que d'autres modèles, suggère de façon générale un rôle important des lymphocytes T dans le contrôle du virus de l'influenza.

Furet : Comme mentionné précédemment, le furet est considéré comme le modèle infectieux par excellence pour le virus de l'influenza, de par la similarité avec l'infection chez l'homme. Or, chez cet animal, on observe rapidement après l'infection du virus de l'influenza une activation de lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaire (119).

D'autre part, à l'instar de ce qui est observé pour la souris, le furet est protégé à la fois contre des charges létales des sous-types viraux H1N1 et H5N1 lorsque vacciner avec des plasmides codant pour des antigènes conservés du virus de l'influenza (par ex. NP)

ciblés par des lymphocytes T (96, 120). Il est à noter que, contrairement aux souris, les furets ne sont pas consanguins, mais composés d'individus de différents haplotypes. Ils représentent donc la diversité des molécules HLA humaines, laissant sous-entendre qu'une telle protection pourrait également exister chez l'humain

1.3.2.2 Humains

1.3.2.2.1 Protection offerte par la réponse immunitaire à médiation cellulaire hétérosubtypique

Chez l'humain, McMichael *et al* ont d'abord montré une corrélation directe entre la réponse cellulaire et l'infection au virus de l'influenza (121). En absence d'anticorps spécifique, une forte réponse des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques corrèle avec une diminution du relargage pulmonaire du virus.

À cette étude s'ajoutent des preuves indirectes d'une réponse immunitaire hétérosubtypique que l'on attribue généralement à une réponse cellulaire en se basant sur une absence théorique d'anticorps spécifiques. Ainsi, les adultes plus âgées ont été moins susceptibles à une infection contre les virus de l'influenza des pandémies de 1918 et de 2009, pour lesquels le système immunitaire de la population humaine était naïf. En absence d'anticorps neutralisants, cette protection pourrait vraisemblablement avoir été médiée par une réponse immunitaire à médiation cellulaire hétérosubtypique favorisée par de précédentes infections du virus de l'influenza (31).

Les archives médicales de la famille Cleveland de la pandémie de 1957 causée par un virus de sous-type H2N2 sont également révélatrices au sujet d'une réponse hétérosubtypique indépendante de la réponse humorale contre le virus de l'influenza. Les adultes de la famille Cleveland ayant présenté des symptômes grippaux documentés avant la pandémie de 1957 - probablement en raison d'une infection au sous-type H1N1 circulant durant cette période - ont présenté un taux d'attaque clinique 3 fois moins élevé (5,6 %) que les autres adultes de la famille (16,7 %) (122). Par contre, 55,2 % des enfants ayant eu la grippe dans les années précédant la pandémie ont tout de même contracté le virus. Une des hypothèses avancées pour expliquer la meilleure protection des adultes ayant eu la grippe

est la présence d'une réponse immunitaire hétérosubtypique accumulée à la suite de plusieurs infections.

La présence d'anticorps à spécificité hétérosubtypique dans cette situation est peu probable étant donné la variabilité de la protéine HA entre les sous-types viraux H1N1 et H2N2. Ainsi, une réponse immunitaire à médiation cellulaire contre des antigènes internes et conservés du virus de l'influenza plus robuste chez les adultes a été proposée pour expliquer leur protection.

Les adultes ayant plus de chance d'avoir contracté la grippe à plusieurs reprises auraient développé une plus forte réponse cellulaire mémoire que les enfants n'ayant été infectés qu'une fois.

En ce qui a trait à la plus faible protection des enfants, il est connu que la vaccination dans ce groupe d'âge nécessite souvent plusieurs doses. De plus, les écoles que fréquentent les enfants sont des foyers importants pour la propagation du virus de l'influenza. Ceux-ci sont donc plus fortement exposés au virus de l'influenza et donc plus susceptibles de le contracter.

Bien que l'expérience de la famille Cleveland ne prouve pas directement l'efficacité d'une réponse cellulaire hétérosubtypique, elle abonde tout de même dans la même direction que ce qui est observé dans les modèles animaux.

Finalement, une dernière preuve d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire hétérosubtypique contre l'influenza provient de la pression sélective exercée sur les séquences cibles du virus. En effet, une plus grande proportion de mutations non synonymes, c'est-à-dire de mutation qui change la séquence en acides aminés, est observée dans les épitopes de lymphocytes T, suggérant l'immunité cellulaire comme agent de sélection.

Or, ces mutations ne surviennent pour la plupart qu'en des endroits d'importance secondaire pour les épitopes de lymphocytes T. En effet, les épitopes du virus restent conservés, puisque des mutations aux endroits plus critiques, les résidus d'ancrage, empêchent la réplication virale (par ex. épitopes M1⁵⁸⁻⁶⁶ et NP³⁸³⁻³⁹¹) (83).

Finalement, considérant en outre le rôle des lymphocytes T dans l'élimination de diverses infections virales dans les modèles animaux et chez l'humain, il est plausible que des lymphocytes T permettent une protection contre le virus de l'influenza. Chez l'humain, cette réponse contre le virus de l'influenza existe et est d'ailleurs composée d'un large éventail de cibles.

1.3.2.2.2 *Étendue de la réponse immunitaire à médiation cellulaire hétérosubtypique*

Plusieurs études ont récemment montré que la réponse cellulaire immunitaire à médiation cellulaire contre le virus de l'influenza est vaste et composée de cibles (épitopes) fortement conservées d'une souche virale à l'autre (123-128). D'ailleurs, toutes les protéines du virus possèdent plusieurs épitopes pouvant être ciblées par des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ mémoires spécifiques. Parmi les protéines conservées du virus de l'influenza, NP et M1 contiennent un nombre particulièrement élevé d'épitopes conservés¹² entre les souches du virus de l'influenza. Entre autres, Lee *et al* ont détectés près de 20 épitopes de lymphocytes T spécifiques à NP ou à M1 conservés à la fois dans une souche du virus de l'influenza humaine H3N2 circulante et dans une souche aviaire H5N1 (123). En outre, 80 % des volontaires britanniques possèdent des lymphocytes T spécifiques à au moins un de ces épitopes. Des résultats similaires ont été obtenus pour des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques à NP et à M1 dans une cohorte américaine (129). Chez d'autres volontaires américains, des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ spécifiques à NP et à M1 réagissant contre des souches porcines du virus de l'influenza, en plus des souches aviaires, ont également été isolés (125, 130). Il est également intéressant de remarquer que plusieurs de ces épitopes de NP et de M1 sont requis pour la survie du virus (131), ce qui explique

¹² La plupart de ces épitopes ont été identifiés en utilisant des peptides chargés de façon exogène sur des CPAs. Or, les techniques de vaccination actuelles stimulant une réponse cellulaire impliquent principalement une expression endogène des protéines conservées du virus de l'influenza. Nous avons développé une technique d'identification d'épitopes basée sur des segments d'ARNm exprimés par des CPAs, nommée « mRNA PCR-based epitope chase (mPEC) » dont le manuscrit en Annexe 5 est discuté à la section 3.2.3.3.

leur très forte conservation entre les souches. En outre, une réponse cellulaire contre le virus de l'influenza corrèle avec une protection chez les personnes âgées.

1.3.2.2.3 Réponse immunitaire à médiation cellulaire hétérosotypique et personnes âgées

Chez les personnes âgées, les vaccins actuels, induisant principalement une réponse immunitaire à médiation humorale, sont moins efficaces que chez les plus jeunes. Or, une réponse immunitaire à médiation cellulaire robuste (taux IFN- γ /interleukine (IL)-10 élevé) contre le virus de l'influenza s'avère être un meilleur indicateur de la protection contre l'influenza que le titre d'anticorps chez les personnes âgées (132). La réponse immunitaire à médiation cellulaire contre l'influenza tend cependant à s'affaiblir chez les personnes âgées (133).

Entre autres, les DCs plasmacytoïdes, des cellules présentatrices d'antigène (voir section 1.3.3.2) présentes dans les tissus périphériques et particulièrement importantes pour une réponse antivirale robuste ont des fonctions réduites chez les personnes âgées. Ceux-ci sécrètent de plus bas niveaux d'IFN de types 1 (IFN- α et- β) et 2 (IFN- γ) et stimule moins efficacement la réponse des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ (134). Une stratégie de vaccination visant à améliorer cette réponse chez les personnes âgées serait nécessaire.

En résumé, l'ensemble de ces données suggère fortement un rôle chez l'humain de la réponse immunitaire à médiation cellulaire dirigée contre NP et M1 dans une protection hétérosotypique contre l'influenza.

1.3.2.2.4 Stimulation d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire hétérosotypique

La mémoire immunitaire cellulaire peut être de longue durée, surtout dans les modèles animaux. Par contre, chez l'humain, la demi-vie *ex vivo* de la réponse immunitaire à médiation cellulaire contre l'influenza, c'est-à-dire le temps de diminution de moitié du nombre de lymphocytes T spécifiques au virus, est d'environ 2-3 ans (135), avec une baisse déjà observable après un an (136). Par conséquent, bien qu'une infection avec le virus de l'influenza puisse induire une réponse immunitaire cellulaire protectrice (54, 137), il est peu probable que celle-ci soit soutenue. Un rappel par une vaccination adaptée semble nécessaire. (138) D'autre part, la réponse à médiation cellulaire contre les protéines M1 et

NP du virus de l'influenza ne permet pas une protection stérile. Chez les animaux, cette protection reste souvent incomplète, particulièrement contre des souches plus virulentes du virus. Une réponse cellulaire de type « régulatrice » (sécrétion d'IL-10) peut même être dommageable dans certains modèles (86). Ainsi, bien qu'il appert important d'optimiser la réponse immunitaire à médiation cellulaire contre l'influenza afin de permettre une protection hétérosubtypique efficace, peu est encore connu à ce sujet chez l'humain.

1.3.3 Réponse immunitaire à médiation cellulaire mémoire efficace

1.3.3.1 Caractéristiques post-stimulation

Contrairement à la réponse immunitaire à médiation humorale, il n'existe encore aucun corrélat immunitaire objectif et clair de protection pour une réponse à médiation cellulaire mémoire. Néanmoins, plusieurs caractéristiques permettent de décrire de façon qualitative l'ampleur de cette réponse : (A) la fréquence des lymphocytes T spécifiques, (B) leur capacité à proliférer, (C) leur polyfonctionnalité – sécrétion de multiples cytokines ou chimiokines - et (D) la présence de marqueurs mémoires spécifiques (139).

D'abord, (A) la fréquence des lymphocytes T spécifiques au virus de l'influenza est généralement très élevée chez la plupart des individus (140). Ces lymphocytes T peuvent d'ailleurs (B) proliférer *in vitro* pour être caractérisés ((123), Chapitre 2). D'autre part, (C) la polyfonctionnalité et (D) la présence de marqueurs mémoires sont deux concepts récents très importants pour évaluer une réponse cellulaire mémoire efficace. À titre d'exemple, le vaccin contre la fièvre jaune et celui contre la variole - deux des vaccins les plus efficaces - stimulent la prolifération de lymphocytes T mémoires spécifiques de longue durée capables de produire à la fois de l'IFN- γ , une cytokine pro-inflammatoire, et de l'IL-2, une cytokine induisant la prolifération des lymphocytes T et favorisant la différenciation des lymphocytes T en cellules effectrices (62, 141).

1.3.3.1.1 Polyfonctionnalité

Dans plusieurs pathologies virales pour lesquelles une réponse cellulaire est importante dans l'éradication du virus (par ex. Fièvre jaune, Hépatite B), une production de

multiples cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , « tumor necrosis factor » (TNF), etc.) et chimiokines – molécules chémoattractantes (« Macrophage inflammatory protein » (MIP)-1 β , « interferon inducible protein » (IP)-10, et autres) - corrèle avec un meilleur contrôle viral (139). Ainsi, le vaccin contre la fièvre jaune génère des lymphocytes T polyfonctionnels capables de sécréter de l'IFN- γ , du TNF, de l'IL-2 et du MIP-1 β (142).

1.3.3.1.2 Marqueurs de surface cellulaire

La présence de marqueurs à la surface des lymphocytes T permet de les catégoriser en cellules naïves, effectrices ou mémoires (voir aussi Annexe 4 pour un modèle de différenciation des lymphocytes T). Par exemple, les lymphocytes T ayant été stimulés par leur antigène vont généralement perdre l'expression du marqueur CD45RA et exprimer plutôt l'isoforme CD45RO à leur surface membranaire (143). Plus tard dans leur développement, certains sous-types de lymphocytes T mémoires réexprimeront CD45RA (142, 143). La plupart des lymphocytes T mémoires réexprime également le marqueur CD127, le récepteur de l'IL-7. Cette cytokine est par ailleurs importante pour l'homéostasie des lymphocytes T mémoires. CD127 est aussi exprimé par les lymphocytes T naïfs et considéré comme important pour leur homéostasie (144, 145).

Les lymphocytes T mémoires se divisent en deux catégories : les lymphocytes T mémoires centraux (T_{cm}) et effecteurs (T_{em}). Les T_{cm} expriment des récepteurs spécifiques aux organes lymphoïdes secondaires (CD62L ou CCR7) où ils se retrouvent. Durant la réponse immunitaire, les T_{cm} contribuent à augmenter le nombre de lymphocytes T effecteurs durant une réponse secondaire. Les T_{em} expriment plutôt des récepteurs spécifiques aux organes périphériques, tels que CCR5, et contribueront à une réponse immédiate au site d'infection du pathogène envahisseur (146).

Comme mentionnés précédemment, les corrélats d'une réponse à médiation cellulaire hétérosubtypique protectrice contre l'influenza doivent être plus clairement définis. Néanmoins, il est certain qu'une telle réponse dépend largement de la présentation antigénique initiale aux lymphocytes T.

1.3.3.2 Présentation antigénique initiale efficace

Une réponse immunitaire à médiation cellulaire robuste part d'une stimulation originale efficace. Ainsi, la qualité des signaux fournis par les CPA et les lymphocytes T CD4⁺ « helper » seront critiques pour la formation d'une forte réponse cellulaire mémoire.

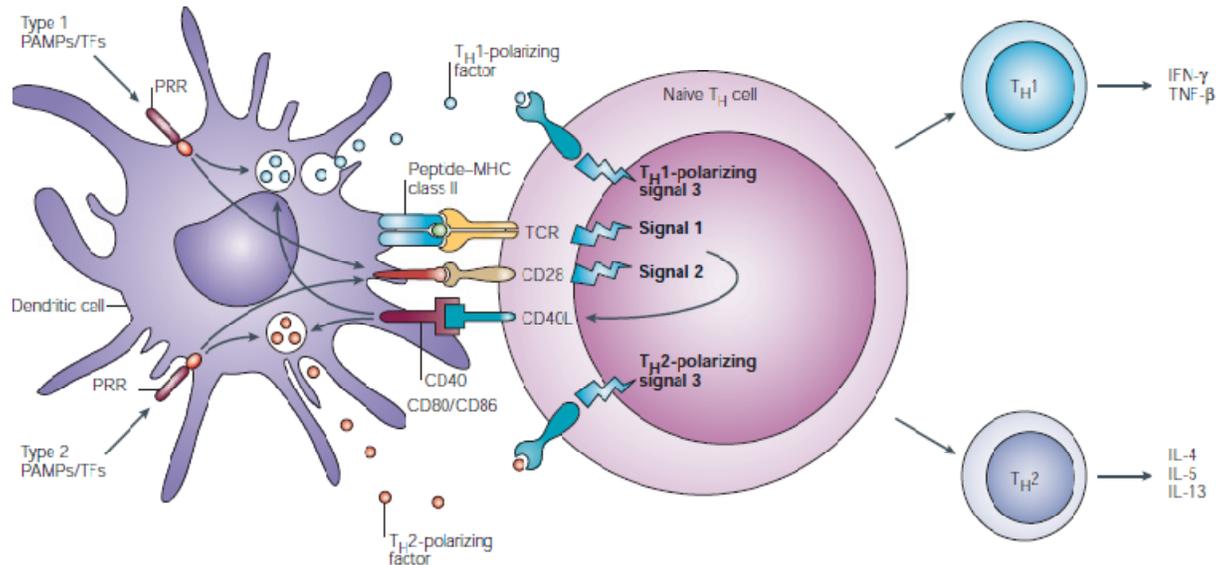


Figure 7. Exemple des 3 signaux requis pour l'activation d'un lymphocyte T CD4⁺ par une cellule présentatrice d'antigène (CPA).

Tiré de Kapsenberg, *Nature reviews Immunology*, 2003 (147).

1.3.3.2.1 Cellules présentatrices d'antigène

Signaux de stimulation (62) : D'abord, l'antigène doit être apprêté par une CPA compétente et présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe (CMH)-I aux TCRs des lymphocytes T CD8⁺ et par CMH-II aux TCRs des T CD4⁺ (Figure 7 et 8).

Classiquement, les protéines endogènes sont présentées par CMH-I (voir Figure 8). Une partie des protéines nouvellement traduites dans le cytosol seront dégradées en de multiples peptides par un complexe protéique appelé protéasome. Ces peptides seront ensuite transportés vers le réticulum endoplasmique par un dimère formé des *transporters associated with antigen processing* (TAP) -1 et -2. Une fois dans ce compartiment cellulaire, un série de molécules, telles que la tapasine, la calréticuline et la chaperone

Erp57, contribueront au chargement adéquat des peptides sur les molécules de CMH-I. Finalement, la molécule de CMH-I migrera, en association avec une molécule de β -2-microglobuline, vers la surface membranaire de la CPA où elle présentera le peptide avec lequel elle a été chargée. Ce complexe restera à la surface membranaire pour un temps correspondant à l'affinité du peptide pour la molécule de CMH (62).

Les protéines exogènes sont quant à elles présentées par CMH-II principalement par les voies endosomales. Les protéines de CMH-II, présentes initialement dans le réticulum endoplasmique, sont liées par une chaîne invariante qui comblera leur niche peptidique. Cette chaîne permettra également un transport des CMH-II vers les endosomes, compartiments par excellence de présentation par CMH-II. L'acidification de ces vésicules entraînera par la suite la destruction de cette chaîne par des protéases locales. Puis, après fusion avec une vésicule endosomale apportant des antigènes, des peptides seront chargés sur le CMH-II, entre autres par l'intermédiaire de la molécule HLA-DM. La molécule de CMH-II se déplacera ensuite vers la surface pour présenter son peptide nouvellement acquis (62).

Un croisement entre les voies endogènes et exogènes est cependant possible (voir section 1.3.4.2). Ainsi, des antigènes exogènes pourront-ils fuir les endosomes vers le cytosol pour être présentés par CMH-I (voir Figure 8). À l'inverse, des antigènes endogènes pourront-ils être présentés par CMH-I en étant dirigés vers les endosomes par une séquence de mobilisation (148) ou en étant englobés par autophagie et dirigés vers des compartiments de présentation par CMH-II (149). Cette stimulation des TCR des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ respectivement par CMH-I et -II constitue le signal initial clé pour leur activation (signal 1) (150).

Signaux de co-stimulation : Ensuite, des molécules de co-stimulation (par ex. CD80 et CD86) présentes sur les CPAs lient leur partenaire à la surface des lymphocytes T (par ex. CD28) afin de fournir un signal de co-activation (signal 2) qui confirme le signal donné par le CMH au TCR (150).

Finalement, après une discussion entre la CPA et le lymphocyte T, la CPA, influencée par les signaux de danger qui l'ont activée, sécrète différents médiateurs

chimiques (cytokines pro-inflammatoires, signal 3) qui permettent d'orienter la réponse immunitaire à médiation cellulaire vers une réponse adéquate (150). Par exemple, l'IL-12 est associé à une réponse de type Th1 adaptée pour combattre les infections virales (62, 150). L'IL-2 est quant à elle connue pour favoriser l'expansion de lymphocytes T et la génération de mémoire en fonction de la force de son signal. Une forte quantité d'IL-2 amènera la génération de Tem (151). Il est également à noter que les lymphocytes T mémoires ont des besoins réduits en signaux de co-stimulation, en cytokines et en signaux de survie (152).

CPAs compétentes : Des CPAs compétentes (activées) augmentent leur niveau de CMH et de molécules co-stimulatrices à leur surface cellulaire, et sécrètent différentes molécules pro-inflammatoires selon l'activation qu'elles ont subite. Cette activation fait généralement intervenir la voie des TLRs. Ces récepteurs, extra- ou intracellulaire, ont comme ligand de molécules conservées chez les pathogènes qui agissent comme signaux de dangers et d'activation pour les CPAs (112). Certaines molécules du soi relarguées en situation de stress, telles que les « heat-shock proteins », peuvent également être reconnues par les CPAs et contribuées à leur activation (153). La stimulation du récepteur CD40 peut également contribuer à l'activation des CPAs, en augmentant entre autres l'expression de molécules de la famille B7 (CD80 et CD86) (154, 155), telle qu'observée avec les signaux de dangers. En outre, les adjuvants peuvent permettre une telle maturation des CPAs et par conséquent améliorer la réponse cellulaire (66, 156, 157) (voir section Maturation extrinsèque des CPAs : adjuvants)

1.3.3.2.2 Aide des lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle généralement considéré primordial dans la réponse immunitaire (98, 129, 158). D'abord, ceux-ci permettent une activation optimale des lymphocytes B et augmentent leur capacité à produire des anticorps (158). D'ailleurs, la présence précoce de lymphocyte T CD4⁺ corrèle avec une meilleure persistance des anticorps contre le virus de l'influenza (159).

Ensuite, l'aide précoce des lymphocytes T CD4⁺ est essentielle à la génération d'une réponse robuste des lymphocytes T CD8⁺ mémoires dans plusieurs pathologies (« Lymphocytic choriomeningitis virus », cancer, rejet de greffes), etc.) (150, 160-165). L'interaction entre les molécules CD40 (CD8) et CD40L (CD4) permettraient, entre autres, une pleine activation des lymphocytes T CD8⁺ (166).

L'importance de l'aide des lymphocytes T CD4⁺ dans la réponse des lymphocytes T CD8⁺ mémoire est cependant controversée (167). En effet, celle-ci semble dépendre du modèle d'étude, type de virus, du mode d'infection (150), et des épitopes concernés (168).

Ainsi, les signaux offerts par les lymphocytes T CD4⁺ pourraient être remplacés par ceux d'autres populations cellulaires. Dans certains modèles de réponse cellulaire murine contre le virus de l'influenza, les CPAs peuvent fournir des signaux de co-stimulation nécessaires aux lymphocytes T CD8⁺ mémoires (169). Néanmoins, les APCs ont besoin, dans ce contexte, d'une stimulation de leur récepteur CD40 par les lymphocytes T CD4⁺ (169), soulignant l'importance de ce type cellulaire dans la réponse anti-influenza.

D'autres part, les lymphocytes T CD4⁺ peuvent participer directement à la réponse cellulaire en sécrétant des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, particulièrement dans le contexte du virus de l'influenza (158, 163). Ainsi, dans certains modèles, la réponse des lymphocytes T CD4⁺ seule diminue les symptômes grippaux (98, 158, 170).

Chez l'humain, des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques à des épitopes conservés fortement conservés entre les différentes souches d'influenza potentiellement pandémiques (H5N1 (123, 129, 171), A/H1N1 2009 (172, 173)) ont également été retrouvés chez des individus sains ayant recouverts du virus de l'influenza. La présence de ces épitopes suggère un rôle de cette population lymphocytaire dans une réponse hétérosubtypique antivirale, à l'instar de ce qui est observé dans les modèles animaux.

D'ailleurs, toujours chez l'humain, un niveau basal de lymphocytes T mémoires CD4⁺ Th1 spécifiques au virus de l'influenza corrèle avec une moins bonne réponse immunitaire humorale et cellulaire induite par les vaccins saisonniers (LAIV et TIV). Comme ces lymphocytes T présentent un phénotype effecteur (sécrétion d'IFN- γ) et non régulateur (inhibiteur), leur présence préalable aurait vraisemblablement engendré une réponse rapide contre les souches inactivées du virus de l'influenza, n'allouant pas le temps

à une nouvelle réponse immunitaire de s'installer (174). Cette observation suggère encore une fois un rôle des lymphocytes T CD4⁺ mémoire déjà présent dans une protection contre le virus vivant de l'influenza.

En résumé, l'aide des lymphocytes T CD4⁺ enrichit la réponse immunitaire à médiation cellulaire contre le virus de l'influenza. Une présentation antigénique efficace par CMH-II favorise une réponse à médiation cellulaire directe contre le pathogène et permet également permettre une meilleure réponse cellulaire mémoire.

1.3.4 Optimisation de la présentation par CMH-II : Mobilisation intracellulaire d'antigènes

La réponse immunitaire à médiation cellulaire mémoire, générée par une infection ou une vaccination préalable, confère, dans les modèles animaux, une protection hétérosubtypique contre le virus de l'influenza. Cette protection est cependant limitée contre des souches plus virulentes du virus, possiblement puisque la réponse immunitaire à médiation cellulaire peut prendre quelques jours avant d'être adéquatement réactivée (117). Par conséquent, il apparaît important d'optimiser la réponse immunitaire à médiation cellulaire contre l'influenza afin que celle-ci soit plus prompte à réagir. Une façon d'y parvenir est d'améliorer la présentation antigénique aux intervenants centraux de la réponse immunitaire à médiation cellulaire, les lymphocytes T CD4⁺.

1.3.4.1 Maturation extrinsèque des CPAs : adjuvants

Les adjuvants à base de squalène permettent d'augmenter la réponse cellulaire contre l'influenza. Ces adjuvants vont permettre la maturation des CPAs (augmentation des molécules de CMH-II, augmentation des molécules de co-stimulation, etc.), ce qui favorisera, entre autres, l'expansion de lymphocytes T CD4⁺ (82). Bien que les adjuvants soient sécuritaires et sans effets secondaires graves connus, il reste que ceux-ci agissent de façon non spécifique et pourraient engendrer une réponse immunitaire auto-immune, particulièrement chez les jeunes enfants. D'autres stratégies complémentaires sont à envisager.

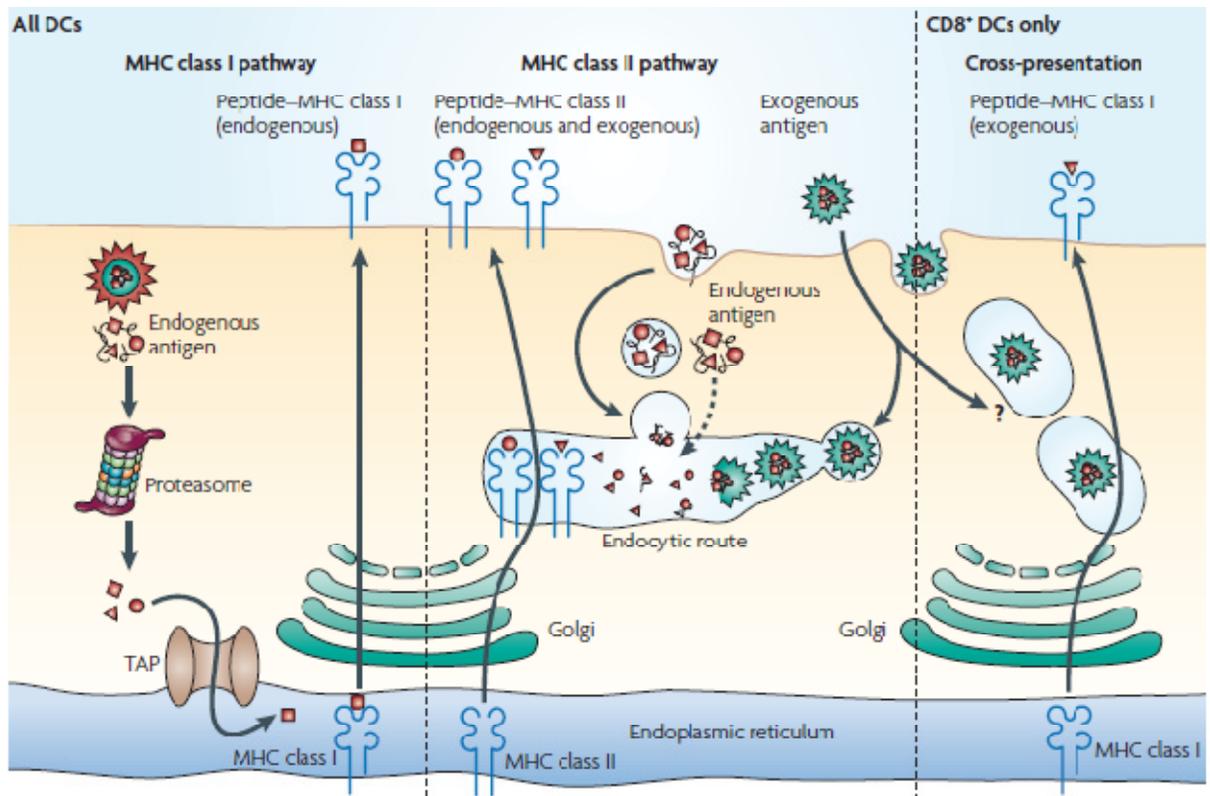


Figure 8. Mécanismes classiques de présentation antigénique par CMH-I et CMH-II par une CPA.

Adapté de Villadangos et Schnorrer, *Nature Reviews Immunology*, 2007 (175).

1.3.4.2 Optimisation de la présentation antigénique endogène : séquences de mobilisation vers les endosomes de gp100

Une stratégie alternative et plus ciblée consiste à rediriger une protéine exprimée de façon endogène vers les compartiments des CMH-II, un type particulier d'endosome. (Figure 8, « endocytic route »). Pour ce faire, certains groupes ont utilisé avec succès diverses stratégies basées sur des séquences protéiques de mobilisation vers les endosomes clonés en fusion avec une protéine cible (176, 177). Ils ont ainsi permis la présentation de peptides d'une protéine endogène par CMH-II afin de générer une réponse des lymphocytes T CD4⁺, sans altérer la présentation par CMH-I. Cette présentation croisée permet de favoriser la proximité des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dont l'interaction est importante pour la génération d'une réponse cellulaire mémoire efficace (160).

De telles séquences pourraient être insérées dans une stratégie de vaccination VVA par génétique inverse et permettre une activation plus spécifique du système immunitaire.

Dans le laboratoire du Dr Réjean Lapointe, les travaux de maîtrise de Stéphanie Lepage ont montré que les séquences N-terminal et C-terminal de la glycoprotéine (gp)-100 (un antigène tumoral du mélanome) peuvent rediriger une protéine vers les compartiments de CMH-II et augmenter de façon importante sa présentation par CMH-II sans altérer la présentation par CMH-I (148). Ces résultats suggèrent un rôle potentiel pour les séquences de mobilisation de gp100 dans une stratégie de vaccination.

Présence de lymphocytes T vs présentation antigénique

En terminant, il est clair que la présence de lymphocytes T CD4⁺, en plus des lymphocytes T CD8⁺, est cruciale afin de stimuler une réponse à médiation cellulaire (hétérosubtypique) mémoire efficace. Une telle réponse nécessite une variété d'épitopes de CMH-I et -II conservés à travers les souches d'un virus, tel que ceux retrouvés à l'intérieur des protéines M1 et NP du virus de l'influenza (voir section 1.3.2.2.2). Néanmoins, au-delà de la présence de lymphocytes T, les épitopes auxquels ceux-ci sont spécifiques doivent être apprêtés efficacement par des CPAs, tels que soulignés dans les sections précédentes. Or, la présentation antigénique des protéines M1 et NP du virus de l'influenza et leur capacité à stimuler des lymphocytes T de qualité sont peu caractérisées chez l'humain. Cela est particulièrement vrai pour la présentation endogène de ces protéines qui a lieu dans les vaccins actuels stimulant une réponse immunitaire à médiation cellulaire. En effet, les VVAs homologués n'impliquent que très peu de relargage viral alors que les vaccins à ADN impliquent principalement une expression endogène des antigènes. Ainsi, la présentation antigénique de protéines de l'influenza exprimée de façon endogène par des cellules spécialisées risque d'être primordiale dans l'activation d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Cette présentation d'antigènes endogènes de l'influenza a déjà été partiellement étudiée dans le cas de M1 (178, 179), mais jamais dans un contexte d'expansion *in vitro* de lymphocytes T mimant une vaccination chez l'humain, alors qu'elle n'a jamais été caractérisée pour NP.

1.3.5 Hypothèse et objectifs du projet de maîtrise

Contexte : L'influenza est un problème de santé mondial majeur en raison de l'impact des épidémies saisonnières et, surtout, des pandémies. Les méthodes de vaccination actuelles, axées sur une réponse à anticorps dirigée contre des antigènes hautement variables du virus, nécessitent la production d'un nouveau vaccin pour chaque nouvelle souche du virus de l'influenza. Une réponse cellulaire ciblant des antigènes conservés par la majorité des souches d'influenza, tels que M1 et NP, pourrait cependant permettre de contourner ce problème. Il existe cependant très peu de preuves directes de l'importance de la réponse immunitaire à médiation cellulaire contre l'influenza. Dans les modèles animaux, l'importance d'une telle réponse est indéniable et ses mécanismes sont relativement bien caractérisés (voir section 1.3.2). Par contre, chez l'humain, bien que de nombreux épitopes de lymphocyte T de M1 et NP conservés aient déjà été identifiés, une seule étude remontant à 1983 corrèle une bonne réponse immunitaire à médiation cellulaire avec une baisse de la charge virale (121).

Problématique : Il y a un besoin important d'établir les caractéristiques d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire hétérosubtypique robuste pour une vaccination plus efficace contre l'influenza. Or, la présentation antigénique endogène de M1 et de NP, qui a lieu dans certains vaccins actuels générant une réponse cellulaire, est peu caractérisée chez l'humain. Particulièrement, le phénotype des lymphocytes T produits par une telle présentation et les épitopes présentés restent à déterminer plus en détail. De plus, malgré l'identification de plusieurs épitopes de CMH-II conservés de M1 et de NP du virus de l'influenza, le niveau de présentation par CMH-II de ces protéines endogènes qui est nécessaire à une réponse cellulaire robuste reste inconnu.

1.3.5.1 Hypothèse

Une réponse immunitaire à médiation cellulaire mémoire efficace nécessite la présentation d'une protéine virale conservée par les CMH-I et -II, essentiels à l'activation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et T CD4⁺ « helper » respectivement. Ce projet de maîtrise vise à caractériser la présentation antigénique endogène par CMH-I et -II des protéines M1 et NP du virus de l'influenza à des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ humains dans un contexte de sensibilisation *in vitro*.

1.3.5.2 Objectifs

Ce projet de maîtrise se divise en 5 objectifs.

1. Analyser l'expression des constructions plasmidiques M1 et NP
2. Analyser la présentation antigénique par CMH-I et -II des protéines M1 et NP endogènes
3. Déterminer la capacité des protéines M1 et NP apprêtées de façon endogène par des CPAs à stimuler la prolifération de lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ spécifiques
4. Caractériser les lymphocytes T favorisés par la présentation des protéines M1 et NP endogènes par des CPAs dans un contexte de vaccination *in vitro*
5. Optimiser la présentation par CMH-II des protéines M1 et NP endogènes

Afin de répondre aux questions sous-tendant ces objectifs, nous avons cloné les protéines M1 ou NP en fusion avec des séquences de la protéine gp100 permettant la mobilisation vers les compartiments du CMH-II, sans affecter la présentation par CMH-I. À partir de ces constructions, nous avons procédé par stimulation *in vitro* de PBMCs humains par des CPAs exprimant de façon endogène les protéines M1 et NP et évaluer la qualité des lymphocytes T produits sur la base de sécrétion de cytokines et la présence de marqueurs mémoires. Le manuscrit du chapitre 2 présente les principaux résultats de ce projet

Chapitre 2. Manuscrit: Endogenously-expressed influenza A M1 and NP proteins are efficiently presented by class-I and-II major histocompatibility complexes

Running title: Endogenous influenza proteins are efficiently presented

Jean-Daniel Doucet^a, Marie-Andrée Forget^a, Cécile Grange^a, Ronan Nicolas Rouxel^b, Nathalie Arbour^a, Veronika von Messling^b and Réjean Lapointe^{a*}.

^a Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)-Hôpital Notre-Dame, Université de Montréal and Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada;

^b INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, Laval, Canada

*Correspondence to Réjean Lapointe:

Centre de recherche du CHUM - Hôpital Notre-Dame

Pavillon JA DeSève Room Y-5605

2099 rue Alexandre DeSève,

Montréal, Québec, Canada, H2L 2W5

Telephone: 001-514-890-8000 #25489(office) #25504(lab)

Fax: 001-514-412-7591

Contribution de l'étudiant: Les expériences des figures 1 à 5 ont été réalisées par Jean-Daniel Doucet. Les expériences de la Figure supplémentaire 1 ont été réalisées en collaboration avec Marie-Andrée Forget et Cécile Grange, de la Figure supplémentaire 3 en collaboration avec Marie-Andrée Forget et de la Figure supplémentaire 5 avec Ronan Rouxel. Nathalie Arbour a participé à l'analyse des résultats. Le manuscrit a été rédigé par Jean-Daniel Doucet. Marie-Andrée Forget, Réjean Lapointe, Veronika von Messling et Nathalie Arbour ont participé à la révision du manuscrit.

Manuscrit accepté dans *Journal of General Virology*

Summary

Current influenza vaccines containing primarily hyper-variable hemagglutinin and neuraminidase proteins must be prepared against new strains. Therefore, there is an ongoing effort to develop influenza vaccines that also elicit strong and sustained cytotoxic responses against highly-conserved determinants such as the matrix (M1) protein and nucleoprotein (NP). However, their antigenic presentation properties in humans are less defined. Accordingly, we analyzed MHC-I and -II presentation of endogenously-processed M1 and NP in human antigen presenting cells and observed expansion of both CD8⁺ and CD4⁺ specific effector T lymphocytes secreting interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF). Further enhancement of basal MHC-II antigenic presentation did not improve CD4⁺ or CD8⁺ T cell quality based on cytokine production upon challenge, suggesting that endogenous M1 and NP MHC-II presentation is sufficient. These new insights about T lymphocyte expansion following endogenous M1 and NP MHC-I and -II presentation will be important to design complementary heterosubtypic vaccination strategies.

Introduction

Current trivalent inactivated influenza vaccines (TIV) mainly induce a humoral response against hypervariable hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) surface antigens. Hence, production of new vaccines is required for every new influenza strains. Considering the ongoing threat of an influenza pandemic (WHO, 2009), vaccines targeting better conserved antigens are required. The influenza A matrix protein (M1) and nucleoprotein (NP) share more than 90 % amino acid sequence identity even between distant influenza A subtypes (Heiny et al., 2007), and Supplementary Table 1). Moreover, many human M1 and NP T cell epitopes are essential for the virus' fitness (Berkhoff et al., 2006) and are thus well-conserved (Bui et al., 2007; Lee et al., 2008). In contrast, HA and NA vary in up to 40 % their amino acid sequences. These differences are mainly seen in the extracellular globular head of the HA glycoprotein, which contains the receptor binding site (Schweiger et al., 2002) whose inhibition is critical to prevent cell-entry of the virus. Hence, HA glycoprotein is less likely to induce heterosubtypic cross-reactive immunity.

Viral proteins must be processed by infected cells or antigen presenting cells (APCs) to elicit a cellular immune response. Although such a response does not confer sterile immunity to influenza, it has been shown to mediate influenza virus clearance in animal models (Thomas et al., 2006) and in humans (McMichael et al., 1983). In animal models, a cellular immune response has long been associated with heterosubtypic protection against various influenza A strains (Furuya *et al.*, 2010; Taylor & Askonas, 1986), including H5N1 (Epstein et al., 2002; Price et al., 2009; Zhirnov et al., 2007) and the 2009 pandemic H1N1 (Skountzou et al., 2010). It has also been established that M1 and NP (Kreijtz et al., 2008; Lee et al., 2008) are the main targets of the human immune cellular response against influenza, similarly to HA and NA for the humoral immune response. Hence, recent reports strongly suggest that M1 and NP could be very relevant targets for an influenza pan-specific vaccine.

A wide range of conserved major histocompatibility complexes of class (MHC) - I and -II influenza A NP- and M1-specific epitopes has been characterized (Jameson *et al.*, 1999; Kreijtz *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008). However, little is known about how

influenza protein processing in human APCs stimulates expansion of T lymphocytes, particularly when these proteins are endogenously-expressed, which would most likely be the case in T cell-stimulating vaccines. Most studies on epitope identification with influenza-specific human T cells have exploited peptide libraries covering the influenza genome (Kreijtz et al., 2008; Lee et al., 2008), exogenously loaded proteins (Gschoesser et al., 2002), or influenza infected cells (Gschoesser et al., 2002; Jameson et al., 1999; Kreijtz et al., 2008). In the latter 2 cases, some of the processed proteins could originate from an exogenous source potentially involving the endosomal pathway, while use of peptide libraries excludes endogenous processing pathways. In contrast, vaccines inducing M1- and NP-specific T cell expansion, such as the live-attenuated virus vaccines (LAIV) most likely involve endogenous expression of these proteins. Endogenously-expressed M1 is known to be presented by MHC-I and cross-presented by MHC-II in human APCs (Jaraquemada et al., 1990; Nuchtern et al., 1990). However, the magnitude and importance of MHC-II cross-presentation of endogenous M1 is unclear (Schmid et al., 2007), and no information is available regarding NP MHC-II cross-presentation. It is also unclear whether MHC-II cross-presentation can stimulate a robust *in vitro* expansion of specific T lymphocytes.

Here, we sought to characterize the MHC-I and -II presentation of endogenous influenza M1 and NP antigens in a T-cell-inducing vaccine-like context for the first time. We performed *in vitro* T cell sensitization assays, by stimulating normal donor (ND) PBMCs with autologous APCs expressing endogenous M1 or NP antigens from a DNA plasmid and by characterizing the ensuing CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocyte response. Considering the capacity of endogenously-expressed M1 to be presented by MHC-II, we questioned whether NP shared similar properties. Finally, we investigated whether the level of MHC-II cross-presentation was sufficient for M1 and NP CD4⁺ T cell expansion, which plays a key role in cellular immune responses.

Results

Efficient presentation of MHC-I and -II epitopes derived from M1 and NP to human CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes

Initially, we evaluated whether endogenous wild type (WT) influenza M1 and NP protein are efficiently presented by human MHC-I and -II. We electroporated CD40-activated B lymphocytes (CD40-B cells) with M1- and NP-encoding plasmids (Figure 1a) and co-cultured them with previously generated autologous M1- or NP-specific CD8⁺ or CD4⁺ T cell clones. CD40-B cells are valuable model APCs because they can be expanded from a limited quantity of PBMCs, while possessing antigen presenting characteristics comparable to dendritic cells (DC) (Lapointe et al., 2003; Schultze et al., 1997). In these cells, endogenously-expressed M1 and NP proteins were both recognized by CD8⁺ (Figure 1c, black bars) and by CD4⁺ T cell clones (Figure 1d, black bars). To our knowledge, this represents the first report of NP MHC-II cross-presentation. Observed M1 MHC-II cross-presentation is in agreement with previous work (Jaraquemada *et al.*, 1990; Nuchtern *et al.*, 1990).

We next questioned whether this MHC-II presentation to CD4⁺ T cells could be enhanced to favor a better cellular immune response. We fused the M1 and NP genes with previously characterized gp100 MHC-II mobilization sequences (Figure 1b; referred to as gp-M1 and gp-NP). These sequences enhance the MHC-II presentation of endogenous proteins by targeting them to endosomal compartments without disrupting presentation of MHC-I epitopes (Lepage & Lapointe, 2006).

To compare M1 and NP expression levels with or without gp100 MHC-II enhancing sequences in human cells, their expression in HEK-293T cells was assessed by Western blotting (M1) and intracellular staining (NP). Both M1 (27.9 kDa) and gp-M1 (39.9 kDa) were produced at comparable levels (Figure 1e). The faster-migrating band in the gp-M1 lane represents the gp-M1 fusion protein after gp100 signal peptide (SS) cleavage. The proportions of NP- and gp-NP-transfected cells were also similar for both proteins, as were their expression level as determined by the mean fluorescence intensity (MFI) determined by flow cytometry (Figure 1f). Thus, both WT (M1 or NP) and MHC-II-enhanced (gp-M1 or gp-NP) proteins were produced at similar levels.

Accordingly, M1 and gp-M1 were equally recognized by a CD8⁺ T cell clone specific to the well-characterized and conserved HLA-A2 restricted M1⁵⁸⁻⁶⁶ epitope (Bednarek et al., 1991; Touvrey et al., 2009) (data not shown). Overall, gp100 MHC-II mobilization sequences did not seem to affect M1 or NP expression levels.

Consistent with the previously-reported enhancement of MHC-II presentation associated with the gp100 sequences (Lepage & Lapointe, 2006), gp-M1 and gp-NP resulted in higher interferon-gamma (IFN- γ) secretion by CD4⁺ T cell clones compared to their WT counterparts (Figure 1d, grey bars), while MHC-I presentation to CD8⁺ T cells was slightly down-modulated (Figure 1c, grey bars). It was unclear, however, if enhanced MHC-II presentation improved CD4⁺ and CD8⁺ T cell expansion.

Expansion of human T lymphocytes by in vitro T cell sensitization with endogenously-expressed M1 and NP

To evaluate if enhanced MHC-II presentation improved CD4⁺ and CD8⁺ T cell expansion, we next stimulated PBMCs with autologous CD40-B cells electroporated with M1, gp-M1, NP or gp-NP plasmids. Bulk T cell cultures were re-stimulated according to the same procedure on day 7. T cells were tested for specificity to their relevant antigens on day 21 of the expansion protocol, 14 days after antigen stimulation to obtain sufficient cell counts.

Recognition assays from T cell expansions were performed with 3 representative HLA-A2⁺ normal donors. All donors developed M1- and NP-specific T cell lines when stimulated with M1 and NP, with or without enhancement of MHC-II presentation, as determined by IFN- γ secretion (Figure 2a and b). Addition of antibodies blocking MHC-I and -II presentation of APCs revealed that most of M1 and NP T cell lines were composed of CD8⁺ T cells as IFN- γ secretion was inhibited by MHC-I specific antibodies (black arrows). A similar IFN- γ response by CD8⁺ T cells was observed in 3 additional normal donors (Supplementary Figure 1a, c and d). Among these T cell lines, at least one responded to the defined M1⁵⁸⁻⁶⁶ epitope (Supplementary Figure 1d), which is consistent with reports of the M1⁵⁸⁻⁶⁶ epitope being an important part of a relatively broad influenza T cell epitope response in HLA-A2⁺ normal donors (Boon et al., 2002).

Furthermore, M1 and NP stimulations of bulk T cells resulted in the generation of CD4⁺ T cells secreting significant amounts of IFN- γ , since MHC-II blocking antibodies interfered with IFN- γ secretion by M1- (ND#2, 3), NP- (ND#3) and gp-NP- (ND#2) grown T cell lines (Figure 2a and b, white arrows). Similar results were also obtained with gp-M1 expanded T cell lines with 2 other normal donors (Supplementary Figure 1b and c). Moreover, a single cell line may contain a heterogeneous population of both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes thereby explaining effect of both MHC-I and -II blocking antibodies on certain cell lines (M1-grown, ND#2, 3). However, expansion of CD4⁺ T cells was independent of the presence of the MHC-II enhancing sequences. The efficacy of the MHC-blocking antibodies was controlled by the blockade or strong inhibition of IFN- γ secretion by previously-isolated CD8⁺ or CD4⁺ T cell clones (Figure 2c-d).

Together, these results indicate that both CD8⁺ and CD4⁺ T cells can be simultaneously expanded by exposure to endogenous M1 and NP in an *in vitro* T cell sensitization assay, with or without enhancement of MHC-II presentation, based on IFN- γ secretion from the bulk T cell population. However, in addition to IFN- γ , other Th1 cytokines are required for optimal antiviral activity. Indeed, multi-cytokine secretion is intimately linked to robust immune cellular responses.

Effector cytokine secretion of M1- and NP-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell

Accordingly, we investigated the quality of M1 and NP CD8⁺ T cells generated by *in vitro* T cell sensitization at the single cell level. More specifically, we evaluated whether the intrinsic endogenous MHC-II presentation of M1 and NP antigens was sufficient for the generation of CD4⁺ T cell-mediated help that could improve the quality of expanded CD8⁺ T cells. We, therefore, analyzed multi-cytokine expression (IFN- γ , tumor necrosis factor (TNF) and interleukin (IL)-2) by M1- and NP-specific T cells after stimulation with their cognate antigen using intracellular cytokine staining (ICS). An example of the gating strategy is shown in Supplementary Figure 2. While no IL-2 expression was detected in any of the CD8⁺ T cell lines tested (data not shown), 0.5-4 % of T cells from each line produced both TNF and IFN- γ (Figure 3a-c). Up to

6 % of T cells were single IFN- γ producers, and up to 3 % produced TNF only (Figure 3a-c). Furthermore, CD8⁺ T cell clones expanded with either gp-M1- or NP-expressing APCs presented the degranulation marker CD107a on their cellular surface after antigen-specific stimulation (Supplementary Figure 3a). MIP-1 β , an important chemokine for the recruitment of memory T cells and other immune cell types, was also detected in most M1- and NP-specific T cell lines (Supplementary Figure 3b).

Consistent with IFN- γ quantification (Figure 2), MHC-II-enhanced presentation of M1 and NP did not result in increased CD4⁺ T cell responders (Figure 4). Comparable proportions of TNF⁺ or TNF⁺/IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells were obtained in M1- and NP-specific T cell lines expanded with either MHC-II-enhanced or WT sequences. In contrast to CD8⁺ T cells, low IL-2 levels were occasionally detected in CD4⁺ T cells (Figure 4b).

Overall, our results indicate that, in the context of *in vitro* T-cell sensitization, the intrinsic MHC-II presentation of endogenously-expressed M1 and NP antigens is sufficient for Th1 cytokine secretion of specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The secretion of Th1 cytokines further suggests an effector phenotype of the expanded M1- and NP-specific T lymphocytes.

Phenotype of M1- and NP-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells

To pursue phenotypic characterization of IFN- γ -secreting M1- and NP-specific T cells, surface marker profile was analyzed. Most cells lacked the naive marker CD45RA, the secondary lymphoid tissue "homing" receptor CD62L (Figure 5), and the IL-7 receptor (CD127) (Supplementary Figure 4), consistent with an effector T cell phenotype. Again, there were no major differences between the phenotype of CD8⁺ T cells from either MHC-II-enhanced or WT M1- and NP-grown T cell lines (Figure 5a), and a similar phenotype was observed in CD4⁺ T cells (Figure 5b).

Discussion

A robust cellular immune response against conserved influenza M1 and NP could provide heterosubtypic immunity to influenza. Current TIVs do not induce a good cellular immune response. However, available modified LAIV (Mueller et al., 2010) or DNA vaccines in development (Kim & Jacob, 2009; Moss, 2009) are expected to trigger strong humoral and cellular immune responses. These influenza vaccines will most likely involve endogenous expression of antigens in APCs. Hence, this study focused on the characterization of MHC-I and -II presentation of endogenously-expressed M1 and NP conserved influenza proteins by model APCs which expanded both CD8⁺ and CD4⁺ specific T lymphocytes from human PBMCs in *in vitro* T cell sensitization assays. Furthermore, although MHC-II presentation was increased by the addition of gp100 MHC-II mobilization sequences, the quality of expanded M1- and NP-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells was comparable between MHC-II-enhanced or WT proteins expressed by APCs.

In line with previous reports that identified a variety of MHC-I and -II T cell epitopes in M1 and NP recognized by most individual's PBMCs (Gschoesser et al., 2002; Jameson et al., 1999; Kreijtz et al., 2008; Lee et al., 2008), we expanded both M1- and NP-specific T lymphocytes from PBMCs of different HLA-A2⁺ normal donors. We have also identified some MHC epitopes recognized by these T cells (Doucet *et al.*, 2010). However, many of the previous studies on influenza antigen presentation have focused on clonal T cell populations that may have been altered during isolation. In contrast, we speculate that T cell lines expanded in the current study more closely mimic *in vivo* polyclonal expansion. Accordingly, we obtained around 5-6 % of specific T lymphocytes, which is consistent with the proportion of antigen-specific T cell expanded *in vivo*.

Furthermore, both CD8⁺ and CD4⁺ M1- and NP-specific T cells were expanded. Classically, the MHC-II presentation of endogenously-processed proteins to CD4⁺ T cells is considered limited and restricted to exogenous proteins (Rush et al., 2002; Van den Bosch et al., 2006; Voo et al., 2002). MHC-I and-II Influenza antigenic cross-presentation has, however, been reported. Soluble NP can be cross-presented by MHC-I

in PBMCs (Gschoesser et al., 2002), whereas endogenous WT M1 can be cross-presented by MHC-II (Jaraquemada *et al.*, 1990; Nuchtern *et al.*, 1990). Thus, we report similar NP MHC-II antigenic cross-presentation for the first time. It is also possible that M1 and NP got endocytosed from dying-electroporated APCs as a secondary classical MHC-II presentation mechanism. Nonetheless, there is MHC-II presentation to previously expanded CD4⁺ T cells (Figure 1f). In this case, the short period of time between APCs electroporation and their co-culture with the CD4⁺ T cells doubtfully allows for dead APCs to be taken up by other APCs for classical MHC-II antigenic processing.

Hence, the precise mechanism of endogenous M1 and NP MHC-II cross-presentation is unclear. In the case of M1, it does not involve the classical endosomal secretory pathway (Jaraquemada *et al.*, 1990; Nuchtern *et al.*, 1990), the proteasome, nor the transporter associated with antigen processing (TAP), but does instead depend on lysosomal proteases (Guéguen & Long, 1996). Considering the nuclear (NP and M1) and cytoplasmic (M1) localization of these proteins, autophagy, involved in influenza A replication, could be a plausible MHC-II cross-presentation mechanism (Schmid *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009).

MHC-II antigenic cross-presentation of influenza antigens is of particular interest since the anti-influenza CD4⁺ helper T cells are crucial for specific cellular immune responses (Janssen *et al.*, 2003; Maecker *et al.*, 1998; Swain *et al.*, 2006). Our *in vitro* experimental setting did not allow long-term T cell culture and therefore prevented the evaluation of the role of CD4⁺ T cells in long-term CD8⁺ memory T cell expansion. Nevertheless, expanded CD4⁺ T cells could directly participate in the peripheral anti-influenza immune response by secreting inflammatory cytokines/chemokines (Nakanishi et al., 2009; Swain et al., 2006).

Moreover, MHC-II presentation level of endogenous M1 and NP could be enhanced by MHC-II-enhancing sequences as performed before with autophagosome-associated protein Atg8/LC3 MHC-II-enhancing sequences (Gschoesser et al., 2002). However, in our setting, MHC-II-enhancing did not reflect on the number of cytokine secretors (IFN- γ , TNF and IL-2, Figure 4), or on a change in CD4⁺ or CD8⁺ T cell phenotype (Figure 5).

Multifunctionality is a hallmark of an efficient anti-viral T cell response (Akondy et al., 2009; De Rosa et al., 2004; Miller et al., 2008; Seder et al., 2008) and is less characterized in human influenza-specific T cells (Lee et al., 2008; Touvrey et al., 2009), particularly after stimulation with multiple potential epitopes. In all donors, TNF and/or IFN- γ secreting M1- and NP-specific CD8⁺ T lymphocytes were detected, indicating the presence of Tc1 influenza-specific effector CD8⁺ T cells implicated in influenza virus clearance and protection (Baumgarth & Kelso, 1996; Deng *et al.*, 2004; Hikono *et al.*, 2006).

Furthermore, M1- and NP-specific T cell lines secreted MIP-1 β . C-C chemokine receptor 5 (CCR5), MIP-1 β 's receptor, is transiently upregulated on CD8⁺ memory T cells after influenza infection and has been shown to be crucial for virus control in mice (Kohlmeier et al., 2008). M1- and NP-specific T cells also degranulated upon antigen-specific stimulation, suggesting potential cytotoxic activity that is also critical in influenza virus clearance, although the presence of lytic enzymes was not assessed.

Altogether, our data suggest sufficient MHC-I and -II presentation of M1 and NP proteins for multifunctional effector T cell expansion, at least upon short term stimulation. Notably, NP-specific mouse CD8⁺ T cells also present an effector phenotype 10 days following NP DNA vaccine immunization or influenza infection (Supplementary Figure 5).

We also observed a comparable effector phenotype of M1- and NP-specific T cells expanded with or without MHC-II enhanced presentation, as determined by CD45RA and CD62L expression. However, in contrast to other studies carried out on influenza M1⁵⁸⁻⁶⁶-specific T cells (Touvrey et al., 2009), we did not detect CD127, a marker present on both naive and memory T cells, on M1- and NP-specific effector (CD45RA⁻/CD62L⁻) T cells. The lack of this marker may be explained by the early stage of effector T cells which did not yet re-express detectable levels of CD127 or by subtypes of memory T cell not expressing CD127 (Bachmann et al., 2005; Boettler et al., 2006; Touvrey et al., 2009). We also used IL-2 to expand T cells to sufficient numbers for our experiments, which could have favored an effector phenotype.

Taken together, our results demonstrate that endogenously-expressed influenza M1 and NP are sufficiently well presented by MHC-I and -II for *in vitro* short-term CD8⁺ and CD4⁺ T cell activation. The mechanism by which influenza M1 and NP are cross-presented by MHC-II remains to be defined but could involve autophagy, among other alternative MHC cross-presenting pathways identified recently. Thus, the diversity of antigen presentation mechanisms appears to depend on the pathogen studied and could, therefore, contribute to reconfiguration and improvement of influenza vaccine strategies.

Materials and methods

Peripheral blood mononuclear cells

PBMCs obtained from healthy individuals after informed consent were separated from heparinized donor blood as described previously (Pelletier et al., 2009). PBMCs were cryopreserved in 90 % FBS (Wisent) /10 % DMSO (Sigma), and stored in liquid nitrogen.

Generation of CD40-activated B lymphocytes (CD40-B cells)

CD40-B cells were generated as described previously (Lapointe et al., 2003). Briefly, recombinant soluble CD40L (1,000 ng·ml⁻¹) (Immunex Corporation) and recombinant human IL-4 (250 U·ml⁻¹; Peprotech) were added to PBMCs on the first day which were then cultured in complete medium, consisting of Iscove's modified Dulbecco's complete medium (Invitrogen) supplemented with 7.5 % human AB serum (heat-inactivated, Gemini Bio-products), 2 mM L-glutamine, 100 U·ml⁻¹ penicillin, 100 g·ml⁻¹ streptomycin, and 10 g·ml⁻¹ gentamicin (Wisent). Fresh complete medium containing 250 U·ml⁻¹ IL-4 and 1,000 ng·ml⁻¹ CD40L was added on day 3. After the first round of proliferation (days 5-8), cells were either frozen for future use or re-stimulated every 2-3 days when the culture reached a density of 1.5-2 x 10⁶ cells·ml⁻¹, about 40 to 90 % of proliferating cells being CD19⁺ HLA-DR⁺ B lymphocytes.

Plasmids

NP and M1 from the influenza virus A/Puerto Rico/8/1934/H1N1 (PR8) strain (uniprot # P03466 (NP) and # P03485 (M1)), from which the first methionine was deleted, were cloned between the putative NH₂-terminal signal sequence (first 23 residues) and the last 84 residues from gp100, which includes previously-characterized MHC-II compartment mobilization sequences (Lepage & Lapointe, 2006). The resulting constructs, named gp-NP, gp-M1 and WT NP and M1 cDNA sequences, were optimized with GeneOptimizer[®] from Geneart and cloned in pcDNA3.1(+) plasmid (Invitrogen). The plasmids were transformed into *E. coli* one shot top 10 competent cells[®] (Invitrogen) and prepared with Mega-Prep kit (Qiagen).

Cell lines

HEK-293T cells, obtained from ATCC, were cultured in RPMI 1640 (Wisent) supplemented with 10 % heat-inactivated FBS (Wisent), 2 mmol·L⁻¹ L-glutamine, 100 units·ml⁻¹ penicillin/streptomycin, and 10 µg·ml⁻¹ gentamicin (R-10). Cells were cryopreserved in 90 % R-10 /10 % DMSO, and stored in liquid nitrogen.

Western blotting

HEK-293T cells were transfected with M1 or gp-M1 plasmids using lipofectaminetm and Plustm reagents (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 24 h, protein extracts from pelleted cells were prepared, quantified and resolved by 10 % SDS-PAGE, as performed previously (Turcotte et al., 2007). An anti-M1 mouse monoclonal antibody (1/200; clone GA2B, AbD Serotec) and a secondary peroxidase- conjugated goat anti-mouse antibody (1/10,000; Chemicon) were employed for Western blotting revelation.

Electroporation of APCs

APCs were electroporated with a MP-100 microporator (Digital-bio) following procedures according to the manufacturer. Briefly, CD40-B cells (1-2x10⁶) were sedimented for 15 min at 700 r.p.m., resuspended in 200 µl of resuspension buffer (Digital-bio) and mixed with 3 µg·10⁻⁶ cells of DNA. The cells were immediately electroporated with 1 pulse at 1,700 V for 20 ms and resuspended at 1X10⁶ cells·ml⁻¹ of Iscove's modified Dulbecco's complete medium containing 10 % FBS and 2 mM L-glutamine (all from Wisent), without antibiotics.

Expansion of M1- or NP-specific peripheral T lymphocytes and cloning of antigen-specific bulk T cell cultures

PBMCs were stimulated with autologous CD40-B cells electroporated with the M1, gp-M1, NP or gp-NP DNA plasmids in a 2:1 ratio. On day 7, bulk T cells were restimulated according to the same procedure, and 150-300 IU·ml⁻¹ of IL-2 (Feldan Bio) were added to the cultures on the following day and every 2–3 days. T cell specificity

was assessed on day 21 on the basis of cytokine secretion by ELISA or by intracellular cytokine assay. T cell lines or clones (5×10^4) were co-cultured with CD40-B cells (5×10^4) electroporated with DNA or pulsed with peptides. IFN- γ secretion was measured by ELISA as previously described (Pelletier et al., 2009). In some recognition assays, CD40-B cells were pre-pulsed for 20 min at 37°C under 5 % CO₂ with 40-80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of blocking antibodies specific for either MHC-I (clone W6/32) or MHC-II (clone IV A12).

M1- or NP-specific bulk T cells expanded as mentioned earlier were cloned by limiting dilution and cultured as previously described (Lapointe et al., 2003). T cell clone phenotypes were analyzed by flow cytometry, and their specificities were evaluated as before by co-culture with M1- or NP- electroporated CD40-B cells on the basis of their IFN- γ secretion.

Recognition assays

IFN- γ ELISA were performed as before (Pelletier et al., 2009), while MIP-1 β ELISA were performed with the CCL4/ MIP-1 β DuoSet® kit (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

For ICS, T cell lines were co-cultured with autologous CD40-B cells electroporated with M1, gp-M1, NP or gp-NP DNA plasmids in a 2:1 ratio for 1 h and for an additional 6h in the presence of brefeldin A ($5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; Sigma). The cells were stained with Alexa-700, Pacific Blue and Allophycocyanin (APCy) -H7-conjugated antibodies specific to human CD3, CD4, and CD8 respectively (all from BD Biosciences). For T cell phenotype analysis, the cells were also stained with APCy, PE and FITC-conjugated antibodies specific for human CD62L, CD127 and CD45RA or corresponding isotype controls (all from BD Biosciences). Dead cells were excluded by staining with the live/dead fixable dead cell stain Kits (Invitrogen) when indicated. The cells were surface stained, fixed and permeabilized with FoxP3 staining buffer set (eBioscience) according to the manufacturer's instructions. Intracellular staining was performed with antibodies against IFN- γ (eBioscience), TNF, IL-2 (the latter 2 from BD Biosciences) or corresponding isotype controls. Flow cytometry data was acquired using

LSRII instrument (BD Bioscience), and analyzed by FlowJo software (Tree Star) with a Boolean gating strategy.

For intracellular detection of NP, HEK-293T cells were transfected as before, with NP or gp-NP with a fluorescein-conjugated antibody against influenza A NP (Argene, cat #12-030).

Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; Grant # PAN-83153). R.L. and J.-D.D. are recipients of scholarships from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). N.A. holds a Donald Paty Career Development Award from the Multiple Sclerosis Society of Canada and a Chercheur-Boursier from the FRSQ. The authors thank Jessica Godin-Ethier and Mélissa Mathieu for helpful discussions, Alexandre Reuben for careful reading of this manuscript and Ovid Silva and the CRCHUM Research Support Office (Bureau d'aide à la recherche) for manuscript editing.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

References

- Akondy, R. S., Monson, N. D., Miller, J. D., Edupuganti, S., Teuwen, D., Wu, H., Quyyumi, F., Garg, S., Altman, J. D. & other authors (2009). The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8⁺ T cell response. *J Immunol* **183**, 7919-7930.
- Bachmann, M. F., Wolint, P., Schwarz, K., Jäger, P. & Oxenius, A. (2005). Functional properties and lineage relationship of CD8⁺ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor α and CD62L. *J Immunol* **175**, 4686-4696.
- Baumgarth, N. & Kelso, A. (1996). *In vivo* blockade of gamma interferon affects the influenza virus-induced humoral and the local cellular immune response in lung tissue. *J Virol* **70**, 4411-4418.
- Bednarek, M. A., Sauma, S. Y., Gammon, M. C., Porter, G., Tamhankar, S., Williamson, A. R. & Zweerink, H. J. (1991). The minimum peptide epitope from the influenza virus matrix protein. Extra and intracellular loading of HLA-A2. *J Immunol* **147**, 4047-4053.
- Berkhoff, E. G. M., de Wit, E., Geelhoed-Mieras, M. M., Boon, A. C. M., Symons, J., Fouchier, R. A. M., Osterhaus, A. D. M. E. & Rimmelzwaan, G. F. (2006). Fitness costs limit escape from cytotoxic T lymphocytes by influenza A viruses. *Vaccine* **24**, 6594-6596.
- Boettler, T., Panther, E., Bengsch, B., Nazarova, N., Spangenberg, H. C., Blum, H. E. & Thimme, R. (2006). Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8⁺ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol* **80**, 3532-3540.
- Boon, A. C. M., de Mutsert, G., Graus, Y. M. F., Fouchier, R. A. M., Sintnicolaas, K., Osterhaus, A. D. M. E. & Rimmelzwaan, G. F. (2002). The magnitude and specificity of influenza A virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in humans is related to HLA-A and -B phenotype. *J Virol* **76**, 582-590.
- Bui, H.-H., Peters, B., Assarsson, E., Mbawuike, I. & Sette, A. (2007). Ab and T cell epitopes of influenza A virus, knowledge and opportunities. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 246-251.
- De Rosa, S. C., Lu, F. X., Yu, J., Perfetto, S. P., Falloon, J., Moser, S., Evans, T. G., Koup, R., Miller, C. J. & other authors (2004). Vaccination in humans generate broad T cell cytokine responses. *J Immunol* **173**, 5372-5380.
- Deng, Y., Jing, Y., Campbell, A. E. & Gravenstein, S. (2004). Age-related impaired type 1 T cell responses to influenza: reduced activation ex vivo, decreased expansion in CTL culture in vitro, and blunted response to influenza vaccination in vivo in the elderly. *J Immunol* **172**, 3437-3446.
- Doucet, J.-D., Gauchat, D. & Lapointe, R. (2010). Brief Communication: Identification of T cell epitopes by a novel mRNA PCR-based epitope chase technique. *J Immunother*, in press.
- Epstein, S. L., Tumpey, T. M., Mispion, J. A., Lo, C. Y., Cooper, L. A., Subbarao, K., Renshaw, M., Sambhara, S. & Katz, J. M. (2002). DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerg Infect Dis* **8**, 796-801.

- Furuya, Y., Chan, J., Regner, M., Lobigs, M., Koskinen, A., Kok, T., Manavis, J., Li, P., Müllbacher, A. & other authors (2010).** Cytotoxic T cells are the predominant players providing cross-protective immunity induced by gamma-irradiated influenza A viruses. *J Virol* **84**, 4212-4221.
- Gschoesser, C., Almanzar, G., Hainz, U., Ortin, J., Schonitzer, D., Schild, H., Saurwein-Teissl, M. & Grubeck-Loebenstein, B. (2002).** CD4⁺ and CD8⁺ mediated cellular immune response to recombinant influenza nucleoprotein. *Vaccine* **20**, 3731-3738.
- Guéguen, M. & Long, E. O. (1996).** Presentation of a cytosolic antigen by major histocompatibility complex class II molecules requires a long-lived form of the antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14692-14697.
- Heiny, a. T., Miotto, O., Srinivasan, K. N., Khan, A. M., Zhang, G. L., Brusic, V., Tan, T. W. & August, J. T. (2007).** Evolutionarily conserved protein sequences of influenza A viruses, avian and human, as vaccine targets. *PLoS One* **2**, e1190.
- Hikono, H., Kohlmeier, J. E., Ely, K. H., Scott, I., Roberts, A. D., Blackman, M. A. & Woodland, D. L. (2006).** T-cell memory and recall responses to respiratory virus infections. *Immunol Rev* **211**, 119-132.
- Jameson, J., Cruz, J., Terajima, M. & Ennis, F. A. (1999).** Human CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocyte memory to influenza A viruses of swine and avian species. *J Immunol* **162**, 7578-7583.
- Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G. & Schoenberger, S. P. (2003).** CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* **421**, 852-856.
- Jaraquemada, D., Marti, M. & Long, E. O. (1990).** An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J Exp Med* **172**, 947-954.
- Kim, J. H. & Jacob, J. (2009).** DNA vaccines against influenza viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **333**, 197-210.
- Kohlmeier, J. E., Miller, S. C., Smith, J., Lu, B., Gerard, C., Cookenham, T., Roberts, A. D. & Woodland, D. L. (2008).** The chemokine receptor CCR5 plays a key role in the early memory CD8⁺ T cell response to respiratory virus infections. *Immunity* **29**, 101-113.
- Kreijtz, J. H., Mutsert, G. D., Baalen, C. A. V., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D. & Rimmelzwaan, G. F. (2008).** Cross-recognition of avian H5N1 influenza virus by human cytotoxic T lymphocyte populations directed to human influenza A virus. *J Virol* **82**, 5161-5166.
- Lapointe, R., Bellemare-Pelletier, A., Housseau, F., Thibodeau, J. & Hwu, P. (2003).** CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res* **63**, 2836-2843.
- Lee, L. Y.-h., Lien, D., Ha, A., Simmons, C., Jong, M. D. D., Chau, N. V. V., Schumacher, R., Peng, Y. C., McMichael, A. J. & other authors (2008).** Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals. *J Clin Invest* **118**, 3478-3490.

- Lepage, S. & Lapointe, R. (2006).** Melanosomal targeting sequences from gp100 are essential for MHC class II-restricted endogenous epitope presentation and mobilization to endosomal compartments. *Cancer Res* **66**, 2423-2432.
- Maecker, H. T., Umetsu, D. T., DeKruyff, R. H. & Levy, S. (1998).** Cytotoxic T cell responses to DNA vaccination: dependence on antigen presentation via Class II MHC. *J Immunol* **161**, 6532-6536.
- McMichael, A., Gotch, F., Noble, G. & Beare, P. (1983).** Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *N Engl J Med* **309**, 13-17.
- Miller, J. D., van der Most, R. G., Akondy, R. S., Glidewell, J. T., Albott, S., Masopust, D., Murali-Krishna, K., Mahar, P. L., Edupuganti, S. & other authors (2008).** Human effector and memory CD8⁺ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity* **28**, 710-722.
- Moss, R. B. (2009).** Prospects for control of emerging infectious diseases with plasmid DNA vaccines. In *J Immune Based Ther Vaccines*. URL: <http://www.jibtherapies.com/content/7/1/3>, accessed December 14th 2010.
- Mueller, S. N., Langley, W. A., Carnero, E., Garcia-Sastre, A. & Ahmed, R. (2010).** Immunization with live attenuated influenza viruses that express altered NS1 proteins results in potent and protective memory CD8⁺ T-cell responses. *J Virol* **84**, 1847-1855.
- Nakanishi, Y., Lu, B., Gerard, C. & Iwasaki, A. (2009).** CD8⁺ T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4⁺ T-cell help. *Nature* **462**, 510-513.
- Nuchtern, J. G., Biddison, W. E. & Klausner, R. D. (1990).** Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature* **343**, 74-76.
- Pelletier, S., Tanguay, S., Lee, S., Gunaratnam, L., Arbour, N. & Lapointe, R. (2009).** TGF- α as a candidate tumor antigen for renal cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* **58**, 1207-1218.
- Price, G. E., Soboleski, M. R., Lo, C.-Y., Mispion, J. A., Pappas, C., Houser, K. V., Tumpey, T. M. & Epstein, S. L. (2009).** Vaccination focusing immunity on conserved antigens protects mice and ferrets against virulent H1N1 and H5N1 influenza A viruses. *Vaccine* **27**, 6512-6521.
- Rush, C., Mitchell, T. & Garside, P. (2002).** Relevant antigen to appropriate sufficient levels of immunologically on appropriate targeting of T cells by DNA vaccination depends efficient priming of CD4⁺ and CD8⁺ processing pathways. *J Immunol* **169**, 4951-4960.
- Schmid, D., Pypaert, M. & Münz, C. (2007).** Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* **26**, 79-92.
- Schultze, J. L., Michalak, S., Seamon, M. J., Dranoff, G., Jung, K., Daley, J., Delgado, J. C., Gribben, J. G. & Nadler, L. M. (1997).** CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest* **100**, 2757-2765.
- Schweiger, B., Zadow, I. & Heckler, R. (2002).** Antigenic drift and variability of influenza viruses. *Med Microbiol Immunol* **191**, 133-138.

- Seder, R. A., Darrah, P. A. & Roederer, M. (2008). T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* **8**, 247-258.
- Skountzou, I., Koutsonanos, D. G., Kim, J. H., Powers, R., Satyabhama, L., Maseoud, F., Weldon, W. C., Martin, M. d. P., Mittler, R. S. & other authors (2010). Immunity to pre-1950 H1N1 influenza viruses confers cross-protection against the pandemic swine-origin 2009 A (H1N1) influenza virus. *J Immunol* **185**, 1642-1649.
- Swain, S. L., Agrewala, J. N., Brown, D. M., Jelley-Gibbs, D. M., Golech, S., Huston, G., Jones, S. C., Kamperschroer, C., Lee, W.-H. & other authors (2006). CD4⁺ T-cell memory: generation and multi-faceted roles for CD4⁺ T cells in protective immunity to influenza. *Immunol Rev* **211**, 8-22.
- Taylor, P. M. & Askonas, B. A. (1986). Influenza nucleoprotein-specific cytotoxic T-cell clones are protective in vivo. *Immunology* **58**, 417-420.
- Thomas, P. G., Keating, R., Hulse-Post, D. J. & Doherty, P. C. (2006). Cell-mediated protection in influenza infection. *Emerg Infect Dis* **12**, 48-54.
- Touvrey, C., Derré, L., Devevre, E., Corthesy, P., Romero, P., Rufer, N. & Speiser, D. E. (2009). Dominant human CD8 T cell clonotypes persist simultaneously as memory and effector cells in memory phase. *J Immunol* **182**, 6718-6726.
- Turcotte, S., Forget, M.-A., Beauseigle, D., Nassif, E. & Lapointe, R. (2007). Prostate-derived Ets transcription factor overexpression is associated with nodal metastasis and hormone receptor positivity in invasive breast cancer. *Neoplasia* **9**, 788-796.
- Van den Bosch, G. a., Van Gulck, E., Ponsaerts, P., Nijs, G., Lenjou, M., Apers, L., Kint, I., Heyndrickx, L., Vanham, G. & other authors (2006). Simultaneous activation of viral antigen-specific memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cells using mRNA-electroporated CD40-activated autologous B-cells. *J Immunother* **29**, 512-523.
- Voo, K. S., Fu, T., Heslop, H. E., Brenner, M. K., Rooney, C. M. & Wang, R.-F. (2002). Identification of HLA-DP3-restricted peptides from EBNA1 recognized by CD4⁺ T cells. *Cancer Res* **62**, 7195-7199.
- WHO (2009). Pandemic (H1N1) 2009. URL: <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/index.html>, accessed March 10th 2010.
- Zhirnov, O. P., Isaeva, E. I., Konakova, T. E., Thoidis, G., Piskareva, L. M., Akopova, I. I., Kartashov, A., Altstein, A. D., Ilyinskii, P. O. & other authors (2007). Protection against mouse and avian influenza A strains via vaccination with a combination of conserved proteins NP, M1 and NS1. *Influenza Other Respi Viruses* **1**, 71-79.
- Zhou, Z., Jiang, X., Liu, D., Fan, Z., Hu, X., Yan, J., Wang, M. & Gao, G. F. (2009). Autophagy is involved in influenza A virus replication. *Autophagy* **5**, 321-328.

Figures

Figure 1m. MHC-I and -II presentation of endogenously-expressed influenza M1 and NP.

Scheme of (a) WT M1 or NP and (b) M1 or NP cloned with gp100 MHC-II mobilization sequences in pcDNA3.1 plasmid. (c, d) CD40-B cells (APCs) were electroporated with plasmids encoding wild type proteins (black bars), proteins cloned in fusion with the gp100 MHC-II mobilization sequences (grey bars) or an irrelevant mock (DKK1) protein (white bars), and presented to CD8⁺ (c) or CD4⁺ (d) T cell clones specific to each antigen. IFN- γ secretion was assessed by ELISA. The data are representative of 2 independent experiments. (e) Expression of the M1 and gp-M1 plasmids was evaluated by Western blot of transfected HEK-293T cells. The data are representative of 3 independent experiments. (f) Intracellular staining and flow cytometry analysis of NP and gp-NP expression from transfected HEK-293T. The data are representative of 2 independent experiments.

Figure 2m. Characterization of human T lymphocytes expanded by *in vitro* sensitization with endogenously-expressed M1 and NP.

NP- and M1-specific T lymphocytes were expanded from PBMCs with autologous APCs expressing WT proteins or optimized versions of MHC-II presentation as described in section Materials and Methods. The specificity of expanded T cell lines was assessed by co-culture with APCs expressing M1, gp-M1 (a), NP or gp-NP (b), and IFN- γ secretion was assessed by ELISA. Where indicated, MHC restriction was identified by the addition of MHC-I (black arrow) or -II (white arrow) blocking antibodies from ND #1, #2 and #3 T cell lines grown as described in section Materials and Methods. (c, d) The specificity of blocking antibodies was assessed with M1-specific CD8⁺ and NP-specific CD4⁺ T cell clones. Panel (c) is the MHC blocking antibody control for ND#1 and #2, panel (d) is the MHC blocking antibodies control for ND#3. Bars represent the mean \pm S.D. of duplicate cultures.

Figure 3m. Effector cytokine secretion by CD8⁺ T lymphocytes specific to M1 or NP, with or without enhancement of MHC-II presentation.

T cell lines were stained intracellularly for TNF, IFN- γ and IL-2 after 6 h of stimulation by CD40-B cells electroporated with relevant (cognate) or mock antigens. However, no IL-2 was detected in any of the CD8⁺ T cell lines and was excluded from the analysis. (a, b) The percentage of CD3⁺/CD8⁺ T lymphocytes producing both TNF and IFN- γ was analyzed in cell lines from 3 healthy donors cultured with CD40-B electroporated with M1 and NP, with or without gp100 MHC-II mobilization sequences. The background of mock-stimulated CD8⁺ T cell lines was subtracted from the antigen-specific signal (Supplementary Figure 3b). Cytokine secretion from ND#1 (a) and #2 (b) was assessed with the same target as used for expansion, while cytokine secretion for ND#3 (c) was assessed with targets deprived of gp100 mobilization sequences.

Figure 4m. Effector cytokine secretion by CD4⁺ T lymphocytes specific to M1 or NP, with or without enhancement of MHC-II presentation.

T cell lines from 3 healthy donors were cultured, stimulated and stained as in Figure 3. Percentage of CD3⁺/CD4⁺ T cells producing TNF, IFN- γ or IL-2 were analyzed after co-culture with APCs expressing M1 and NP, with or without gp100 MHC-II mobilization sequences. The background of mock-stimulated CD4⁺ T cell lines was subtracted from the antigen-specific signal (Supplementary Figure 3b). Cytokine production from ND #1 (a) and #2 (b) T cell lines was assessed with the same target as used for expansion, while cytokine secretion for ND#3 (c) was assessed with targets deprived of gp100 mobilization sequences.

Figure 5. Surface effector phenotype of T lymphocytes specific to M1 or NP, with or without enhancement of MHC-II presentation.

T cell lines from healthy donors were cultured, stimulated and stained as described in section Materials and Methods. (a) The percentage of CD45RA⁻/CD62L⁻ effector CD8⁺ T cells from 3 healthy donors was analyzed after co-culture with APCs expressing M1 or NP, with or without gp100 MHC-II mobilization sequences. Cytokine secretion and surface marker expression from ND #1 and #2 were assessed with the same target as used for expansion, while cytokine secretion for ND#3 was assessed with targets deprived of gp100 mobilization sequences for ND#3. (b) The same analysis performed in (a) was used for CD45RA⁻/CD62L⁻ effector CD4⁺ T cells of M1- or NP-specific T cell lines from ND#1 and #2.

Figure 1m

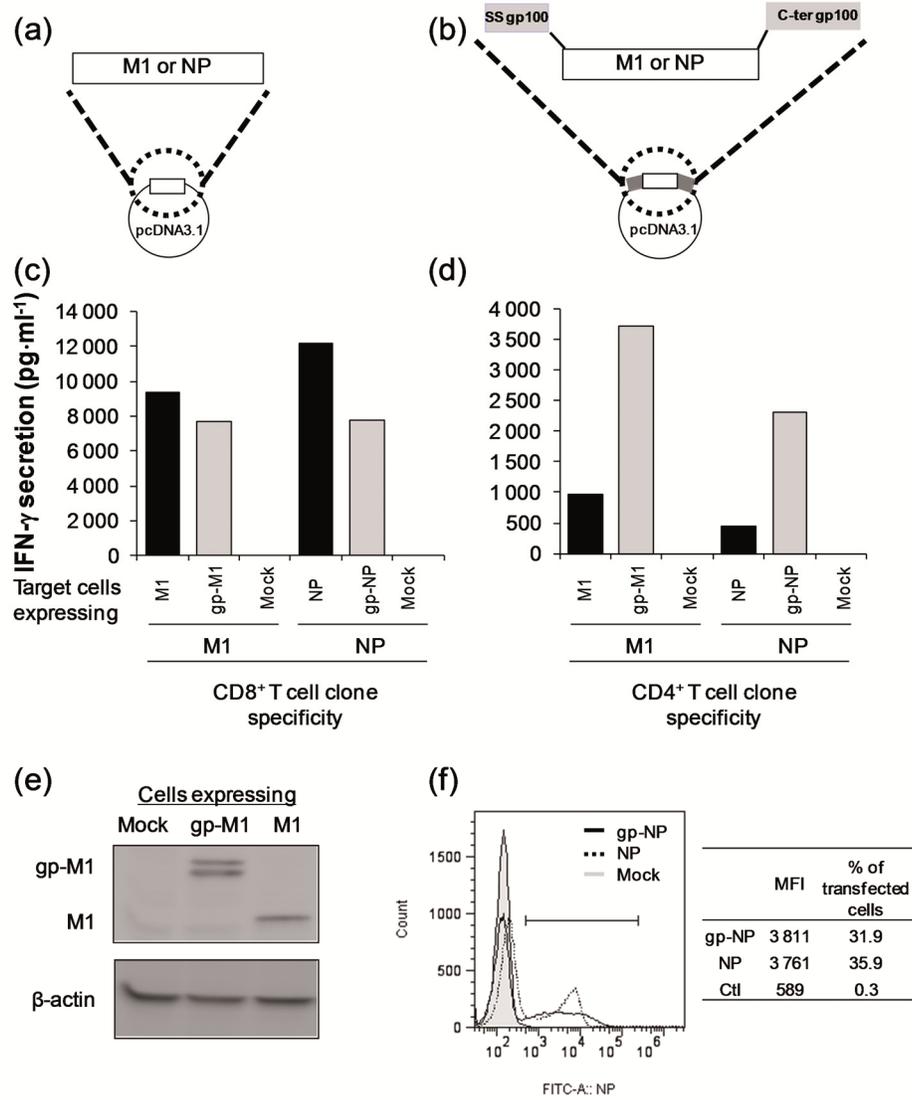
Doucet *et al.*

Figure 2m

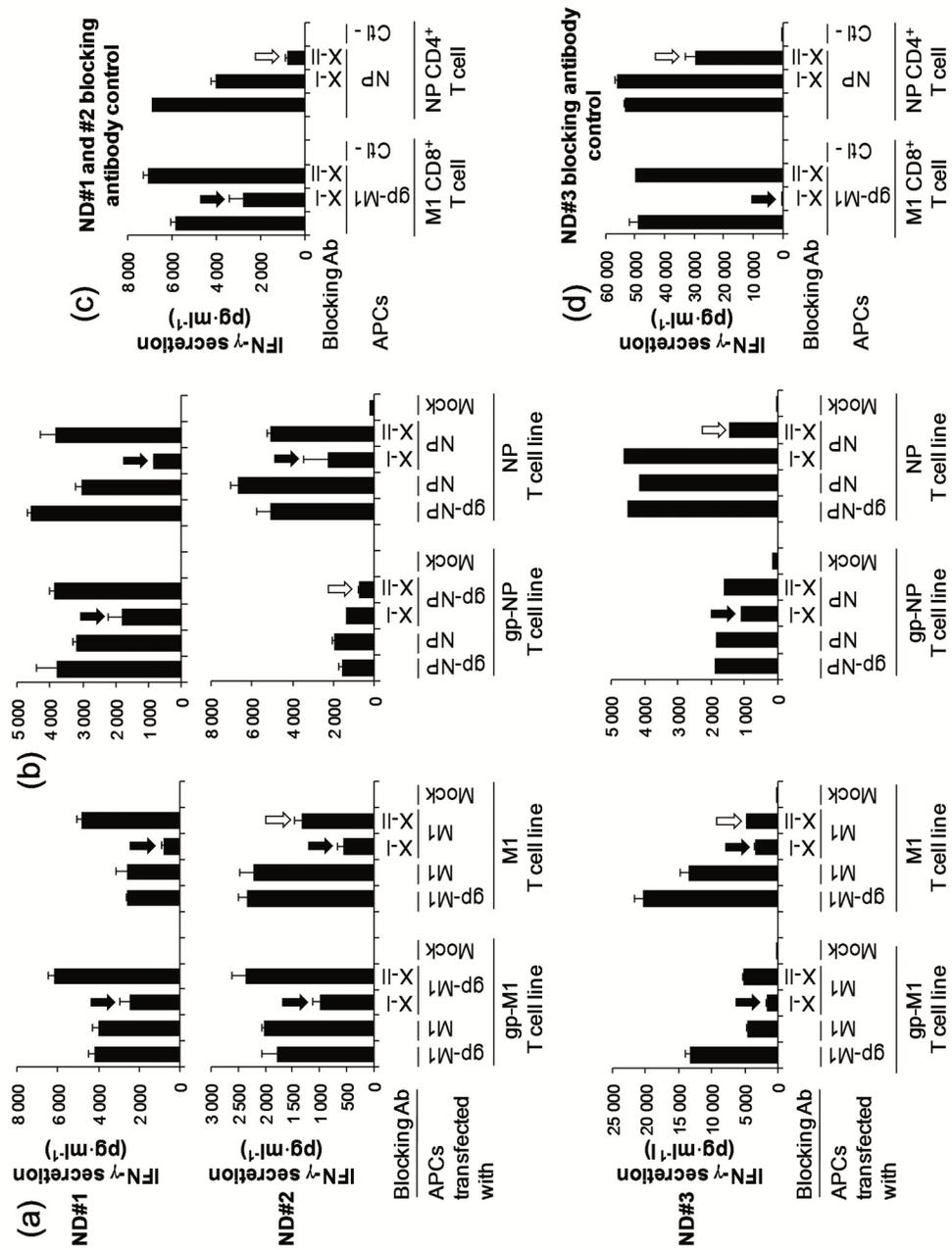
Doucet *et al.*

Figure 3m

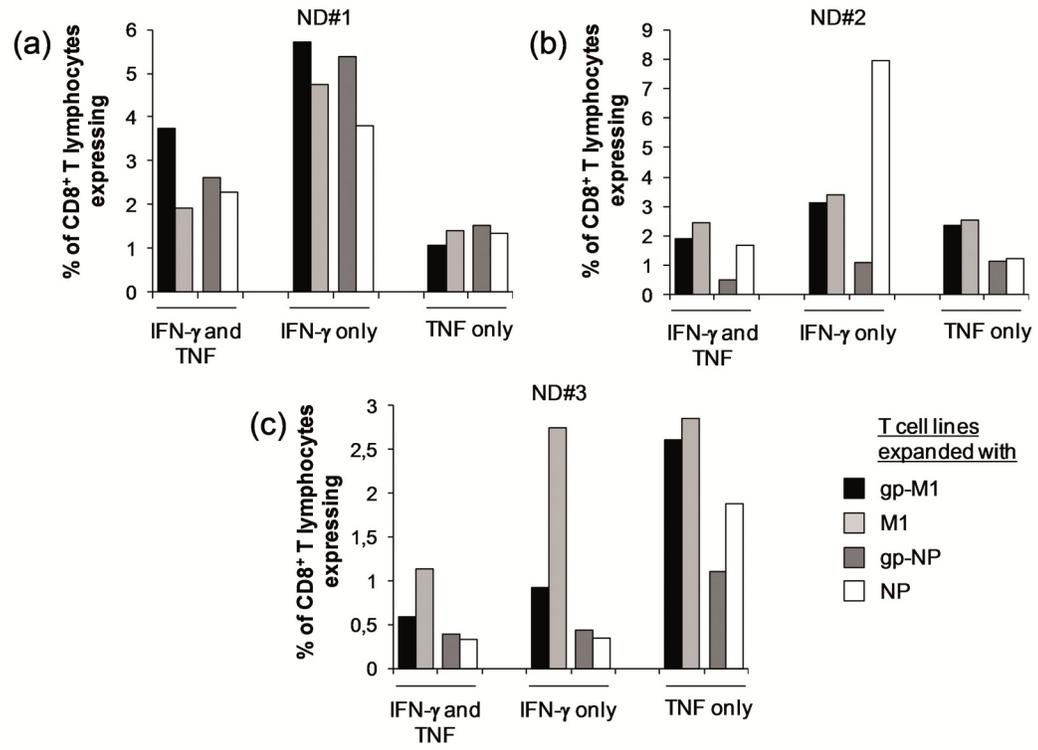
Doucet *et al.*

Figure 4m

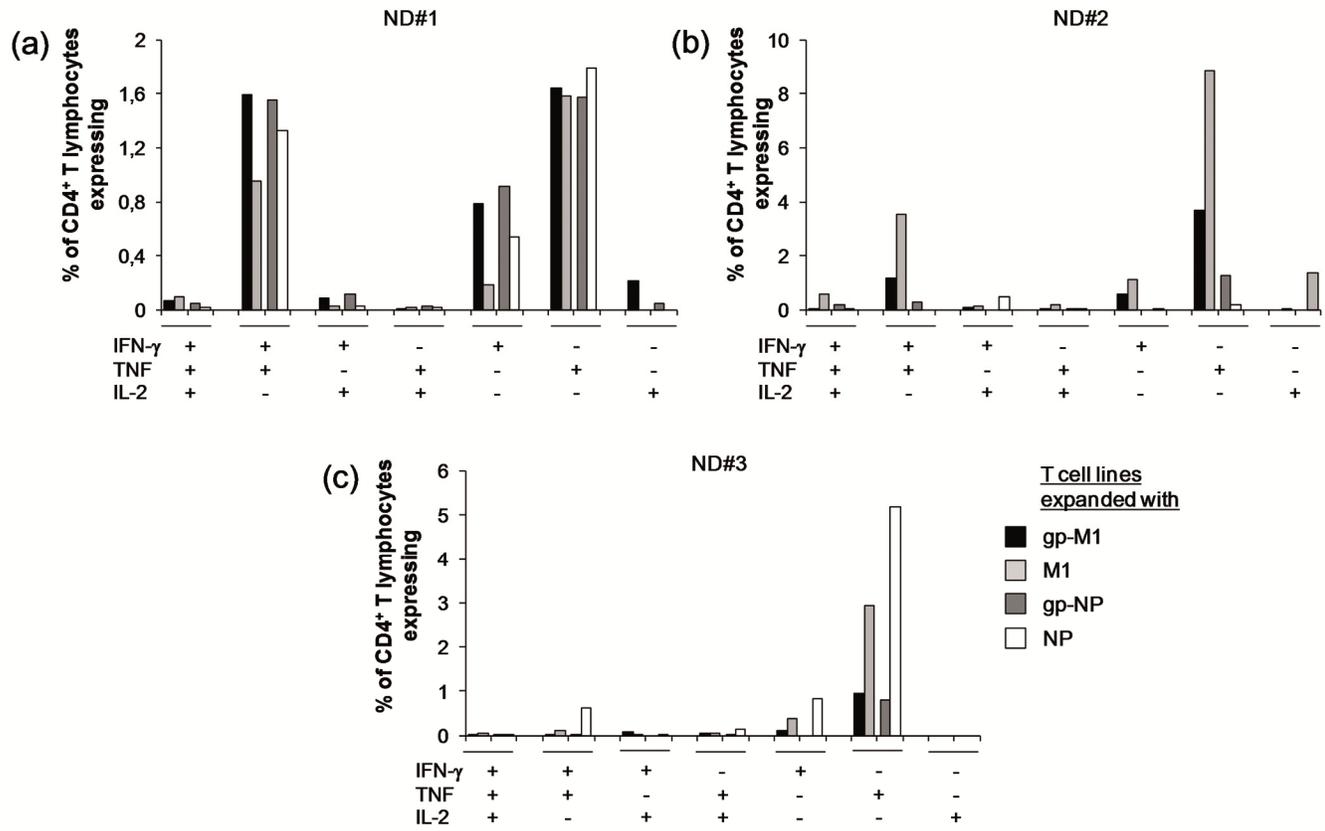
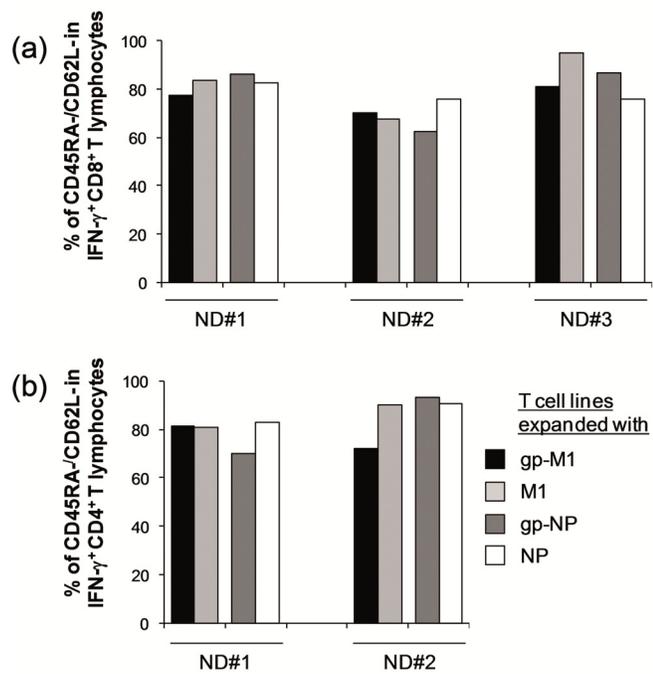
Doucet *et al.*

Figure 5mDoucet *et al.*

Endogenously-expressed influenza A M1 and NP proteins are efficiently presented by class-I and-II major histocompatibility complexes

Doucet et al.

Supplementary methods

APC peptide pulse for recognition assays

Peptides (Macromolecular Resources, Ft. Collins, CO) were reconstituted at a concentration of 10 mM in DMSO. CD40-B cells were plated at $0.5-1 \times 10^6$ cells·ml⁻¹ in Iscove's complete medium. Peptides were added to CD40-B cells at a final concentration of 1 µg·ml⁻¹. Cells were pulsed for 3 h at 37°C under 5 % CO₂, and washed once to remove unloaded peptides

B16 cell line

B16 murine melanoma cell line (C57BL/6 background) was cultured in R-10. B16 cells were cryopreserved in 90 % FBS (Wisent)/10 % DMSO (Sigma), and stored in liquid nitrogen.

Mouse immunization and splenocyte recognition assays

B16 cells were activated for 24 h with 500 U·ml⁻¹ of murine IFN-γ (Peprotech) to increase MHC-I and -II expression (Böhm et al., 1998; Taniguchi et al., 1987) and data not shown). Activated B16 cells were washed to remove IFN-γ, electroporated as CD40-B cells and resuspended at 10^6 cells·ml⁻¹ of RPMI medium containing only 10 % of FBS and 2 mM L-glutamine (all from Wisent).

C57BL/6 mice were either immunized intramuscularly with 50 µg of NP, gp-NP or empty coding pcDNA3.1 plasmid, or infected intranasally with 10^3 TCID₅₀ of influenza strain A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). After 10 days, splenocytes were harvested and co-cultured with activated B16 cells expressing NP, gp-NP or mock protein in a 4:1 ratio for 1 h and for an additional 6 h in the presence of brefeldin A (5 µg·ml⁻¹; Sigma). The cells were surface stained with Alexa-700, PE-cy7, APC-H7, FITC, PE-cy5 and PE-conjugated antibodies specific for mouse CD3, CD4, CD8,

CD62L, CD44 and CD127 or corresponding isotype controls (all from BD Biosciences). Intracellular staining was performed by incubating cells with an APC-conjugated antibody against IFN- γ (BD Biosciences), or corresponding isotype controls. Staining and data acquisition and analysis were done as in human recognition assays.

CD107a mobilization assay

M1-CD8 and NP-CD8 specific T cells were stimulated for 5 h with T2 cells loaded with relevant or mock peptide in the presence of Monensin (1 mM; Sigma) and brefeldin A (5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). CD107a staining was performed during T-cell stimulation with an APC-conjugated anti-CD107a antibody (BD Biosciences). Other stainings were performed as in section Materials and Methods with Alexa700-, PerCP/Cy5-, PB- and PE conjugated antibodies specific to human CD3, CD4, CD8 and IFN- γ respectively (all from BD Biosciences).

Supplementary results

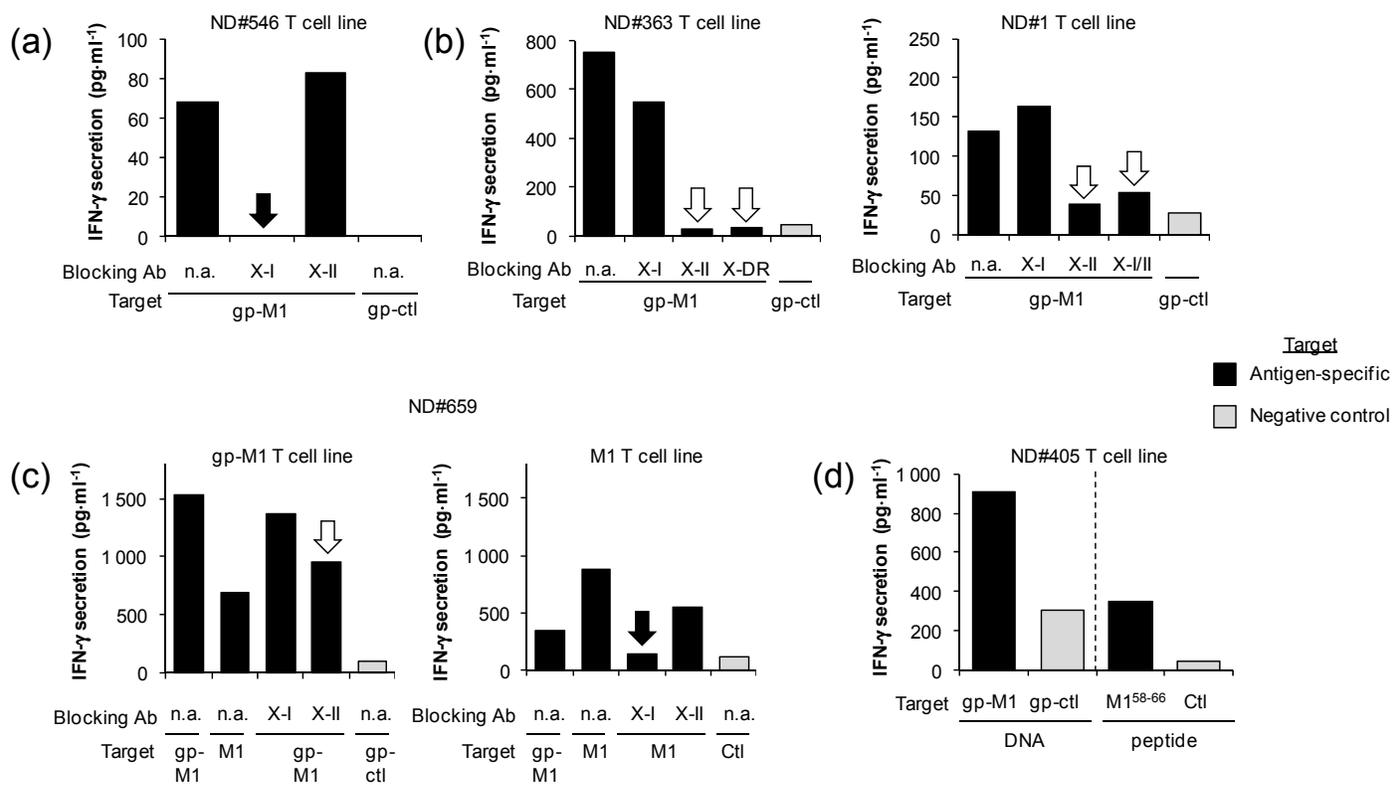
NP-specific CD8⁺ T cell phenotype induced by DNA vaccination

We explored the phenotype of NP-specific T cells expanded *in vivo* by DNA vaccine. C57BL/6 mice were vaccinated with NP or gp-NP-coding plasmids, and the NP-specific T cell phenotype was evaluated after *ex vivo* antigen-specific stimulation. Only CD44⁺CD62L⁻ NP-specific CD8⁺ effector T cells were induced after DNA vaccination, as in mice that cleared influenza infection (Supplementary Figures 5). This phenotype is consistent with the CD45RA⁻/CD62L⁻ effector phenotype of human NP- and M1-specific CD8⁺ T cells generated by *in vitro* T cell sensitization. However, we did not detect any NP-specific CD4⁺ T cells in this model.

Supplementary figures and tables

Supplementary Figure 1m	Characterization of T lymphocytes expanded by <i>in vitro</i> sensitization with gp-M1 expressed by APCs
Supplementary Figure 2m	Gating for the human ICS analysis
Supplementary Figure 3m	Characterization of other effector arms employed by human T lymphocytes expanded by <i>in vitro</i> sensitization with endogenously-expressed M1 and NP
Supplementary Figure 4m	Surface effector phenotype of T lymphocytes specific to M1 or NP, with or without enhancement of MHC-II presentation
Supplementary Figure 5m	IFN- γ secretion by NP-specific murine effector memory CD8 ⁺ T lymphocytes
Supplementary Table 1m	Amino acid conservancy in proteins from different well-known influenza A strains and clades

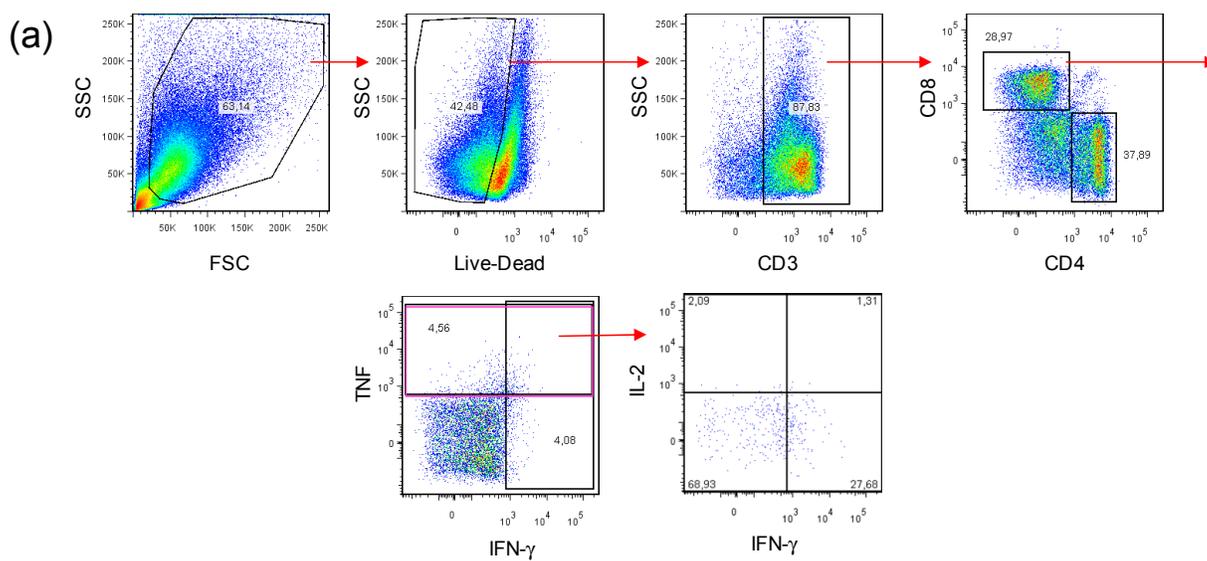
Supplementary Figure 1m

Doucet *et al.*

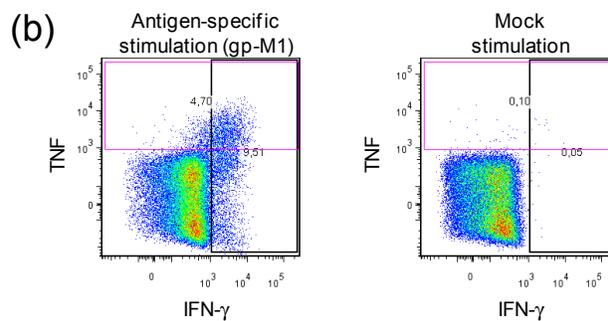
Supplementary Figure 1m. Characterization of T lymphocytes expanded by *in vitro* sensitization with gp-M1 expressed by APCs.

All T cell lines were grown and tested as in Figure 2. (a-c) Specificity of expanded T cell lines was assessed by co-culture with APCs expressing M1, gp-M1 or an irrelevant mock protein, and IFN- γ secretion was assessed by ELISA. Where indicated, MHC restriction was identified by the addition of MHC-I (black arrow) or -II (white arrow) blocking antibodies from ND#546, #363 and #659 T cell lines grown as described in Materials and Methods. (a) A M1-specific T cell line expanded with autologous APCs expressing gp-M1 was composed of CD8⁺ T lymphocytes. (b) Two M1-specific T cell lines expanded with autologous APCs expressing gp-M1 were composed of CD4⁺ T lymphocytes. (c) Two M1-specific T cell lines expanded from PBMCs of the same ND with autologous APCs expressing gp-M1 (left) or M1 (right). (d) A M1-specific cell line expanded from ND#405 PBMCs with autologous APCs expressing MHC-II-enhanced or WT proteins also recognizes the defined M1⁵⁸⁻⁶⁶ MHC-I epitope.

Supplementary Figure 2m

Doucet *et al.*

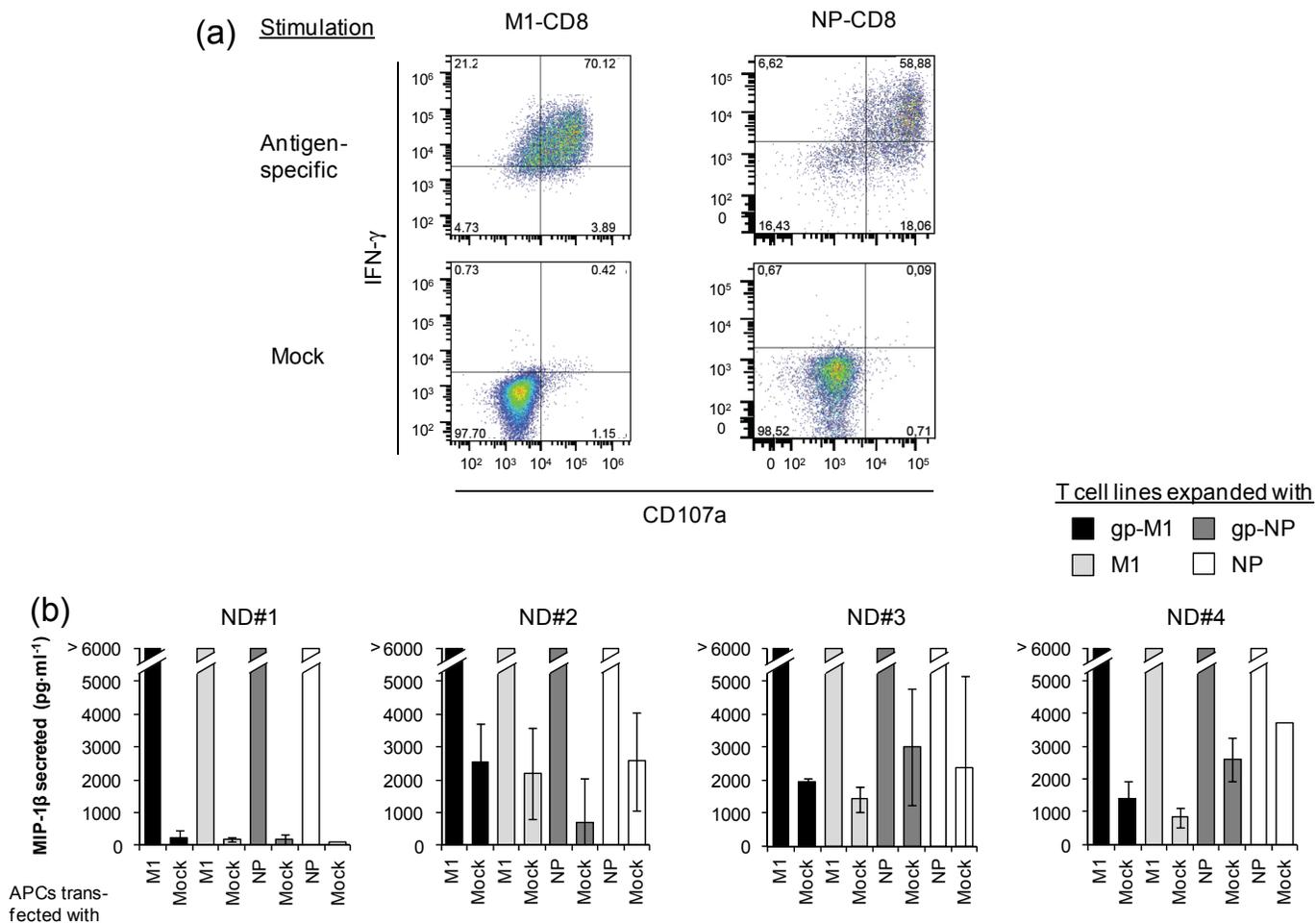
ND#1, gp-M1 T cell line



Supplementary Figure 2m. Gating for human ICS analysis.

(a) Gating algorithm defined by FlowJo software for the ND#3 T cell line expanded with gp-M1 expressed in CD40-B cells and tested as described in Figure 3. The data are representative of 3 ND. Cell debris were excluded via the SSC/FSC gate, and living cells (excluding the live-dead marker) and CD3⁺ T cells were subsequently subgated. Either CD8⁺ or CD4⁺ T cells were selected in this population. In each of these subpopulations (represented here are CD8⁺ T cells), a Boolean gating strategy was applied to analyze the combinatorial expression of TNF, IFN- γ and IL-2. (b) Example of IFN- γ and TNF secretion by a gp-M1-expanded T cell line from ND#1 with antigen-specific recognition (left) compared to irrelevant mock protein recognition (right). The latter background stimulation was subtracted from all antigen-specific signals throughout the analysis.

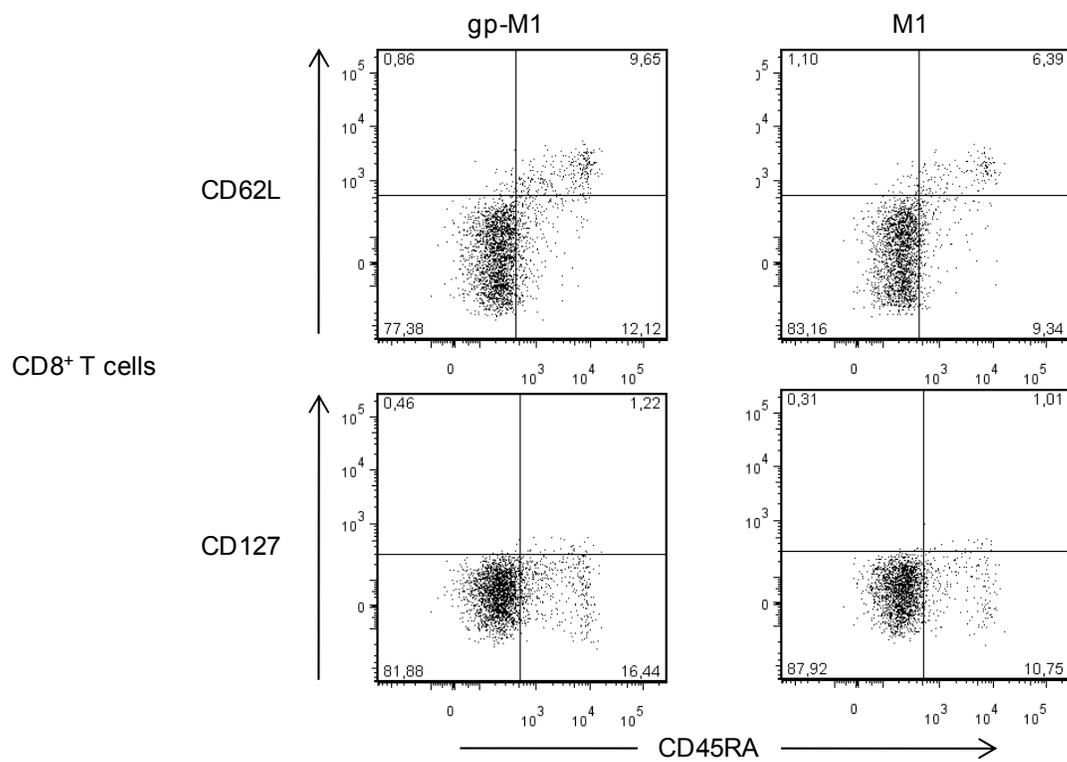
Supplementary Figure 3m

Doucet *et al.*

Supplementary Figure 3m. Other effector arms employed by human T lymphocytes expanded by *in vitro* sensitization with endogenously-expressed M1 and NP.

M1- and NP- specific T lymphocytes were expanded from PBMCs with autologous APCs expressing MHC-II-enhanced or WT proteins, as described in section Materials and Methods. (a) Expression of IFN- γ and degranulation marker CD107a by M1-CD8 and NP-CD8 T cell clone after antigen-specific or mock stimulation. T cell clones were isolated from T cell lines expanded by *in vitro* sensitization with APCs expressing gp-M1 or NP respectively. (b) MIP-1 β secretion of expanded T cell lines (same T cell lines supernatant as in Figure 2) was assessed by co-culture with APCs expressing M1, gp-M1, NP or gp-NP and ELISA (range <96 to >6,000 pg ml⁻¹, error bars, S.D.).

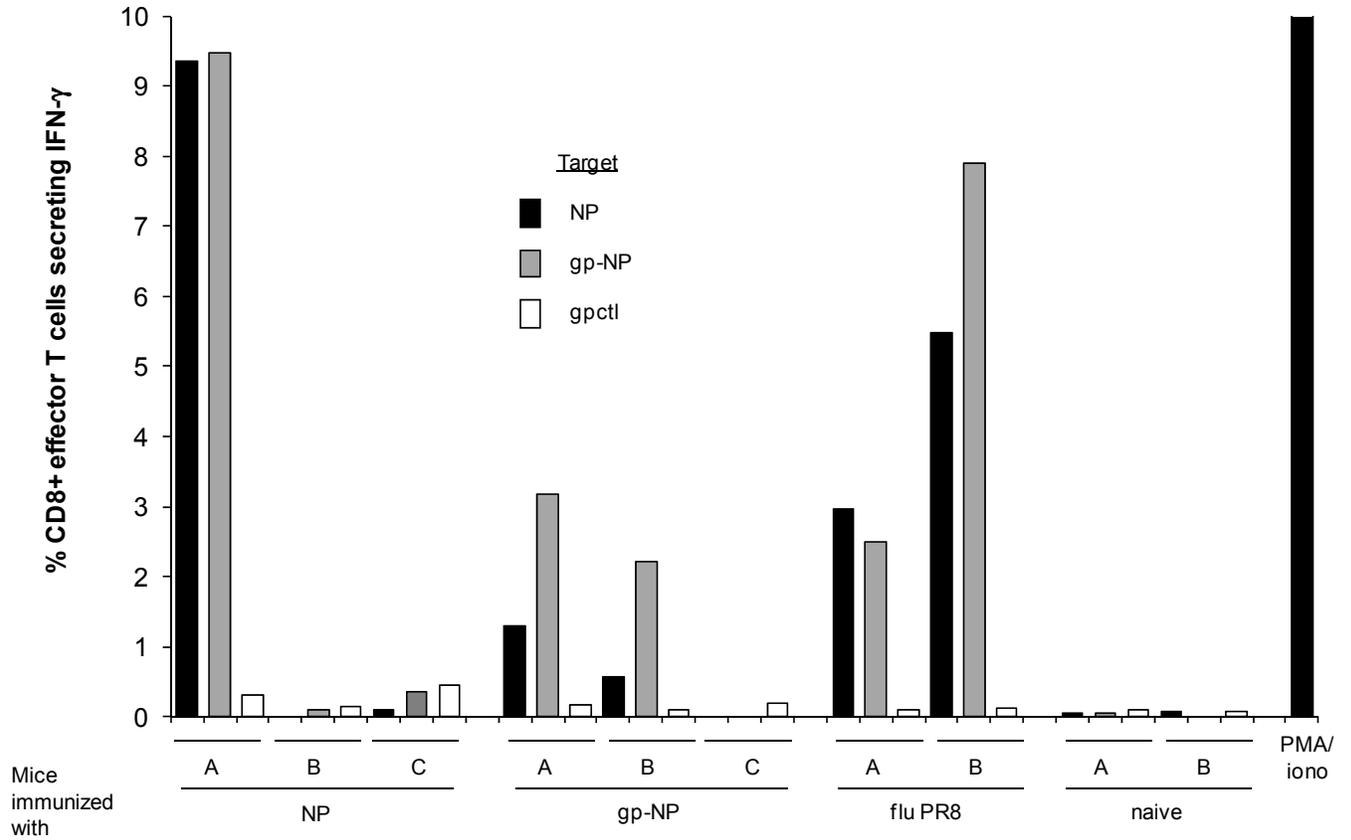
Supplementary Figure 4m

Doucet *et al.*

Supplementary Figure 4m. Surface effector phenotype of T lymphocytes specific to M1 or NP, with or without enhancement of MHC-II presentation.

T cell lines from 3 healthy donors were cultured, stimulated and stained as in Figure 5. Here is shown a dot plot of ND#1 CD3⁺/IFN- γ ⁺ CD8⁺ M1- or gp-M1-grown T cell expression of surface markers (CD45RA, CD127 or CD62L). The data are representative of 3 ND and of NP- and gp-NP-grown T cells. Similar data were obtained for CD4⁺ T cells of 2 ND. ND#3 CD4⁺ T cells could not be analyzed due to a low number of IFN- γ ⁺ T cells.

Supplementary Figure 5m

Doucet *et al.*

Supplementary Figure 5m. IFN- γ secretion by NP-specific murine effector CD8⁺ T lymphocytes.

Mice (a, b and c) were injected either intramuscularly with NP or gp-NP plasmids twice, with a sublethal dose of influenza strain PR8 or with carrier solution. After 10 days, splenocytes from these mice were stimulated with activated B16 cells expressing NP, gp-NP or gp-mock protein. IFN- γ secretion by effector (CD3⁺/CD44⁺/CD62L⁻) CD8⁺ T cells was evaluated by ICS. (a), (b) and (c) represent 3 different mice for every conditions.

Supplementary Table 1m. Amino acid conservancy in proteins from different well-known influenza A strains and clades.

(a) M1, (b) NP and (c) HA amino acid homology between different strains of influenza A. The sequences were retrieved from the NIH genetic sequence database Genbank and compared by Sim software on the Expasy proteomics server.

(a)

Genbank #	Influenza A strains	Strain commentary												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
NP_040982.1	1 A/Puerto rico/8/34 (H1N1)	100	n.a.	94.2	91.4	91.6	93.3	93.2	93.7	93.2	93.2	93.2	94.2	
	2 A/WSN/33 (H1N1)	100												
ABD96354.1	3 A/USSR/90/77 (H1N1)		100		93.0	90.6	91.9	91.8	92.3	92.2			93.0	Seasonal vaccine 2009-2010
	4 A/Brisbane/59/2007 (H1N1)			100										Seasonal vaccine 2009-2010
ACO95274.1	5 A/Brisbane/10/2007 (H3N2)				100	89.8	90.9	90.8	90.9	90.6			91.6	Seasonal vaccine 2009-2010
	6 B/Brisbane/60/2008													Seasonal vaccine 2009-2010
ACP44151.1	7 A/California/04/2009 (H1N1)					100	93.9	94.0	93.9	93.6			94.2	Pandemic A/H1N1
AAT70630.1	8 A/Viet nam/1203/2004 (H5N1) Clade 1						100	99.6	99.4	99.4			98.4	Stockpiled H5N1 vaccine (heather, vaccine, 2009)
AB136003.1	9 A/Indonesia/5/2005 (H5N1) Clade 2.1							100	99.0	99.2			98.2	Vaccine strain available
AAZ16300.1	10 A/bar-headed goose/Qinghai/12/2005 (H5N1) Clade 2.2								100	98.8			97.8	
ABL08394.1	11 A/J. W. E./Hong Kong/1038/2006 (H5N1) Clade 2.3									100			98.2	
	12 A/Anhui/1/2005 (H5N1) Clade 2.3.4										100			
AY646081.1	13 A/chicken/British Columbia/GSC_human_B/04(H7N3)													n.a. Vaccine strain available 100 Human infections in BC, Canada in 2004

(b)

Genbank #	Influenza A strains	Strain commentary												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ABC21712.1	1 A/Puerto rico/8/34 (H1N1)	100	98.0	97.2	96.4	96.0	94.8	93.7	94.4	93.7	94.0		96.8	
CAA30882.1	2 A/WSN/33 (H1N1)	100	96.8	96.0	97.2	93.7	94.0	93.3	93.3	93.7			97.2	
ABD96351.1	3 A/USSR/90/77 (H1N1)		100	98.8	96.4	94.4	93.3	93.3	93.3	93.7			97.2	
ACD37490.1	4 A/Brisbane/59/2007 (H1N1)			100	96.4	93.3	92.5	92.5	92.5	92.9			96.4	Seasonal vaccine 2009-2010
ACO95271.1	5 A/Brisbane/10/2007 (H3N2)				100	92.5	93.7	92.9	92.9	93.3			96.0	Seasonal vaccine 2009-2010
	6 B/Brisbane/60/2008													Seasonal vaccine 2009-2010
ACP44152.1	7 A/California/04/2009 (H1N1)						100	95.6	96.4	95.6	96.0		96.4	Pandemic A/H1N1
ABP35633.1	8 A/Viet nam/1203/2004 (H5N1) Clade 1							100	99.2	99.2	99.6		96.0	Stockpiled H5N1 vaccine (heather, vaccine, 2009)
AB136004.1	9 A/Indonesia/5/2005 (H5N1) Clade 2.1								100	99.2	99.6		96.0	Vaccine strain available
AAZ16330.1	10 A/bar-headed goose/Qinghai/12/2005 (H5N1) Clade 2.2									100	99.6		96.0	
ABL07941.1	11 A/J. W. E./Hong Kong/1038/2006 (H5N1) Clade 2.3										100		96.4	
	12 A/Anhui/1/2005 (H5N1) Clade 2.3.4													Vaccine strain available
AAT78583.1	13 A/chicken/British Columbia/GSC_human_B/04(H7N3)													100 Human infections in BC, Canada in 2004

(c)

Genbank #	Influenza A strains	Strain commentary												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ABD77675.1	1 A/Puerto rico/8/34 (H1N1)	100	90.4	90.5	86.5	41.0	37.1	81.3	64.5	63.2	63.4	63.1	63.5	41.0
ACF54598.1	2 A/WSN/33 (H1N1)	100	88.5	85.1	41.5	28.2	80.9	63.8	61.8	62.2	61.9	62.3	42.1	
ABF21277.1	3 A/USSR/90/77 (H1N1)		100	90.8	40.1	27.2	80.2	62.1	61.7	61.8	61.5	61.8	41.3	
ACA28844.1	4 A/Brisbane/59/2007 (H1N1)			100	41.9	27.4	79.3	62.6	62.0	61.7	61.7	62.1	40.7	Seasonal vaccine 2009-2010
ABW23353.1	5 A/Brisbane/10/2007 (H3N2)				100	31.0	43.2	40.7	40.7	40.7	40.6	49.0	Seasonal vaccine 2009-2010	
ACN29380.1	6 B/Brisbane/60/2008													Seasonal vaccine 2009-2010
ACS45035.1	7 A/California/04/2009 (H1N1)													Pandemic A/H1N1
ABP51977.1	8 A/Viet nam/1203/2004 (H5N1) Clade 1													Stockpiled H5N1 vaccine (heather, vaccine, 2009)
ABW06108.1	9 A/Indonesia/5/2005 (H5N1) Clade 2.1													Vaccine strain available
ABE68927.1	10 A/bar-headed goose/Qinghai/12/2005 (H5N1) Clade 2.2													
ABJ96775.1	11 A/J. W. E./Hong Kong/1038/2006 (H5N1) Clade 2.3													
ABD28180.1	12 A/Anhui/1/2005 (H5N1) Clade 2.3.4													
AAT78582.1	13 A/chicken/British Columbia/GSC_human_B/04(H7N3)													100 Human infections in BC, Canada in 2004

Supplementary References

- Böhm, W., Thoma, S., Leithäuser, F., Möller, P., Schirmbeck, R., Reimann, J., 1998. T cell-mediated, IFN- γ -facilitated rejection of murine B16 melanomas. *J. Immunol.* 161, 897-908.
- Taniguchi, K., Petersson, M., Hoglund, P., Kiessling, R., Klein, G., Karre, K., 1987. Interferon γ induces lung colonization by intravenously inoculated B16 melanoma cells in parallel with enhanced expression of class I major histocompatibility complex antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 3405-3409.

Chapitre 3. Discussion

3.1 Sommaire des résultats

L'influenza est un problème de santé publique mondiale responsable de milliers de morts annuellement en raison des épidémies saisonnières et des pandémies épisodiques. Une réponse immunitaire cellulaire robuste contre les antigènes conservés M1 et NP du virus de l'influenza pourrait permettre une protection pan-spécifique. Les vaccins à sous-unités inactivés actuellement utilisés en prévention de l'influenza induisent, au mieux, une très faible réponse immunitaire à médiation cellulaire. Par contre, les VVAs (180) aussi disponibles, de même que les vaccins à ADN actuellement en développement (90, 181), pourraient permettre une stratégie de vaccination plus complète stimulant à la fois une réponse humorale (à anticorps) et une réponse cellulaire. Ces vaccins impliquent principalement une expression endogène des antigènes dans des CPAs afin de stimuler, entre autres, l'expansion de lymphocytes T. Ainsi, nous avons caractérisé la présentation par CMH-I et -II des protéines conservées M1 et NP du virus de l'influenza exprimées de façon endogène dans des CPAs dans un modèle de sensibilisation *in vitro* de lymphocytes T (manuscrits Chapitre 2 et Annexe 5).

Nous avons d'abord observé une présentation antigénique basale par CMH-I et -II des protéines M1 et NP endogènes qui a permis de favoriser l'expansion de lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ (objectifs 2 et 3; Ch. 2, Figures 1 et 2). Ces lymphocytes T présentent un phénotype effecteur (CD45RA-/CD62L-) T « helper » de type 1 (Th1), exprimant, entre autres, de l'IFN- γ et du TNF (objectif 4; Ch. 2, Figures 3 et 4).

Nous avons également utilisé des séquences de mobilisation vers les endosomes de la protéine gp100 afin d'optimiser la présentation par CMH-II des protéines M1 et NP (objectif 5; Ch. 2, Figure 1). Ces séquences ont permis d'augmenter le niveau de présentation des antigènes M1 et NP par CMH-II sans altérer leur expression (objectif 1; Ch. 2, Figure 1) ni leur présentation par CMH-I, tel qu'observé par la sécrétion d'IFN- γ spécifique de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ respectivement et en accord avec Lepage et Lapointe (148). Cependant, cette augmentation de la présentation par CMH-II n'augmente

pas le nombre de lymphocytes T répondeurs et n'altère pas leur phénotype (sécrétion de cytokines, expression de CD45RA et CD62L) (Ch. 2, Figures 3 et 4).

Afin de compléter cette étude de la réponse immunitaire à médiation cellulaire contre M1 et NP, nous avons également développé une méthode efficace et rapide d'identification d'épitopes pertinents provenant de protéines exprimées et apprêtées de façon endogène (Annexe 5) avec laquelle nous avons confirmé trois épitopes fortement conservés entre différentes souches d'influenza, 2 restreints au CMH-I provenant de M1 ou NP et un autre provenant de M1 restreint au CMH-II (objectif 4).

En résumé, nous avons montré pour la première fois que les protéines M1 et NP endogènes du virus de l'influenza pouvaient être présentée par CMH-I et -II et stimuler efficacement des lymphocytes T effecteurs CD8⁺ et CD4⁺ ciblant des épitopes conservés lorsqu'exprimées dans des CPAs.

3.2 Induction d'une réponse cellulaire efficace contre l'influenza

3.2.1 Choix du modèle expérimental

Afin d'étudier la réponse immunitaire à médiation cellulaire contre M1 et NP, nous avons utilisé un modèle de sensibilisation *in vitro* de lymphocytes T provenant de cellules mononucléaires de sang périphérique (PBMCs) humain à l'aide de CD40-B autologues exprimant un antigène spécifique (voir manuscrit Chapitre 2).

Les CD40-B constituent une excellente alternative aux DCs comme CPAs. Elles peuvent être générées facilement et à faible coût à partir d'une petite quantité de PBMCs, contrairement aux DC, alors que les deux types cellulaires ont des capacités de présentation comparables : expression des molécules de CMH et de co-stimulation, expression de certaines cytokines pro-immunitaires (IL-15, communication personnelle), expansion de lymphocytes, etc. (182-184).

D'autre part, de l'IL-2 a été utilisée comme facteur de croissance des lymphocytes T afin d'avoir une quantité suffisante de cellules pour réaliser les expériences. Or, l'IL-2 favorise l'expansion de lymphocytes T effecteurs et effecteurs mémoires, ce qui peut

expliquer en partie le phénotype effecteur des lymphocytes T spécifiques à M1 et à NP observés dans le chapitre 2. Néanmoins, des lymphocytes T effecteurs mémoires n'exprimant pas les marqueurs mémoires CD27, CD28 et CD127 ont été observés dans le cas de l'influenza (185). Il serait particulièrement intéressant d'étudier le phénotype des lymphocytes T mémoires induits par sensibilisation *in vitro* à l'aide de CPAs exprimant de façon endogène les protéines M1 et NP de l'influenza (voir plus loin).

Or, notre modèle expérimental ne permet pas d'étudier les lymphocytes T mémoires dans sa forme actuelle. Bien qu'il soit plus difficile de suivre le développement *in vitro* des lymphocytes T mémoires chez l'humain qu'*in vivo* dans les modèles animaux, différentes stratégies peuvent être employées. Par exemple, une faible dose d'IL-2 ajoutée à de l'IL-7 et de l'IL-15, deux cytokines impliquées dans l'homéostasie des lymphocytes T mémoires (voir section 3.2.2.1.2), pourrait être utilisée (186). Cette combinaison de cytokines pourrait permettre de garder les lymphocytes T plus longtemps en culture *in vitro* et d'évaluer une réponse immunitaire à médiation cellulaire de type mémoire. Une telle combinaison de cytokines devrait être testée et comparée à l'IL-2 seule en ce qui a trait aux phénotypes des lymphocytes T stimulés. En plus des différentes combinaisons possibles, l'ordre dans lequel ces cytokines sont ajoutées apparaît important (187) et pourrait être évalué dans un tel modèle.

En terminant, il est à noter que l'aide des lymphocytes T CD4⁺ dans la production de lymphocytes T CD8⁺ mémoire intervient, du moins dans certains modèles murins, par l'intermédiaire d'une interaction entre les molécules CD40 (CD8⁺) et CD40L (CD4⁺) (161). Les lymphocytes B utilisés dans nos expériences sont activés par du CD40L recombinant trimérique, la forme active de la molécule, dont la partie membranaire a été tronquée. Le CD40L utilisé est donc soluble. Afin d'éviter une stimulation directe des lymphocytes T CD8⁺ par le CD40L soluble du surnageant des CD40-B, ceux-ci ont été lavés avant d'être mis en culture avec les PBMCs. En outre, chez la souris, l'interaction entre le CD40, exprimé par les CPAs et le CD40L des lymphocytes T CD4⁺ n'est pas toujours requise pour l'expansion de lymphocytes T CD8⁺ mémoires (161, 166). Dans une telle situation, l'activation des CPAs par le CD40Ls ne risque pas de contourner l'interaction entre les molécules CD40L des lymphocytes T CD4⁺ et CD40 des CPAs.

De plus, l'aide des lymphocytes T CD4⁺ pour la génération et le maintien de lymphocytes T CD8⁺ mémoires peut être médiée par d'autres mécanismes. Récemment, l'importance de l'IL-21 provenant des lymphocytes T CD4⁺ a été montrée dans les réponses primaires et mémoires des lymphocytes T CD8⁺ contre le virus vaccinia dans la souris (188). Un rôle similaire de l'IL-2 avait également été rapporté précédemment (150), quoique toujours controversé *in vivo* (189). Tout de même, une stimulation par ces cytokines lors de la réponse primaire serait particulièrement importante afin de permettre, plus tard, la différenciation en cellules mémoires. Les lymphocytes T CD4⁺ peuvent également induire la production d'IL-15 par les CPAs (190), une autre cytokine fortement associée aux lymphocytes T CD8⁺ mémoires (voir plus loin).

Il est à noter que l'aide des lymphocytes T CD4⁺ peut parfois être remplacée, entre autres par une stimulation des CPAs par la voie des TLRs ou par l'ajout extrinsèque d'IL-15 (189). Ce n'est pas le cas dans notre modèle d'étude.

En résumé, notre modèle est adéquat afin d'étudier l'aide des lymphocytes T CD4⁺ dans la réponse cellulaire humaine contre le virus de l'influenza.

3.2.2 Importance de la réponse cellulaire contre l'influenza chez l'humain

Il existe très peu de preuves directes de l'importance de la réponse immunitaire à médiation cellulaire contre l'influenza. Comme mentionnés précédemment, les modèles animaux sont très révélateurs au sujet d'une telle réponse (voir section 1.3.2) mais, chez l'humain, une seule étude remontant à 1983 corrèle directement une bonne réponse immunitaire à médiation cellulaire avec une baisse de la charge virale (121). Il y a donc un besoin évident d'établir des prérequis et des corrélats de protection (hétérosubtypique) clairs et fiables pour la réponse cellulaire contre l'influenza. De plus, considérant que la réponse cellulaire n'offre pas une protection stérile, ces corrélats devraient être relatifs non seulement à l'occurrence des infections, mais aussi à la sévérité des symptômes et aux taux de propagation du virus.

3.2.2.1 Prérequis pour une réponse à médiation cellulaire mémoire efficace

Divers évènements sont généralement requis pendant et après la stimulation initiale des lymphocytes T afin de générer une réponse immunitaire à médiation cellulaire mémoire efficace. Le tableau I résume les principaux prérequis. Certains d'entre eux ont déjà été abordés en introduction à la section 1.3.3.

Tableau I. Prérequis généraux pour une réponse à médiation cellulaire mémoire efficace contre le virus de l'influenza.

A) Large éventail de cibles	Méthodes d'identification d'épitopes adéquates
B) Présentation antigénique et co-stimulation efficace	CPAs compétentes Aide des lymphocytes T CD4 ⁺ Cytokines homéostatiques (IL-7 et Il-15)
C) Éviter l'immunodominance	
D) Neutralisation des mécanismes antiviraux	Inhibition de NS1 – Antagoniste des IFNs de type 1

3.2.2.1.1 Large éventail de cibles (A)

Afin d'éviter que le virus de l'influenza échappe au système immunitaire, il importe qu'une réponse à médiation cellulaire cible un grand éventail d'épitopes. De nombreux épitopes conservés du virus de l'influenza ont été identifiés auxquels des lymphocytes T sont spécifiques. Cependant, la plupart de ces épitopes ont été identifiés en chargeant directement des CPAs avec un peptide, ce qui n'assure pas que ces épitopes seront apprêtés *in vivo* par les CPAs. Peu de techniques permettent d'ailleurs actuellement d'identifier des épitopes pertinents *in vivo*, particulièrement pour les épitopes restreints au complexe majeur d'histocompatibilité de classe (CMH)-II. Des techniques de cartographie d'épitopes plus efficaces doivent être développées en virologie, mais également en immunothérapie du cancer. Une méthode d'identification d'épitopes de lymphocytes T appelée « mRNA PCR-based epitope chase » (« mPEC ») a donc été développée, sous la supervision de Dr Lapointe et en collaboration avec le Dr Gauchat, dont le manuscrit est en Annexe 5 (voir section 3.2.3.3).

3.2.2.1.2 Cytokines homéostatiques (B)

Les cytokines homéostatiques permettent la survie à long terme des lymphocytes T mémoires. Entre autres, l'IL-7 et l'IL-15 sont essentielles à la survie et à la prolifération homéostatique basale des lymphocytes T mémoires (144, 191, 192) et pourraient être utilisées afin de développer un modèle de culture *in vitro* de lymphocytes T mémoires (voir plus loin).

3.2.2.1.3 Éviter l'immunodominance (C)

L'immunodominance, c'est-à-dire la hiérarchie par laquelle se développent les lymphocytes T spécifiques à des épitopes du virus de l'influenza, est particulièrement bien caractérisée chez la souris où celle-ci suit un processus strict (83, 117). Ainsi, la réponse immunitaire à médiation cellulaire primaire chez la souris B57BL/6 (haplotype CMH H-2^b) est dominée par des lymphocytes T reconnaissant les épitopes CMH-I NP³⁶⁶⁻³⁷⁴ et PA²²⁴⁻²³³ (193), alors que la réponse secondaire est dominée uniquement par l'épitope NP³⁶⁶⁻³⁷⁴ (194). Chez la souris Balb/c (haplotype CMH H-2^d) la réponse cellulaire est plutôt dominée par l'épitope de CMH-I NP¹⁴⁷⁻¹⁵⁵ (193). D'autres épitopes mineurs composent également la réponse cellulaire secondaire dans ces deux modèles (117), mais ne prendront plus d'importance qu'en absence des épitopes dominants (195).

Tel que démontré par Chen *et al* (196), l'ordre dans lequel des épitopes précis est multifactorielle et peut dépendre du niveau d'expression d'un peptide, de son apprêtement, de son affinité la molécule de CMH, du nombre de lymphocytes T spécifiques précurseurs et de l'avidité de leur TCR.

En outre, hiérarchie a également été rapportée pour les épitopes de CMH-II dans certains modèles (197), mais est peu caractérisé pour le virus de l'influenza.

Chez l'humain, l'immunodominance est beaucoup plus complexe, probablement en raison de la grande diversité des haplotypes de CMH. Bien que certains épitopes, tels que l'épitope M1⁵⁸⁻⁶⁶ restreint aux « Human Leukocyte Antigen » (HLA)-A2, soient immunodominants, cela ne semble pas empêcher la stimulation de lymphocytes T d'autres spécificités (140). En effet, les individus HLA-A2 possèdent des lymphocytes T spécifiques

à différentes cibles autres que l'épitope M1⁵⁸⁻⁶⁶. Ils ont de plus un plus grand nombre de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques précurseurs (140). D'autre part, d'autres épitopes que les épitopes dominants connus HLA-A2 ont pu être identifiés chez un individu dans le manuscrit de l'Annexe 5.

Autrement dit, les cibles conservées du virus de l'influenza sont, chez l'humain, nombreuses et sujettes à une immunodominance apparemment moins stricte.

3.2.2.1.4 Neutraliser les mécanismes antiviraux : Gène NS1 (D)

Le gène NS1 du virus de l'influenza est un puissant antagoniste des IFNs de type 1 (198), des molécules pro-inflammatoires sécrétées tôt à la suite de l'infection du virus de l'influenza et impliquées dans la génération d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire mémoire robuste (199). Ainsi, les VVAs possédant un gène NS1 inactivé génèrent une meilleure réponse mémoire des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques responsable d'un meilleur contrôle de la propagation du virus (200) (voir section 3.2.3.1).

3.2.2.2 Caractérisation des fonctions effectrices d'une réponse cellulaire efficace contre l'influenza

L'importance des différentes fonctions effectrices des lymphocytes T (sécrétion de cytokines et de chimiokines, lyse cellulaire, prolifération, etc.) et de leur polyfonctionnalité doit être évaluée en fonction de l'élimination virale. Par exemple, des essais de lyse de cellules infectées par des souches hétérologues du virus de l'influenza par des lymphocytes T à différents temps post-vaccination ou post-infection pourrait donner une indication de la force d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire hétérosubtypique. Alternativement, d'autres techniques simples (essai de dégranulation, un marquage intracellulaire ou essai d'ELISpot du granzyme B) permettant d'inférer le potentiel cytolytique de lymphocytes T, pourraient également être utilisées. Parallèlement à ces techniques, le profil de sécrétion de cytokines pourrait être évalué par marquage de cytokines intracellulaires, à l'instar de ce qui a été fait dans ce mémoire.

D'autre part, la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10, devrait être mesurée conjointement avec les cytokines pro-inflammatoires. Le taux de cytokines pro-inflammatoires par rapport à l'IL-10 est en grande partie responsable de la qualité de la réponse cellulaire contre l'influenza (86, 132, 201). Une trop grande quantité d'IL-10 empêchera une bonne réponse contre le virus pendant la phase aiguë de l'infection, alors qu'elle permettra de mettre fin à la réponse immunitaire lorsque le virus est éradiqué. On doit donc s'assurer du bon synchronisme de la sécrétion des différentes cytokines pro- et anti-inflammatoires.

3.2.2.3 Caractérisation des marqueurs de surface d'une réponse cellulaire efficace contre l'influenza

La présence de marqueurs de surface à la suite d'une vaccination doit également être évaluée. À titre d'exemple, les marqueurs CD27 et CD28 permettent de définir différentes sous-populations de lymphocytes T effecteurs mémoires. Par exemple, certaines sous-populations ont des fonctions effectrices augmentées et peuvent survivre à long terme en dépit de l'absence du récepteur CD127 (185). Or, la présence de lymphocytes T effecteurs mémoires prêt à réagir vigoureusement et directement dans les voies respiratoires est cruciale dans la réponse contre le virus de l'influenza chez la souris (146). À cette fin, la présence de récepteurs de chimiokine précis, tels que CCR5, est particulièrement importante. Chez l'humain, le rôle des différentes sous-populations mémoires dans la protection contre le virus de l'influenza n'est pas encore caractérisé, mais pourrait permettre de développer de nouvelles plateformes vaccinales mieux adaptées à l'influenza.

Pour ce faire, des tétramères de CMH spécifique à des lymphocytes T dominant la réponse cellulaire contre l'influenza (par ex. épitope M1⁵⁸⁻⁶⁶) pourraient suivre dans le temps certains des paramètres précédemment mentionnés et les relier au résultat d'une infection au virus de l'influenza. En outre, un système de sensibilisation *in vitro*, tel qu'utilisé dans ce mémoire, mais utilisant de faibles doses d'IL-2 en combinaison avec des cytokines homéostatiques importantes pour l'expansion de lymphocytes T mémoires (IL-7, IL-15) afin de favoriser leur expansion pourrait être utilisé (voir ci-dessus).

En résumé, la réponse cellulaire contre l'influenza peut être plus amplement caractérisée chez l'humain, à l'image de ce qui a été fait pour la fièvre jaune (202) ou l'hépatite B (203). Plus particulièrement, la présentation antigénique par les CPAs de protéines conservées doit être mieux définie dans un contexte de vaccination efficace. Une caractérisation par un système de sensibilisation *in vitro* des lymphocytes T dans le temps chez des patients vaccinés ou ayant été infectés par le virus de l'influenza pourrait permettre d'identifier des prérequis et des corrélats d'une réponse cellulaire efficace.

3.2.2.4 Présentation croisée par CMH-II de M1 et NP dans la réponse cellulaire contre l'influenza chez l'humain

La présentation croisée par CMH-II de M1 exprimé de façon endogène (voir manuscrit Chapitre 2) était connue avant cette étude (178, 179). Par contre, celle de NP n'avait pas été observée à ce jour. Classiquement, seuls les antigènes sécrétés ou endocytosés, ou les protéines ayant des fonctions dans les voies endosomales sont présentés par CMH-II. Comme mentionnés dans l'article du chapitre 2, différents mécanismes de présentation croisée existent cependant entre les voies CMH-I et CMH-II (voir plus loin) et rendent ces voies beaucoup moins exclusives qu'initialement perçues. Quel que soit le mécanisme impliqué, l'aide des lymphocytes T CD4⁺ est crucial pour une réponse immunitaire à médiation cellulaire.

Importance des lymphocytes T CD4⁺ dans la réponse cellulaire contre l'influenza

Une aide précoce des lymphocytes T CD4⁺ est un prérequis généralement considéré essentiel à la génération des lymphocytes T CD8⁺ mémoires efficaces (voir section 1.3.3.2.2). Or, comme une forte proportion de la population adulte semble déjà posséder des lymphocytes T mémoires dirigés contre l'influenza, il est possible que l'importance de l'aide des lymphocytes T CD4⁺ soit diminuée, particulièrement chez les adultes plus âgées. Néanmoins, de nouveaux lymphocytes T sont toujours produits par le thymus (204), bien que cela diminue avec l'âge. Ainsi, une vaccination pourrait stimuler de nouveaux lymphocytes T CD8⁺ naïfs pour lesquels l'aide des lymphocytes T CD4⁺ mémoires déjà présents favorisera une meilleure réponse mémoire.

De même, chez les enfants, la présentation par CMH-I et -II des protéines conservées endogènes M1 et NP pourrait permettre de favoriser la proximité et l'interaction des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ naïfs pour une meilleure réponse cellulaire.

D'autre part, nos résultats montrent que la présentation de M1 et de NP endogènes par CMH-II, et aussi par CMH-I, est suffisante pour l'expansion à court terme *in vitro* de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ effecteurs respectivement (Ch. 2, Figures 3 et 4). La sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T CD4⁺ à la suite de la présentation de M1 ou de NP par des CPAs peut être augmentée par les séquences de gp100 de mobilisation vers les endosomes, compartiments privilégiés de la présentation par CMH-II. Par contre, cela ne permet pas de favoriser l'expansion d'un plus grand nombre de lymphocytes T CD4⁺ ou d'améliorer leur phénotype (sécrétion de cytokines, présence de marqueurs de surface), ni de celui des lymphocytes T CD8⁺.

Il est envisageable que la présentation des protéines M1 et NP sauvages apprêtées de façon endogène par CMH-II par des CPAs dépasse un seuil d'expression minimal nécessaire à l'activation des lymphocytes T CD4⁺, du moins initialement. La sécrétion d'IFN- γ , et possiblement d'autres cytokines, ainsi que l'expression de certaines molécules de co-stimulation sur ces lymphocytes T CD4⁺, est probablement suffisante pour la stimulation à court terme des lymphocytes T CD8⁺, mais leur importance reste à caractériser pour l'expansion de lymphocytes T CD8⁺ mémoires. De même, d'autres études sont requises en ce qui a trait aux lymphocytes T CD4⁺ mémoires, de l'aide qu'ils peuvent fournir aux lymphocytes T CD8⁺ mémoires et des mécanismes impliqués dans cette aide (voir ci-dessus).

À ce sujet, des lymphocytes T CD8⁺ pourraient être purifiés et stimulés en présence de différentes quantités de lymphocytes T CD4⁺ ou d'anticorps bloquants différents médiateurs (CD40L, cytokines pro-inflammatoires, etc.) afin de déterminer ce seuil d'activation et son mécanisme d'action. L'évaluation du degré d'aide de lymphocytes T CD4⁺ requis pour l'expansion CD8⁺ mémoires efficaces et de son mécanisme d'action chez l'humain serait particulièrement intéressante d'un point de vue vaccinal.

Présence d'une mémoire immunitaire cellulaire préalable

La majorité de la population possède des lymphocytes T mémoires spécifiques à l'influenza (123, 125). Les expériences sur le rôle des lymphocytes T CD4⁺ du paragraphe précédent pourraient donc être réalisées également avec des lymphocytes T naïfs purifiés. En effet, une présence préalable de lymphocytes T mémoires, pour lequel l'aide des lymphocytes T CD4⁺ n'est plus essentielle, pourrait biaiser les résultats. Néanmoins, dans une optique de vaccination, la plupart des gens auront eu aussi la grippe et auront des lymphocytes T mémoires spécifiques à la grippe. Nos expériences, ainsi que celles suggérées précédemment, miment donc la situation chez les adultes en santé. Les expériences sur les T naïfs pourraient renseigner mieux sur la réponse des gens n'ayant pas eu la grippe, ou éventuellement sur celles des enfants.

Mécanismes de présentation croisée par CMH-II des protéines M1 et NP

Comme mentionnés précédemment, plusieurs mécanismes permettent une présentation croisée d'antigène endogène par CMH-II.

D'abord, on ne peut exclure que les protéines M1 et NP puissent venir en partie de cellules électroporées en apoptose ou en nécrose. En effet, l'électroporation entraîne la mort d'une partie des CPAs (données non présentées). Ainsi, une partie des protéines M1 et NP présentées par CMH-II par les CPAs pourrait provenir d'une source exogène et non exclusivement endogène. Néanmoins, le laps de temps entre l'électroporation et la co-culture avec les lymphocytes (24 heures) est court pour permettre une expression des protéines par des CD40-B, suivie de leur mort, puis de la prise en charge des antigènes par d'autres CD40-B vivants et de la présentation de ces antigènes par CMH-II. De plus, les CD40-B utilisés comme CPAs - purs à près de 70 % et contaminés principalement par des lymphocytes T (données non présentées) - possèdent un faible pouvoir de phagocytose (205), rendant peu probable un apprêtement antigénique à partir de cellules mortes.

En résumé, la phagocytose de CD40-B apoptotiques par d'autres CD40-B vivants ou d'autres types cellulaires phagocytaires comme source d'antigène exogène pour la présentation par CMH-II de M1 et de NP reste peu probable dans notre contexte expérimental.

L'ajout de CD40-B transfectés provenant d'un donneur non apparié pour les CMH-II à des CD40-B non transfectés autologues mis en culture avec des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques pourrait permettre de répondre à cette question. En outre, des essais de reconnaissance en présence d'inhibiteurs d'apoptose ou après sélection négative des CD40-B électroporés vivants pourraient être utilisés complémentaires.

D'autre part, les protéines M1 et NP du virus de l'influenza ne se situent pas dans les voies d'apprêtement classiques de présentation par CMH-II (par ex. endosomes). En effet, d'autres groupes ont montré que la protéine NP exprimée seule se situe exclusivement dans le noyau à la suite de son expression seule (206), alors que la protéine M1 exprimée seule est située à la fois dans le noyau et le cytoplasme (207). De plus, il a été montré que la présentation croisée par CMH-II de M1 n'implique pas la voie classique endosomale (178, 179), le protéasome, ni le « transporter associated with antigen processing (TAP) molecule ». Par contre, celle-ci implique certaines protéases lysosomales (208). Ainsi, étant donné leur localisation normale hors des voies classiques de présentation par CMH-II, l'autophagie semble un mécanisme plausible pour expliquer la présentation croisée des antigènes M1 et NP (209, 210). Une « fuite » des protéines M1 et NP vers les endosomes reste cependant possible et pourrait être observée par microscopie confocale.

L'autophagie est un phénomène d'abord décrit pour des cellules en manque énergétique ou cherchant à se débarrasser d'organelles devenues inutiles. Des composantes cytosoliques sont englobées par une bicouche lipidique pour former un autophagosome qui fusionne avec un endosome tardif ou un lysosome afin d'en digérer le contenu et de combler les besoins cellulaires (211). Plus récemment, ce mécanisme a aussi été associé à une présentation antigénique croisée par CMH-II d'antigènes cytosoliques et nucléaires (209). Ainsi, un autophagosome contenant des protéines endogènes fusionne avec un endosome ou un lysosome contenant des protéases, responsables de la dégradation des antigènes, mais contenant aussi des molécules de CMH-II prêtes à être chargées et présentées à la surface du CPA (211).

L'autophagie est essentielle à la réplication du virus de l'influenza. Par contre, bien que son inhibition interfère avec la réplication du virus, celle-ci diminue la quantité de M1 et ne change pas l'accumulation de NP (212), ce qui contredit un modèle où l'autophagie dégraderait une partie de ces protéines pour les présenter par CMH-II. Cependant, dans ce contexte d'infection virale, la localisation de M1 et de NP dépend, entre autres, de l'expression des protéines HA (213) et NS2 (214). Le niveau de traduction de M1 et de NP dépend également de l'expression de NS1 (215) et du stade dans du cycle de réplication viral. Une altération dans l'autophagie a donc pu altérer d'autres mécanismes viraux impliqués dans l'accumulation et l'expression de M1 et de NP.

D'autre part, le CD40L, l'IFN- γ et le TNF peuvent stimuler l'autophagie, alors que l'IL-4 est connu pour l'inhiber. En fonction de la balance des signaux, il est fort probable que les CD40-B puissent avoir été stimulés à utiliser cette voie de présentation. D'ailleurs, des lymphocytes B immortalisés par le virus Epstein-Barr peuvent présenter M1 par CMH-II (178) (manuscrit en Annexe 5), alors que les DCs sont déjà connues pour utiliser ce mécanisme (211). L'autophagie n'est donc pas unique à notre système expérimental. Des essais de présentations de M1 et de NP endogènes par des CPAs (CD40-B, EBV-B, DCs, etc.) à des lymphocytes T CD4⁺, et CD8⁺ en contrôle, en présence d'inhibiteur de l'autophagie (par ex. 3-méthyladénine) pourrait permettre de déterminer son rôle dans la présentation croisée de M1 et de NP.

Finalement, un autre mécanisme récemment identifié est celui des exosomes. Comme mentionné précédemment, M1 n'a pas besoin d'être sécrété afin d'être présenté par CMH-II. Cependant, la protéine HA du virus de l'influenza semble pouvoir être présentée par CMH-II en induisant la formation d'exosomes sécrétés et endocytosés par d'autres CPAs (216). Ce mécanisme pourrait être à considérer dans un autre modèle que celui utilisé dans ce mémoire, par exemple dans une situation où un virus complet est utilisé (par ex. dans les VVAs).

Présentation croisée par CMH-II des protéines M1 et NP in vivo

Il n'est pas clair si la présentation croisée par CMH-II des protéines M1 et NP endogènes a lieu *in vivo*, du moins dans un modèle animal. En effet, une réponse des

lymphocytes T CD4⁺ en IFN- γ n'a pas été observée dans le modèle murin C57BL/6 à la suite d'une unique vaccination à ADN (voir manuscrit Chapitre 2). Il est possible que notre test soit de sensibilité trop faible pour évaluer la présence de lymphocytes T CD4⁺ sous-dominants, ou encore que, dans ce contexte, l'analyse d'une cytokine autre que l'IFN- γ soit souhaitable. D'autres études plus approfondies dans les modèles murins C57BL/6 et BALB/c seront nécessaires afin de clarifier si une telle présentation croisée par CMH-II a lieu *in vivo* à la suite de l'injection d'un vaccin actuellement disponible et, le cas échéant, le degré de son importance.

L'étude de la présentation endogène par CMH-II dans des CPAs ou dans les cellules résidentes du tissu d'injection à la suite d'un vaccin inactivé en comparaison d'un VVA, ou tout autre vaccin induisant une réponse cellulaire, serait pertinente. Il est possible que, dans le cas des VVAs, le gène NS1, antagoniste des IFNs de type 1, interfère avec le processus de présentation croisée et avec l'expansion de lymphocytes T CD8⁺ mémoires. En effet, les IFNs de type 1 sont impliqués à la fois dans la maturation des CPAs (par ex. induction de l'autophagie) (211), mais aussi dans la génération des lymphocytes T mémoires efficaces (199). Les VVAs dont les régions de NS1 impliquées dans l'inhibition des IFNs de type 1 ont été délestées présentent d'ailleurs un avantage à cet égard (200) (voir ci-dessous).

3.2.3 Induction d'une réponse cellulaire contre l'influenza chez l'humain

3.2.3.1 Vaccins actuels induisant une réponse cellulaire contre l'influenza

Chez l'humain, le degré d'importance d'une réponse cellulaire dans une protection hétérosubtypique contre l'influenza reste à établir. Néanmoins, il est intéressant de noter que certaines techniques de vaccination actuelles permettent de stimuler à la fois une réponse humorale et une réponse cellulaire contre l'influenza.

Ainsi, les VVAs peuvent induire une réponse immunitaire à médiation cellulaire (voir section 1.3.1.1.2). Comme mentionné plus haut, il est probable que l'amplitude de la réponse cellulaire induite par ces vaccins soit limitée par la présence du gène NS1. De fait, de nouveaux VVAs possédant des délétions inactivant la fonction inhibitrice du gène NS1 permettent, chez la souris, une protection hétérosubtypique accrue contre des souches

hétérologues virulentes du sous-type H5N1 du virus de l'influenza (217) en stimulant une forte réponse des lymphocytes T CD8⁺ (180), ce qui fait d'eux une plateforme vaccinale de choix. Par contre, les VVAs ne sont pour l'instant autorisés que pour les individus âgés de 2 à 49 ans.

Ces dernières années, les vaccins à ADN ont beaucoup attiré l'attention comme plateforme vaccinale alternative contre l'influenza (90, 181) (voir section 1.3.1.2.1). D'ailleurs, un premier vaccin à ADN codant pour une protéine HA du virus de l'influenza est actuellement en essai clinique de Phase 1 (91, 94), et pourrait éventuellement inclure d'autres protéines codées telles que M1 et NP. De tels vaccins sont à considérer à moyen terme en prévention contre l'influenza, particulièrement chez les personnes âgées. En effet, ce groupe d'âge est particulièrement à risque de complications lors d'une infection au virus de l'influenza, alors que les risques liés à une insertion potentielle de l'ADN dans le génome et au passage de mutations à la descendance sont grandement diminués. Même si des mutations insertionnelles stables inactivant des gènes importants apparaissent dans le génome de leurs cellules germinales, ce qui est peu probable étant donné les observations dans les modèles animaux, les personnes âgées ont passé la période de reproduction normale. Le risque de modification génétique transmis à la descendance est donc quasi nul. Considérant la vulnérabilité de ce groupe d'âge à l'influenza, il pourrait bénéficier d'une vaccination à ADN.

Finalement, les vaccins inactivés en combinaison avec des adjuvants à base d'émulsion de squalène, tels qu'utilisés pendant la pandémie H1N1 de 2009, peuvent stimuler, dans une certaine mesure, une réponse immunitaire à médiation cellulaire contre l'influenza (82). De tels vaccins utilisent cependant une source exogène d'antigènes et nécessitent plutôt une présentation croisée par CMH-I par des CPAs matures et compétentes. Il serait intéressant de comparer systématiquement l'efficacité des différents vaccins et leurs différences dans la réponse cellulaire induite *in vitro* et *in vivo*. Un système de culture *in vitro*, puis d'analyse par marquage de cytokines intracellulaires tel qu'utilisé dans ce mémoire pourrait être utilisé à cette fin.

3.2.3.2 Fréquence d'administration

La fréquence de telles vaccinations reste à établir. Il est envisageable qu'un nombre élevé de cycles de vaccination diminue la force de la réponse immunitaire humorale et cellulaire. Bien qu'une stimulation répétée des lymphocytes B permette d'augmenter l'affinité des anticorps, la vaccination annuelle répétée contre une même souche virale peut engendrer une réponse humorale dominante contre certains épitopes originaux. Or, ces épitopes peuvent ne pas être protecteurs contre une nouvelle souche du virus et empêcher la stimulation de nouveaux épitopes plus adaptés (218), un phénomène appelé « original antigenic sin ». D'autre part, une forte réponse humorale à la suite de stimulations répétées peut empêcher la prise en charge et la présentation des antigènes viraux aux lymphocytes T (219). Finalement, un trop grand nombre de stimulations des lymphocytes T mémoires spécifiques au virus de l'influenza peut engendrer une fatigue (efficacité diminuée) expliquée par un phénotype de différenciation terminale (voir Annexe 4). Un rappel vaccinal (vaccin inactivé) chez les personnes âgées entraîne une expression 10 fois plus grande d'IL-10 par les lymphocytes T CD8⁺ en comparaison à une seule dose du vaccin (220).

Néanmoins, les lymphocytes T mémoires secondaires (ayant subi 2 rondes distinctes de stimulation) sont généralement connus pour avoir des fonctions effectrices supérieures et plus promptes que celles des lymphocytes T mémoires primaires (150). De plus, différents sous-types de Tem spécifiques à l'influenza ont récemment été identifiés sur la base de l'expression des molécules de co-stimulation, CD27 et CD28. La perte des marqueurs CD27 et CD28 dans la population lymphocytaire Tem3, qui a subi un nombre élevé de divisions cellulaires, corrèle avec une expression soutenue des fonctions effectrices (par ex. granzyme B) et avec une diminution du marqueur mémoire CD127, suggérant une plus grande sensibilité à l'apoptose (185, 221). Néanmoins, cette population cellulaire effectrice survit *in vivo* en absence de signaux de survie standard. À l'inverse, les lymphocytes CD8⁺ Tem1, exprimant CD27 et CD28 et ayant subi un nombre plus faible de division cellulaire, se rapprochent d'un phénotype Tcm, à l'exception de leur localisation périphérique. Ensemble, ces données suggèrent un modèle de différenciation linéaire (Annexe 4) où l'expression de CD27 et de CD28 sont perdues au fil des stimulations antigéniques au

profit de meilleures fonctions effectrices. Ces sous-types de lymphocytes T mémoires n'ont que récemment été identifiés chez l'humain et nécessitent d'être caractérisés plus en profondeur.

Tout de même, dans le modèle murin, la présence de lymphocytes T effecteurs mémoires prêts à réagir directement dans les voies respiratoires est cruciale pour une protection contre le virus de l'influenza (136, 146). On peut donc envisager qu'une stimulation répétée du système immunitaire favorise de tels lymphocytes T effecteurs mémoires efficaces en prévention contre une infection du virus de l'influenza. Si tel est le cas, il sera important de déterminer si ces lymphocytes T se retrouvent en nombre suffisants dans les muqueuses pulmonaires afin de permettre une protection.

Finalement, divers vaccins (inactivé vs VVA), en fonction de l'âge du patient, agissent différemment sur le phénotype (par ex. expression de CD27) des lymphocytes T mémoires (87), d'où l'importance de caractériser les phénotypes efficaces en prévention de l'influenza et de déterminer comment les favoriser. De plus, la réponse cellulaire tend à s'estomper avec le vieillissement (133) ou à être dominée par quelques épitopes (222). Il sera donc primordial d'étudier les facteurs permettant une réponse immunitaire à médiation cellulaire robuste à long terme pour des lymphocytes T de spécificités variées chez les adultes et les personnes âgées.

3.2.3.3 Identification d'épitopes conservés spécifiques au virus de l'influenza

Une grande variété d'épitopes du virus de l'influenza permet d'exercer une pression immunitaire suffisante pour éviter une évasion provoquée par quelques mutations ponctuelles dans le génome viral. Or, les techniques actuelles d'identification d'épitopes laissent place à amélioration (voir Annexe 5). Nous avons ainsi développé une méthode rapide et précise de cartographie d'épitopes de lymphocytes T. En utilisant cette technique, nous avons identifié 3 épitopes, 2 restreints au CMH-I (1 spécifique à NP, NP-CD8; 1 spécifique à M1, M1-CD8) et 1 autre restreint au CMH-II (spécifique à M1, M1-CD4) (voir Annexe 5).

D'abord, nous avons confirmé l'épitope dominant M1⁵⁸⁻⁶⁶ (221, 223), qui est restreint aux molécules HLA-A2, un haplotype présent chez près de 50 % de la population caucasienne (224). Cet épitope bien caractérisé est de plus hautement conservé et requis pour la viabilité du virus de l'influenza (225).

Ensuite, l'épitope du clone lymphocytaire NP-CD8 (AFDERRNKYL) avait précédemment été identifiée dans une région de 18 acides aminés chez un donneur normal par Lee *et al* (123). Nos résultats viennent valider et préciser la nature de cet épitope à 10 acides aminés seulement. Des peptides de plus grandes puretés et incluant potentiellement diverses modifications post-traductionnelles devront cependant être synthétisés afin de déterminer l'épitope exact du clone NP-CD8. En outre, cet épitope est conservé à la fois dans un virus H3N2 saisonnier et dans le sous-type H5N1.

Le clone M1-CD4 reconnaît quant à lui 2 épitopes différents. Il est probable qu'il s'agisse d'un clone composé de deux populations lymphocytaires ayant différentes spécificités. Un deuxième clonage par dilution limite pourrait permettre d'éclaircir cette question. Il est néanmoins possible qu'un lymphocyte T possède plus d'un épitope spécifique, par exemple en exprimant plus d'un TCR (226). Par contre, il est étonnant que seul le peptide de 15 acides aminés b (NGNGDPNNMDKAVKL) soit reconnu et que les peptides partageant certaines régions de sa séquence ne le soient pas. En effet, les épitopes restreints au CMH-II sont composés d'un noyau de 9 acides aminés qui doivent être partagés par les peptides adjacents au peptide b. Encore une fois, la synthèse de peptides plus courts et de plus grandes puretés pourrait permettre de préciser la nature de ces épitopes. Une région partageant cette séquence d'acides aminés bien conservés entre différentes souches de l'influenza a déjà été rapportée chez un donneur normal par le groupe de Lee *et al* (123).

De même, le deuxième épitope (YRKLKREITF), mieux reconnu par le clone M1-CD4, a également déjà été identifié par ce groupe (123) ainsi que d'autres (Yang *et al* (227), Babon *et al* (128), épitope restreint au HLA-DRβ1*0103; Faner *et al* (228), épitope restreint aux HLA-DRβ*1101 et *1301). Il est intéressant de noter que ce deuxième épitope est bien conservé dans un virus H3N2 saisonnier et dans le sous-type H5N1 (123). De plus,

un clone spécifique à cet épitope provenant d'un virus H3N2 reconnaît spécifiquement des cellules infectées par des virus des sous-types H1N1 ou H5N1.

En résumé, la technique d'identification d'épitopes « mPEC » a permis de confirmer trois épitopes hautement conservés du virus de l'influenza et impliqués dans une réponse immunitaire à médiation cellulaire hétérosubtypique. Cette technique pourrait maintenant être utilisée pour déterminer la spécificité de lymphocytes T dirigés contre des antigènes d'autres infections virales, ou encore contre des antigènes tumoraux. En outre, une variante améliorée de mPEC utilisant des techniques de détection plus sensibles, telles que le marquage de cytokines intracellulaires ou l'ELISpot, est actuellement en développement dans le laboratoire afin d'identifier la spécificité de lymphocytes directement isolés (*ex vivo*).

Chapitre 4. Conclusions et perspectives générales

L'objectif de ce projet de maîtrise était de caractériser la réponse immunitaire à médiation cellulaire contre des antigènes conservés du virus de l'influenza à travers l'analyse de la présentation antigénique endogène de M1 et de NP.

Nous avons établi que, dans un contexte de stimulation *in vitro* de lymphocytes T, la présentation par CMH-I et -II des antigènes conservés M1 et NP exprimés de façon endogène est suffisante pour la stimulation à court terme de lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺.

En parallèle, nous avons également développé une méthode rapide et efficace d'identification d'épitopes apprêtés de façon endogène par des CPAs appelée « mPEC ». Cette méthode, qui fait l'objet d'une demande de brevet, nous a permis de confirmer trois épitopes fortement conservés, 2 restreints au CMH-I provenant de M1 ou de NP et un autre provenant de M1 restreint au CMH-II. « mPEC » pourra en outre servir à l'identification d'épitopes spécifiques à d'autres virus ou encore à des antigènes tumoraux conjointement avec les séquences de mobilisation vers les endosomes de gp100 qui pourront permettre la présentation par CMH-II d'antigènes endogènes qui, initialement, ne le sont pas.

En terminant, d'autres études sont nécessaires avant de permettre une protection pan-spécifique contre le virus de l'influenza médiée par une réponse cellulaire hétérosubtypique. D'une part, il sera intéressant d'évaluer si la présentation par CMH-I et -II de M1 et NP sera également suffisante afin de générer une robuste réponse immunitaire à médiation cellulaire dans des cultures *in vitro* favorables aux lymphocytes T mémoires humains et dans des modèles *in vivo* d'infections animales. Ensuite, il faudra évaluer la capacité des vaccins disponibles à générer une réponse cellulaire pan-spécifique efficace et les conditions requises pour l'engendrer. Il est possible que plusieurs stratégies doivent être employées simultanément pour stimuler une réponse immunitaire plus complète.

Les récents progrès en immunologie rendent compte de la complexité des interactions entre le système immunitaire et les différents pathogènes, mais également entre les sous-types cellulaires du système immunitaire inné et acquis. Dans ce contexte, il apparaît de plus en plus difficile d'envisager une solution vaccinale unique. À l'image des virus et de son propre système immunitaire, l'humain devra faire preuve d'adaptation.

Bibliographie

1. Cox N, Subbarao K. Global Epidemiology of Influenza: Past and Present. *Annu Rev Med.* 2000;51:407-21.
2. Lagacé-Wiens PRS, Rubinstein E, Gumel A. Influenza epidemiology—past, present, and future. *Crit Care Med.* 2010;38(3):1-9.
3. Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *J Virol.* 2005;79(5):2814-22.
4. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *N Engl J Med.* 2009;360(25):2605-15.
5. Subbarao K, Joseph T. Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(4):267-78.
6. Whittaker GR. Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med.* 2001 1er avril 2010;3:1-12.
7. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine.* 2008;26S:D49-D53.
8. Wu WW, Panté N. The directionality of the nuclear transport of the influenza A genome is driven by selective exposure of nuclear localization sequences on nucleoprotein. *Virology J* [Publication en série sur Internet]. 2009; 6(68): <http://www.virologyj.com/content/6/1/68>.
9. Bucher D, Popple S, Baer m, Mikhail A, Gong Y-F, Whitaker C, et al. M protein (M1) of influenza virus: Antigenic analysis and intracellular localization with monoclonal antibodies. *J Virol.* 1989;63(9):3622-33.
10. Bullido R, Gómez-Puertas P, Albo C, Portela A. Several protein regions contribute to determine the nuclear and cytoplasmic localization of the influenza A virus nucleoprotein. *J Gen Virol.* 2000;81:135-42.
11. McMurry JA, Johansson BE, Groot ASD. A call to cellular and humoral arms. *Hum Vaccin.* 2008;4:148-57.
12. Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(9):4171-5.
13. Wagner R, Matrosovich M, Klenk H-D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol.* 2002;12:159-66.
14. Peiris JSM, Jong MDd, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:243-67.

15. Kim J-K, Negovetich NJ, Forrest HL, Webster RG. Ducks: The "Trojan Horses" of H5N1 influenza. *Influenza Other Respi Viruses*. 2009;3(4):121-8.
16. Munster VJ, Wit Ed, Brand JMAvd, Herfst S, Schrauwen EJA, Bestebroer TM, et al. Pathogenesis and Transmission of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Virus in Ferrets. *Science*. 2009;325(5939):481-3.
17. Lowen AC, Mubareka S, Tumpey TM, García-Sastre A, Palese P. The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(26):9988-92.
18. Smith H, Sweet C. Lessons for human influenza from pathogenicity studies with ferrets. *Rev Infect Dis*. 1988;10(1):56-75.
19. Matsuoka Y, Lamirande EW, Subbarao K. The Ferret Model for Influenza. *Current Protocols in Microbiology*. 2009;13:15G.2.1–G.2.29.
20. Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog* [Publication en série sur Internet]. 2007; 3(10): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2034399/pdf/ppat.0030151.pdf>.
21. Shaman J, Kohn M. Absolute humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3243-8.
22. Hope-Simpson RE, Golubev DB. A new concept of the epidemic process of influenza A virus. *Epidemiol Infect*. 1987;99(1):5-54.
23. Cannell JJ, Vieth R, Cumhau J, Holick MF, Grant WB, Madronich S, et al. Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol Infect*. 2006;134:1129–40.
24. Cannell JJ, Zaslhoff M, Garland CF, Scragg R, Giovannucci E. On the epidemiology of influenza. *Virol J* [Publication en série sur Internet]. 2008; 5(29): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2279112/pdf/1743-422X-5-29.pdf>.
25. Agence de la Santé Publique du Canada. L'influenza. 2010; <http://www.phac-aspc.gc.ca/influenza/index-fra.php>.
26. Organisation mondiale de la santé. Fact sheet no 211 : Influenza (seasonal). 2009 [consulté le 3 août 2010]; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>.
27. «Center for Disease control and prevention». Prevention and control of seasonal influenza with vaccines. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009;58:1-52.
28. Morens DM, Taubenberger JK, Harvey HA, Memoli MJ. The 1918 influenza pandemic: Lessons for the 2009 and the future. *Crit Care Med*. 2010;38(4 Suppl):e10-20.
29. Johnson NPAS, Mueller J. Updating the accounts: Global mortality to the 1918-1920 "spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med*. 2002;76:105-15.
30. Murray CJ, Lopez AD, Chin B, Feehan D, Hill KH. Estimation of potential global pandemic influenza mortality on the basis of vital registry data from the 1918–20 pandemic: a quantitative analysis. *Lancet*. 2007;368:2211-8.

31. Ahmed R, Oldstone MBa, Palese P. Protective immunity and susceptibility to infectious diseases: lessons from the 1918 influenza pandemic. *Nat Immunol*. 2007;8:1188-93.
32. Dowdle WR. Influenza A recycling revisited. *Bull World Health Organ*. 1999;77:820-8.
33. Barry JM, Viboud C, Simonsen L. Cross-protection between successive waves of the 1918-1919 influenza pandemic: epidemiological evidence from US Army camps and from Britain. *The Journal of infectious diseases*. 2008;198:1427-34.
34. Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG. Initial Genetic Characterization of the 1918 "Spanish" Influenza Virus. *Science*. 1997;275(5307):1793-6.
35. Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, Zeng H, Solórzano A, Swayne DE, et al. Characterization of the Reconstructed 1918 Spanish Influenza Pandemic Virus. *Science*. 2005;310(5745):77-80.
36. Pappas C, Aguilar PV, Basler CF, Orzano S, A. Z, H. P, et al. Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:3064-9.
37. Basler CF, Aguilar PV. Progress in identifying virulence determinants of the 1918 H1N1 and the Southeast Asian H5N1 influenza A viruses. *Antiviral Res*. 2008;79:166-78.
38. La Gruta NL, Kedzierska K, Stambas J, Doherty PC. A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection. *Immunol Cell Biol*. 2007;85:85-92.
39. Meunier I, Pillet S, Simonsen N, von Messling V. Influenza pathogenesis: Lessons earned from animal studies with H5N1, H1N1 Spanish, and pandemic H1N1 2009 influenza. *Crit Care Med* [Publication en série sur Internet]. 2010; 38(4 Suppl).
40. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:15-22.
41. Miller MA, Viboud C, Balinska M, Simonsen L. The signature features of influenza pandemics - Implications for policy. *N Engl J Med*. 2009;360:2595-8.
42. Organisation mondiale de la santé. Ten concerns if avian influenza becomes a pandemic 2005. Available from: <http://www.who.int/csr/disease/influenza/pandemic10things/en/print.html>.
43. Kilbourne ED. Influenza Pandemics of the 20th Century. *Emerg Infect Dis* [Publication en série sur Internet]. 2006; 12(1): <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no01/05-1254.htm>.
44. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Bridges CB, Cox NJ, et al. Influenza-associated hospitalizations in the United States. *The journal of the American medical association*. 2004;292:1333-40.
45. Garten RJ, Davis CT, Russell Ca, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009;325:197-201.

46. Organisation mondiale de la santé. Pandemic (H1N1) 2009 Weekly update - update 112. 2010 [consulté le 23 août 2010]; http://www.who.int/csr/don/2010_08_06/en/index.html.
47. Organisation mondiale de la santé. Pandemic (H1N1) 2009 Weekly update - update 76. 2009 [consulté le 14 avril 2010]; http://www.who.int/csr/don/2009_11_27a/en/index.html.
48. Chowell G, Bertozzi SM, Colchero MA, Lopez-Gatell H, Alpuche-Aranda C, Hernandez M, et al. Severe respiratory disease concurrent with the circulation of H1N1 influenza. *N Engl J Med*. 2009;361(7):674-9.
49. Rothberg MB, Haessler SD. Complications of seasonal and pandemic influenza. *Crit Care Med*. 2010;38(4 Suppl):e91-7.
50. «Centre for disease control and prevention». Serum Cross-Reactive Antibody Response to a Novel Influenza A (H1N1) Virus After Vaccination with Seasonal Influenza Vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009;58(19):521-4.
51. Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, Sun H, et al. Cross-Reactive Antibody Responses to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. *N Engl J Med*. 2009;361(20):1945-52.
52. Maines TR, Jayaraman A, Belser Ja, Wadford Da, Pappas C, Zeng H, et al. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science*. 2009;325:484-7.
53. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, et al. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature*. 2009;460:1021-5.
54. Steel J, Staeheli P, Mubareka S, García-Sastre A, Palese P, Lowen AC. Transmission of pandemic H1N1 influenza virus and impact of prior exposure to seasonal strains or interferon treatment. *J Virol*. 2010;84:21-6.
55. Ghedin E, Fitch A, Boyne A, Griesemer S, DePasse J, Bera J, et al. Mixed infection and the genesis of influenza virus diversity. *J Virol*. 2009;83(17):8832-41.
56. U.S. Department of Health & Human Services. Flu.gov : Global activities. 2010 [consulté le 15 avril 2010]; <http://www.flu.gov/professional/global/>.
57. Organisation mondiale de la santé. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5N1) reported to WHO. 2010 [consulté le 23 août 2010]; http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_08_12/en/index.html.
58. Yen H-L, Aldridge JR, Boon ACM, Ilyushina Na, Salomon R, Hulse-Post DJ, et al. Changes in H5N1 influenza virus hemagglutinin receptor binding domain affect systemic spread. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:286-91.
59. Yang Z-Y, Wei C-J, Kong W-P, Wu L, Xu L, Smith DF, et al. Immunization by avian H5 influenza hemagglutinin mutants with altered receptor binding specificity. *Science*. 2007;317:825-8.

60. Organisation mondiale de la santé. Antigenic and genetic characteristics of influenza A(H5N1) and influenza A(H9N2) viruses and candidate vaccine viruses developed for potential use in human vaccines. 2010 [consulté le 23 août 2010], http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/201002_H5_H9_VaccineVirus_Update.pdf.
61. Organisation mondiale de la santé. Acute respiratory infections: Influenza. 2009 [consulté le 29 avril 2010]; http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index1.html.
62. Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway's Immunobiology*. 7 ed. New York: Garland science, Taylor and Francis group, LLC; 2008.
63. Leroux-Roels I, Bernhard R, Gérard P, Dramé M, Hanon E, Leroux-Roels G. Broad Clade 2 cross-reactive immunity induced by an adjuvanted clade 1 rH5N1 pandemic influenza vaccine. *PLoS One*. 2008;3(2):e1665.
64. Lacasse P, Denis J, Lapointe R, Leclerc D, Lamarre A. Novel Plant Virus-Based Vaccine induces protective cytotoxic T-lymphocyte-mediated antiviral immunity through dendritic cell maturation. *J Virol*. 2008 January 15, 2008;82(2):785-94.
65. Kwissa M, Pai Kasturi S, Pulendran B. The science of adjuvants. *Expert Rev Vaccines*. 2007;6(5):673-84.
66. Atmar RL, Keitel WA. Adjuvants for pandemic influenza vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;333:323-44.
67. Dormitzer PR, Galli G, Castellino F, Golding H, Khurana S, Del Giudice G, et al. Influenza vaccine immunology. *Immunol Rev*. 2011;239(1):167-77.
68. Agence de la santé publique du Canada. Combatez la grippe.ca. 2010 [consulté le 21 avril 2010]; <http://www.phac-aspc.gc.ca/alert-alerte/h1n1/index-fra.php>.
69. Couch RB. Seasonal influenza virus vaccine. *Vaccine*. 2008;26S:D5-D9.
70. Organisation mondiale de la santé. Pandemic (H1N1) 2009. 2009 [consulté le 10 mars 2010]; <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/index.html>.
71. Kreijtz JHCM, Osterhaus ADME, Rimmelzwaan GF. Vaccination strategies and vaccine formulations for epidemic and pandemic influenza control. *Hum Vaccin*. 2009;5(3):126-35.
72. Ansaldi F, Canepa P, Parodi V, Bacilieri S, Orsi A, Compagnino F, et al. Adjuvanted seasonal influenza vaccines and perpetual viral metamorphosis: the importance of cross-protection. *Vaccine*. 2009;27:3345-8.
73. Nichol KL. Efficacy and effectiveness of influenza vaccination. *Vaccine*. 2008;26S:D17-D22.
74. Simonsen L, Taylor RJ, Viboud C, Miller MA, Jackson LA. Mortality benefits of influenza vaccination in elderly people: an ongoing controversy *Lancet Infect Dis*. 2007;7(10):658-66.

75. Dean AS, Moffatt CRM, Rosewell A, Dwyer DE, Lindley RI, Booy R, et al. Incompletely matched influenza vaccine still provides protection in frail elderly. *Vaccine*. 2010;28(3):864-7.
76. Collin N, Radiguès Xd, Force WHOHNVT. Vaccine production capacity for seasonal and pandemic (H1N1) 2009 influenza. *Vaccine*. 2009;27:5184-6.
77. Plennevaux E, Sheldon E, Blatter M, Reeves-Hoché M-K, Denis M. Immune response after a single vaccination against 2009 influenza A H1N1 in USA: a preliminary report of two randomised controlled phase 2 trials. *Lancet*. 2010;375(9708):41-8.
78. Tuite A, Fisman DN, Kwong JC, Greer A. Optimal pandemic influenza vaccine allocation strategies for the canadian population. *PLoS Currents Influenza*. 2010:RRN1144.
79. Organisation mondiale de la santé. Options for the use of human H5N1 influenza vaccines and the WHO H5N1 vaccine stockpile. WHO scientific consultation; 1-3 octobre 2007; Geneva, Switzerland 2008. p. 1-23.
80. Ehrlich HJ, Muller M, Oh HM, Tambyah PA, Joukhadar C, Montomoli E, et al. A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture. *N Engl J Med*. 2008;358:2573-84.
81. Furuya Y, Chan J, Regner M, Lobigs M, Koskinen A, Kok T, et al. Cytotoxic T cells are the predominant players providing cross-protective immunity induced by gamma-irradiated influenza A viruses. *J Virol*. 2010;84(9):4212-21.
82. Castillo F, Galli G, Del Giudice G, Rappuoli R. Generating memory with vaccination. *Eur J Immunol*. 2009;39:2100-5.
83. Rimmelzwaan GF, Fouchier RaM, Osterhaus ADME. Influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes: a correlate of protection and a basis for vaccine development. *Curr Opin Biotechnol*. 2007;18:529-36.
84. Belshe RB, Edwards KM, Vesikari T, Black SV, Walker RE, Hultquist M, et al. Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children. *N Engl J Med*. 2007;356:685-96.
85. He X-S, Holmes TH, Zhang C, Mahmood K, Kemble GW, Lewis DB, et al. Cellular immune responses in children and adults receiving inactivated or live attenuated influenza vaccines. *J Virol*. 2006;80(23):11756-66.
86. Kobinger GP, Meunier I, Patel A, Pillet S, Gren J, Stebner S, et al. Assessment of the efficacy of commercially available and candidate vaccines against a pandemic H1N1 2009 virus. *J Infect Dis*. 2010;201:1000-6.
87. He X-S, Holmes TH, Mahmood K, Kemble GW, Dekker CL, Arvin AM, et al. Phenotypic changes in influenza-specific CD8⁺ T cells after immunization of children and adults with influenza vaccines. *J Infect Dis*. 2008;197:803-11.
88. Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol*. 2010;11(5):404-10.

89. Thomas PG, Dash P, Aldridge JR, Ellebedy AH, Reynolds C, Funk AJ, et al. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. *Immunity*. 2009;30(4):566-75.
90. Moss RB. Prospects for control of emerging infectious diseases with plasmid DNA vaccines. *J Immune Based Ther Vaccines* [Publication en série sur Internet]. 2009; 7(3): <http://www.jibtherapies.com/content/7/1/3>.
91. Smith LR, Wloch MK, Ye M, Reyes LR, Boutsaboualoy S, Dunne CE, et al. Phase 1 clinical trials of the safety and immunogenicity of adjuvanted plasmid DNA vaccines encoding influenza A virus H5 hemagglutinin. *Vaccine*. 2010;28:2565–72.
92. Hoare M, Levy MS, Bracewell DG, Doig SD, Kong S, Titchener-Hooker N, et al. Bioprocess engineering issues that would be faced in producing a DNA vaccine at up to 100 m³ fermentation scale for an influenza pandemic. *Biotechnol Prog*. 2005;21:1577-92.
93. Coban C, Koyama S, Takeshita F, Akira S, Ishii KJ. Molecular and cellular mechanisms of DNA vaccines. *Hum Vaccin*. 2008;4(6):453-6.
94. Jones S, Evans K, McElwaine-Johnn H, Sharpe M, Oxford J, Lambkin-Williams R, et al. DNA vaccination protects against an influenza challenge in a double-blind randomised placebo-controlled phase 1b clinical trial. *Vaccine*. 2009;27:2506-12.
95. Epstein SL, Tumpey TM, Mispion JA, Lo CY, Cooper LA, Subbarao K, et al. DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:796-801.
96. Price GE, Soboleski MR, Lo C-Y, Mispion JA, Pappas C, Houser KV, et al. Vaccination focusing immunity on conserved antigens protects mice and ferrets against virulent H1N1 and H5N1 influenza A viruses. *Vaccine*. 2009;27:6512-21.
97. Zhirnov OP, Isaeva EI, Konakova TE, Thoidis G, Piskareva LM, Akopova II, et al. Protection against mouse and avian influenza A strains via vaccination with a combination of conserved proteins NP, M1 and NS1. *Influenza Other Respi Viruses*. 2007;1:71-9.
98. Okuda K, Ihata A, Watabe S, Okada E, Yamakawa T, Hamajima K, et al. Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene. *Vaccine*. 2001;19:3681-91.
99. Pushko P, Tumpey TM, Hoeven Nv, Belser JA, Robinson R, Nathan M, et al. Evaluation of influenza virus-like particles and novasomes adjuvant as candidate for avian influenza. *Vaccine*. 2007;25:4283-90.
100. Quan F-S, Huang C, Compans RW, Kang S-M. Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus. *J Virol*. 2007;81(7):3514-24.
101. Ekiert D, Bahbha G, Elsliger M, Friesen R, Jongeneelen M, Throsby M, et al. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science*. 2009;324(5924):246-51.

102. Sui J, Hwang WC, Perez S, Wei G, Aird D, Chen L-m, et al. Structural and Functional Bases for Broad-Spectrum Neutralization of Avian and Human Influenza A Viruses. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(3):265-73.
103. Burioni R, Canducci F, Mancini N, Clementi N, Monica Sassi, Marco DD, et al. Monoclonal antibodies isolated from human B cells neutralize a broad range of H1 subtype influenza A viruses including swine-origin Influenza virus (S-OIV). *Virology.* 2009;399:144-52.
104. Johansson BE, Brett IC. Changing perspective on immunization against influenza. *Vaccine.* 2007;25:3062-5.
105. Nayak B, Kumar S, DiNapoli JM, Paldurai A, Perez DR, Collins PL, et al. Contributions of the avian influenza virus HA, NA, and M2 surface proteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. *J Virol.* 2010;84(5):2408-20.
106. Schotsaert M, Filette MD, Fiers W, Saelens X. Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments. *Expert Rev Vaccines.* 2009;8(4):499-508.
107. Essen MRv, Kongsbak M, Schjerling P, Olgaard K, Ødum N, Geisler C. Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells. *Nat Immunol.* 2010;11(4):344-9.
108. García J, Sovero M, Torres AL, Gomez J, Douce R, Barrantes M, et al. Antiviral Resistance in Influenza Viruses Circulating in Central and South America Based on the Detection of Established Genetic Markers. *Influenza Other Respi Viruses.* 2009;3(2):69-74.
109. Reece PA. Neuraminidase Inhibitor Resistance in Influenza Viruses. 2007;1586:1577-86.
110. Organisation mondiale de la santé. WHO/ECDC frequently asked questions for Oseltamivir Resistance. 2008 [consulté le 26 juin 2010]; http://www.who.int/csr/disease/influenza/oseltamivir_faqs/en/.
111. Organisation mondiale de la santé. Pandemic (H1N1) 2009: antiviral drug resistance. 2009 [consulté le 25 juin 2010]; http://www.who.int/csr/disease/swineflu/frequently_asked_questions/antivirals/resistance/en/index.html.
112. Brown LE, Kelso A. Prospects for an influenza vaccine that induces cross-protective cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Cell Biol.* 2009;87:300-8.
113. Seo SH, Webster RG. Cross-reactive, cell-mediated immunity and protection of chickens from lethal H5N1 influenza virus infection in Hong Kong poultry markets. *J Virol.* 2001;75(25):2516-25.
114. Yetter RA, Barber WH, Small PAJ. Heterosubtypic immunity to influenza in ferrets. *Infect Immun.* 1980;29:650-3.
115. Heinen PP, Boer-Luijze EAd, Bianchi ATJ. Respiratory and systemic humoral and cellular immune responses of pigs to a heterosubtypic influenza A virus infection. *J Gen Virol.* 2001;82:2697-707.

116. Stambas J, Guillonneau C, Kedzierska K, Mintern JD, Doherty PC, Gruta NLL. Killer T cells in influenza. *Pharmacol Ther.* 2008;120:186-96.
117. Thomas PG, Keating R, Hulse-Post DJ, Doherty PC. Cell-mediated protection in influenza infection. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:48-54.
118. Christensen JP, Doherty PC, Branum KC, Riberdy JM. Profound protection against respiratory challenge with a lethal H7N7 influenza A virus by increasing the magnitude of CD8⁺ T-cell memory. *J Virol.* 2000;74:11690-6.
119. McLaren C, Butchko GM. Regional T- and B-cell responses in influenza-infected ferrets. *Infect Immun.* 1978;22(1):189-94.
120. Lalor PA, Webby RJ, Morrow J, Rusalov D, Kaslow DC, Rolland A, et al. Plasmid DNA-Based Vaccines Protect Mice and Ferrets against Lethal Challenge with A/Vietnam/1203/04 (H5N1) Influenza Virus. *J Infect Dis.* 2008 June 15, 2008;197(12):1643-52.
121. McMichael A, Gotch F, Noble G, Beare P. Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *N Engl J Med.* 1983;309:13-7.
122. Epstein SL. Prior H1N1 influenza infection and susceptibility of Cleveland family study participants during the H2N2 pandemic of 1957: an experiment of nature. *J Infect Dis.* 2006;193:49-53.
123. Lee LY-h, Lien D, Ha A, Simmons C, Jong MDD, Chau NVV, et al. Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals. *J Clin Invest.* 2008;118(10):3478-90.
124. Kreijtz JH, Mutsert GD, Baalen CAV, Fouchier RA, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF. Cross-recognition of avian H5N1 influenza virus by human cytotoxic T lymphocyte populations directed to human influenza A virus. *J Virol.* 2008;82:5161-6.
125. Jameson J, Cruz J, Terajima M, Ennis FA. Human CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocyte memory to influenza A viruses of swine and avian species. *J Immunol.* 1999;162:7578-83.
126. Bui H-H, Peters B, Assarsson E, Mbawuikie I, Sette A. Ab and T cell epitopes of influenza A virus, knowledge and opportunities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:246-51.
127. Assarsson E, Bui H-H, Sidney J, Zhang Q, Glenn J, Oseroff C, et al. Immunomic Analysis of the Repertoire of T-Cell Specificities for Influenza A Virus in Humans *J Virol.* 2008;82(24):12241-51.
128. Babon JAB, Cruz J, Orphin L, Pazoles P, Co MDT, Ennis FA, et al. Genome-wide screening of human T-cell epitopes in influenza A virus reveals a broad spectrum of CD4 T-cell responses to internal proteins, hemagglutinins, and neuraminidases. *Hum Immunol.* 2009;70:711-21.
129. Roti M, Yang J, Berger D, Huston L, James EA, Kwok WW. Healthy human subjects have CD4⁺ T cells directed against H5N1 influenza virus. *J Immunol.* 2008;180(3):1758-68.

130. Greenbaum Ja, Kotturi MF, Kim Y, Oseroff C, Vaughan K, Salimi N, et al. Pre-existing immunity against swine-origin H1N1 influenza viruses in the general human population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:20365-70.
131. Heiny aT, Miotto O, Srinivasan KN, Khan AM, Zhang GL, Brusica V, et al. Evolutionarily conserved protein sequences of influenza A viruses, avian and human, as vaccine targets. *PLoS One*. 2007;2:e1190.
132. McElhaney JE, Xie D, Hager WD, Barry MB, Wang Y, Kleppinger A, et al. T Cell responses are better correlates of vaccine protection in the elderly. *J Immunol*. 2006;176:6333-9.
133. Deng Y, Jing Y, Campbell AE, Gravenstein S. Age-related impaired type 1 T cell responses to influenza: reduced activation ex vivo, decreased expansion in CTL culture in vitro, and blunted response to influenza vaccination in vivo in the elderly. *J Immunol*. 2004;172:3437-46.
134. Sridharan A, Esposito M, Kaushal K, Tay J, Osann K, Agrawal S, et al. Age-associated impaired plasmacytoid dendritic cell functions lead to decreased CD4 and CD8 T cell immunity. *Age*. 2010:Publication électronique avant impression.
135. McMichael AJ, Gotch FM, Dongworth DW, Clark A, Potter CW. Declining T-cell immunity to influenza, 1977-1982. *Lancet*. 1983;2:762-4.
136. Hikono H, Kohlmeier JE, Ely KH, Scott I, Roberts AD, Blackman MA, et al. T-cell memory and recall responses to respiratory virus infections. *Immunol Rev*. 2006;211:119-32.
137. Reeth Kv, Braeckmans D, Cox E, Borm Sv, Berg Tvd, Goddeeris B, et al. Prior infection with an H1N1 swine influenza virus partially protects pigs against a low pathogenic H5N1 avian influenza virus. *Vaccine*. 2009;27:6330-9.
138. Powell TJ, Strutt T, Reome J, Hollenbaugh JA, Roberts AD, Woodland DL, et al. Priming with cold-adapted influenza A does not prevent infection but elicits long-lived protection against supralethal challenge with heterosubtypic virus. *J Immunol*. 2007;178:1030-8.
139. Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:247-58.
140. Boon ACM, de Mutsert G, Graus YMF, Fouchier RAM, Sintnicolaas K, Osterhaus ADME, et al. The magnitude and specificity of influenza A virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in humans is related to HLA-A and -B phenotype. *J Virol*. 2002;76(2):582-90.
141. Miller JD, van der Most RG, Akondy RS, Glidewell JT, Albott S, Masopust D, et al. Human effector and memory CD8⁺ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity*. 2008;28:710-22.
142. Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H, et al. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8⁺ T cell response. *J Immunol*. 2009;183:7919-30.

143. Arlettaz L, Barbey C, Dumont-Girard F, Helg C, Chapuis B, Roux E, et al. CD45 isoform phenotypes of human T cells: CD4⁺CD45RA⁻RO⁺ memory T cells re-acquire CD45RA without losing CD45RO. *Eur J Immunol.* 1999;29:3987-94.
144. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of Naive and Memory T Cells. *Immunity.* 2008;29(6):848-62.
145. van Leeuwen EMM, De Bree GJ, Remmerswaal EBM, Yong S-L, Tesselaar K, ten Berge IJM, et al. IL-7 receptor α chain expression distinguishes functional subsets of virus-specific human CD8⁺ T cells. *Blood.* 2005;106(6):2091-8.
146. Kohlmeier JE, Miller SC, Smith J, Lu B, Gerard C, Cookenham T, et al. The chemokine receptor CCR5 plays a key role in the early memory CD8⁺ T cell response to respiratory virus infections. *Immunity.* 2008;29:101-13.
147. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol.* [10.1038/nri1246]. 2003;3(12):984-93.
148. Lepage S, Lapointe R. Melanosomal targeting sequences from gp100 are essential for MHC class II-restricted endogenous epitope presentation and mobilization to endosomal compartments. *Cancer Res.* 2006;66:2423-32.
149. Taylor GS, Long HM, Haigh TA, Larsen M, Brooks J, Rickinson AB. A Role for Intercellular Antigen Transfer in the Recognition of EBV-Transformed B Cell Lines by EBV Nuclear Antigen-Specific CD4⁺ T Cells. *The Journal of Immunology.* 2006 September 15, 2006;177(6):3746-56.
150. Harty JT, Badovinac VP. Shaping and reshaping CD8⁺ T-cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:107-19.
151. Belz GT, Masson F. Interleukin-2 tickles T cell memory. *Immunity.* 2010;32:7-9.
152. Surh CD, Boyman O, Purton JF, Sprent J. Homeostasis of memory T cells. *Immunol Rev.* 2006;211:154-63.
153. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2001;13(1):114-9.
154. Ranheim EA, Kipps TJ. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *The Journal of Experimental Medicine.* 1993 April 1, 1993;177(4):925-35.
155. Li J, Liu Z, Jiang S, Cortesini R, Lederman S, Suci-Foca N. T Suppressor lymphocytes inhibit NF- κ B-mediated transcription of CD86 gene in APC. *The Journal of Immunology.* 1999 December 15, 1999;163(12):6386-92.
156. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *The Journal of Immunology.* 2009 November 15, 2009;183(10):6186-97.
157. Garçon N, Chomez P, Van Mechelen M. GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert Rev Vaccines.* 2007;6(5):723-39.

158. Swain SL, Agrewala JN, Brown DM, Jelley-Gibbs DM, Golech S, Huston G, et al. CD4⁺ T-cell memory: generation and multi-faceted roles for CD4⁺ T cells in protective immunity to influenza. *Immunol Rev.* 2006;211:8-22.
159. Galli G, Medini D, Borgogni E, Zedda L, Bardelli M, Malzone C, et al. Adjuvanted H5N1 vaccine induces early CD4⁺ T cell response that predicts long-term persistence of protective antibody levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:3877-82.
160. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature.* 2003;421:852-6.
161. Tanchot C, Rocha B. CD8 and B cell memory: same strategy, same signals. *Nat Immunol.* 2003;4:431-2.
162. Kalams SA, Walker BD. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med.* 1998;188(12):2199-204.
163. Nakanishi Y, Lu B, Gerard C, Iwasaki A. CD8⁺ T lymphocyte mobilization to virus-Infected tissue requires CD4⁺ T-cell help. *Nature.* 2009;462(7272):510-3.
164. Ryu SJ, Jung KM, Yoo HS, Kim TW, Kim S, Chang J, et al. Cognate CD4 help is essential for the reactivation and expansion of CD8 memory T cells directed against the hematopoietic cell-specific dominant minor histocompatibility antigen, H60. *Blood.* 2009 April 30, 2009;113(18):4273-80.
165. Ford ML, Wagener ME, Hanna SS, Pearson TC, Kirk AD, Larsen CP. A Critical Precursor Frequency of Donor-Reactive CD4⁺ T Cell Help Is Required for CD8⁺ T Cell-Mediated CD28/CD154-Independent Rejection. *The Journal of Immunology.* 2008 June 1, 2008;180(11):7203-11.
166. Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C. A role for CD40 expression on CD8⁺ T cells in the generation of CD8⁺ T cell memory. *Science.* 2002;297:2060-3.
167. Marzo AL, Vezys V, Klonowski KD, Lee S-J, Muralimohan G, Moore M, et al. Fully functional memory CD8 T Cells in the absence of CD4 T cells. *The Journal of Immunology.* 2004 July 15, 2004;173(2):969-75.
168. Ramsburg EA, Publicover JM, Coppock D, Rose JK. Requirement for CD4 T cell help in maintenance of memory CD8 T cell responses is epitope dependent. *The Journal of Immunology.* 2007 May 15, 2007;178(10):6350-8.
169. Lee BO, Hartson L, Randall TD. CD40-deficient, Influenza-specific CD8 memory T cells develop and function normally in a CD40-sufficient environment. *The Journal of Experimental Medicine.* 2003 December 1, 2003;198(11):1759-64.
170. Epstein SL, Stack A, Mispion JA, Lo C-Y, Mostowski H, Bennink J, et al. Vaccination with DNA encoding internal proteins of influenza virus does not require CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes: either CD4⁺ or CD8⁺ T cells can promote survival and recovery after challenge. *Int Immunol.* 2000 January 1, 2000;12(1):91-101.
171. Cusick MF, Wang S, Eckels DD. In vitro responses to avian influenza H5 by human CD4 T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2009;183:6432-41.

172. Duvvuri VR, Moghadas S, Guo H, Duvvuri B, Heffernan JM, Fisman DN, et al. Highly conserved cross-reactive CD4⁺ T-cell HA-epitopes of seasonal and the 2009 pandemic influenza viruses. *Influenza Other Respi Viruses*. 2010;4(5):249-58.
173. Ge X, Tan V, Bollyky PL, Standifer NE, James EA, Kwok WW. Assessment of Seasonal influenza A virus-specific CD4 T-cell responses to 2009 pandemic H1N1 swine-origin influenza A virus. *J Virol*. 2010 April 1, 2010;84(7):3312-9.
174. He X-S, Holmes TH, Sasaki S, Jaimes MC, Kemble GW, Dekker CL, et al. Baseline levels of influenza-specific CD4 memory T-cells affect T-cell responses to influenza vaccines. *PLoS One*. 2008;3:e2574.
175. Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol*. [10.1038/nri2103]. 2007;7(7):543-55.
176. Niazi KR, Ochoa M-T, Sieling Pa, Rooke NE, Peter AK, Mollahan P, et al. Activation of human CD4⁺ T cells by targeting MHC class II epitopes to endosomal compartments using human CD1 tail sequences. *Immunology*. 2007;122:522-31.
177. Wang R-F. Identification of MHC class II-restricted tumor antigens recognized by CD4⁺ T cells. *Methods*. 2003;29:227-35.
178. Jaraquemada D, Marti M, Long EO. An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J Exp Med*. 1990;172:947-54.
179. Nuchtern JG, Biddison WE, Klausner RD. Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature*. 1990;343:74-6.
180. Mueller SN, Langley WA, Carnero E, Garcia-Sastre A, Ahmed R. Immunization with live attenuated influenza viruses that express altered NS1 proteins results in potent and protective memory CD8⁺ T-cell responses. *J Virol*. 2010;84(4):1847-55.
181. Kim JH, Jacob J. DNA vaccines against influenza viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;333:197-210.
182. Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res*. 2003;63:2836-43.
183. Schultze JL, Michalak S, Seamon MJ, Dranoff G, Jung K, Daley J, et al. CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest*. 1997;100:2757-65.
184. Ahmadi T, Flies A, Efebera Y, Sherr DH. CD40 Ligand-activated, antigen-specific B cells are comparable to mature dendritic cells in presenting protein antigens and major histocompatibility complex class I- and class II-binding peptides. *Immunology*. 2008;124:129-40.
185. Romero P, Zippelius A, Kurth I, Pittet MJ, Touvrey C, Iancu EM, et al. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol*. 2007;178:4112-9.

186. Qian J, Xie J, Hong S, Yang J, Zhang L, Han X, et al. Dickkopf-1 (DKK1) is a widely expressed and potent tumor-associated antigen in multiple myeloma. *Blood*. 2007;110(5):1587-94.
187. Ahlers JD, Belyakov IM. Memories that last forever: strategies for optimizing vaccine T-cell memory. *Blood*. 2010;115(9):1678-89.
188. Barker BR, Gladstone MN, Gillard GO, Panas MW, Letvin NL. Critical role for IL-21 in both primary and memory anti-viral CD8+ T-cell responses. *Eur J Immunol*. 2010;40(11):3085-96.
189. Arens R, Schoenberger SP. Plasticity in programming of effector and memory CD8+ T-cell formation. *Immunol Rev*. 2010;235(1):190-205.
190. Oh S, Perera LP, Terabe M, Ni L, Waldmann TA, Berzofsky JA. IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008 April 1, 2008;105(13):5201-6.
191. Shen C-H, Ge Q, Talay O, Eisen HN, García-Sastre A, Chen J. Loss of IL-7R and IL-15R expression is associated with disappearance of memory T cells in respiratory tract following influenza infection. *J Immunol*. 2008;180:171-8.
192. Kim HR, Hwang KA, Park SH, Kang I. IL-7 and IL-15: biology and roles in T-Cell immunity in health and disease. *Crit Rev Immunol*. 2008;28(4):325-39.
193. Stanekova Z, Vareckova E. Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. *Virology*. 2010;7(1):351.
194. Crowe SR, Turner SJ, Miller SC, Roberts AD, Rappolo RA, Doherty PC, et al. Differential antigen presentation regulates the changing patterns of CD8+ T cell immunodominance in primary and secondary influenza virus infections. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003 August 4, 2003;198(3):399-410.
195. Thomas PG, Brown SA, Keating R, Yue W, Morris MY, So J, et al. Hidden epitopes emerge in secondary influenza virus-specific CD8+ T cell responses. *The Journal of Immunology*. 2007 March 1, 2007;178(5):3091-8.
196. Chen W, Antón LC, Bennink JR, Yewdell JW. Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity*. 2000;12:83-93.
197. Weaver JM, Lazarski Ca, Richards Ka, Chaves Fa, Jenks Sa, Menges PR, et al. Immunodominance of CD4 T cells to foreign antigens is peptide intrinsic and independent of molecular context: implications for vaccine design. *J Immunol*. 2008;181:3039-48.
198. Katze MG, He Y, Gale MJ. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(9):675-87.
199. Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J, Murali-Krishna K. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med*. 2005;202(5):637-50.

200. Mueller SN, Langley Wa, Carnero E, García-Sastre A, Ahmed R. Immunization with live-attenuated influenza viruses expressing altered NS1 proteins results in potent and protective memory CD8⁺ T cells responses. *J Virol.* 2009;84(4):1847-55.
201. Sun J, Madan R, Karp CL, Braciale TJ. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med.* 2009;15:277-84.
202. Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H, et al. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8⁺ T cell response. *J Immunol.* 2009;183:7919-30.
203. Boettler T, Panther E, Bengsch B, Nazarova N, Spangenberg HC, Blum HE, et al. Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8⁺ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol.* 2006;80(7):3532-40.
204. Nikolich-Zugich J. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:512-22.
205. von Bergwelt-Baildon M, Schultze JL. Correspondence re R. Lapointe et al., CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res* 2003;63:2836-43. *Cancer Res.* 2004;64:4055-7.
206. Bullido R, Gómez-Puertas P, Albo C, Portela a. Several protein regions contribute to determine the nuclear and cytoplasmic localization of the influenza A virus nucleoprotein. *The Journal of general virology.* 2000;81:135-42.
207. Sato Y. Localization of influenza virus proteins to nuclear dot 10 structures in influenza virus-infected cells. *Virology.* 2003;310:29-40.
208. Guéguen M, Long EO. Presentation of a cytosolic antigen by major histocompatibility complex class II molecules requires a long-lived form of the antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(25):14692-7.
209. Schmid D, Münz C. Immune surveillance of intracellular pathogens via autophagy. *Cell Death Differ.* 2005;12:1519-27.
210. Schmid D, Pypaert M, Münz C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity.* 2007;26:79-92.
211. Münz C. Enhancing immunity through autophagy. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:423-49.
212. Zhou Z, Jiang X, Liu D, Fan Z, Hu X, Yan J, et al. Autophagy is involved in influenza A virus replication. *Autophagy.* 2009;5(3):321-8.
213. Marjuki H, Alam MI, Ehrhardt C, Wagner R, Planz O, Klenk H-D, et al. Membrane accumulation of influenza A virus hemagglutinin triggers nuclear export of the viral genome via protein kinase C α -mediated activation of ERK signaling. *J Biol Chem.* 2006;281(24):16707-15.

214. O'Neill RE, Talon J, Palese P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J*. 1998;17(1):288-96.
215. de la Luna S, Fortes P, Beloso A, Ortin J. Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J Virol*. 1995;69(4):2427-33.
216. Testa J, Apcher G, Eisenlohr L. Exosome-mediated MHCII cross-presentation substantially enhanced by the receptor binding activity of influenza hemagglutinin. *J Immunol*. 2010;184.
217. Steel J, Lowen AC, Pena L, Angel M, Solórzano A, Albrecht R, et al. Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *J Virol*. 2009;83(4):1742-53.
218. Kim JH, Skountzou I, Compans R, Jacob J. Original Antigenic Sin Responses to Influenza Viruses. *J Immunol*. 2009;183:3294-301.
219. Keynan Y, Card CM, Ball BT, Li Y, Plummer FA, Fowke KR. Cellular immune responses to recurring influenza strains have limited boosting ability and limited cross reactivity to other strains. *Clin Microbiol Infect* [Publication en série sur Internet]. 2009: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/123226003/PDFSTART>.
220. McElhaney JE, Hooton JW, Hooton N, Bleackley RC. Comparison of single versus booster dose of influenza vaccination on humoral and cellular immune responses in older adults *Vaccine*. 2005;23(25):3294-300.
221. Touvrey C, Derré L, Devevre E, Corthesy P, Romero P, Rufer N, et al. Dominant human CD8 T cell clonotypes persist simultaneously as memory and effector cells in memory phase. *J Immunol*. 2009;182:6718-26.
222. Ely KH, Ahmed M, Kohlmeier JE, Roberts AD, Wittmer ST, Blackman MA, et al. Antigen-specific CD8⁺ T cell clonal expansions develop from memory T cell pools established by acute respiratory virus infections. *J Immunol*. 2007;179:3535-42.
223. Bednarek MA, Sauma SY, Gammon MC, Porter G, Tamhankar S, Williamson AR, et al. The minimum peptide epitope from the influenza virus matrix protein. Extra and intracellular loading of HLA-A2. *J Immunol*. 1991;147:4047-53.
224. Ellis JM, Henson V, Slack R, Ng J, Hartzman RJ, Hurley CK. Frequencies of HLA-A2 alleles in five U.S. population groups: Predominance of A*02011 and identification of HLA-A*0231 *Hum Immunol*. 2000;61(3):334-40.
225. Berkhoff EGM, de Wit E, Geelhoed-Mieras MM, Boon ACM, Symons J, Fouchier RAM, et al. Fitness costs limit escape from cytotoxic T lymphocytes by influenza A viruses. *Vaccine*. 2006;24:6594-6.
226. Ji Q, Perchellet A, Goverman JM. Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8⁺ T cells expressing dual TCRs. *Nat Immunol*. 2010;11:628-34.
227. Yang J, James EA, Huston L, Danke NA, Liu AW, Kwok WW. Multiplex mapping of CD4 T cell epitopes using class II tetramers. *Clin Immunol*. 2006;120:21-32.

228. Faner R, James E, Huston L, Pujol-Borrel R, Kwok WW, Juan M. Reassessing the role of HLA-DRB3 T-cell responses: Evidence for significant expression and complementary antigen presentation. *Eur J Immunol.* 2010;40:91-102.

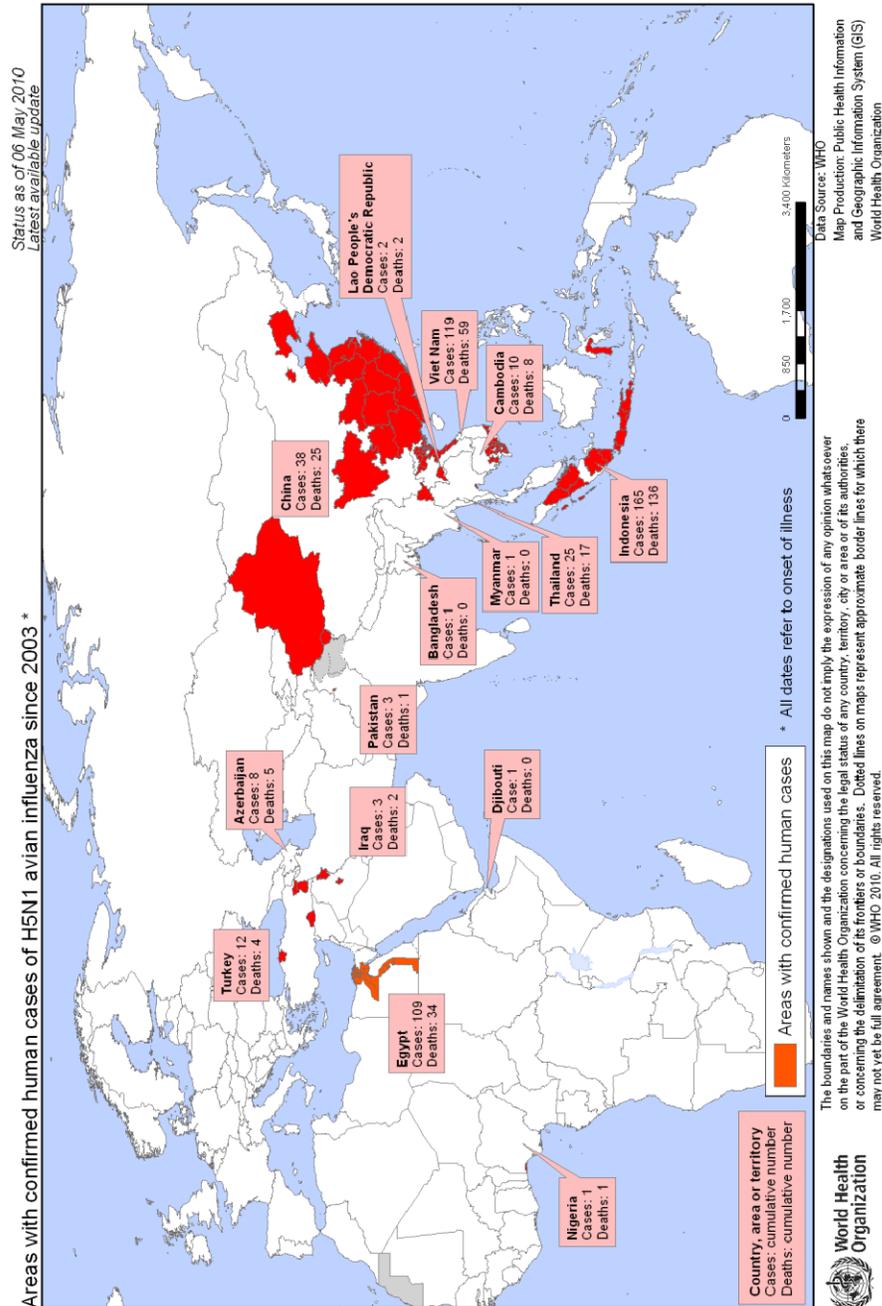
Annexe 1. Fonction des composantes du virus de l'influenza et leurs rôles dans la pathogenèse des virus H5N1 aviaire et pandémique H1N1 de 1918.

Adaptée de Korteweg et al, AJP, 2008; Bouvier et al, Vaccine, 2008 et Basler et al, Antiviral research, 2008.

Segment d'ARN du virus	Protéine virale	Fonctions	Role dans la pathogénicité de H5N1 chez les mammifères	Role dans la pathogénicité de H1N1/1918 chez les mammifères
1	PB2	Sous-unité de l'ARN polymérase ARN dépendante, reconnaissance de la coiffe.	PB2 : K627 augmente répllication virale dans voies respiratoires supérieures et pathogénicité.	
2	PB1	Sous-unité de l'ARN polymérase ARN dépendante, élongation de l'ARNm. Endonucléase.		Augmente la virulence et la vitesse de transcription
	PB1-F2	Activité pro-apoptotique.	PB1-F2 : S66 augmente la virulence.	Peut augmenter la virulence (hôte dépendant).
3	PA	Sous-unité de l'ARN polymérase ARN dépendante, activité protéolytique.		
4	HA	Récepteur (acides sialiques). Fusion membranaire. Cible majeure des anticorps neutralisants.	Acides aminés basiques du site de clivage augmente virulence. H5 supprime expression perforin par CTLs.	Acides aminés basiques du site de clivage. Augmente virulence. Double spécificité virus aviaire et humain
5	NP	Régulation de l'import nucléaire. Lie l'ARN.		
6	NA	Relargage virion (sialidase). Cible mineure des anticorps neutralisants	H274Y confère resistance à oseltamivir.	Augmente la virulence.
7	M1	Assemblage du virus. Composante principale du virion. Lie les RNPv.		
	M2	Canal à proton pH dépendant. « uncoating » viral et synthèse de HA	S31N résistance à amantadine	
8	NS1	Apprêtement ARNm, antagoniste IFN type 1	E92 confère résistance au TNF et interférons. Motifs EPEV et ESEV en C-ter interfère avec voies de signalisation. Contribution à la tempête de cytokines/chemokines.	Meilleure suppression des interférons de type I
	NS2	Export nucléaire des RNPv		

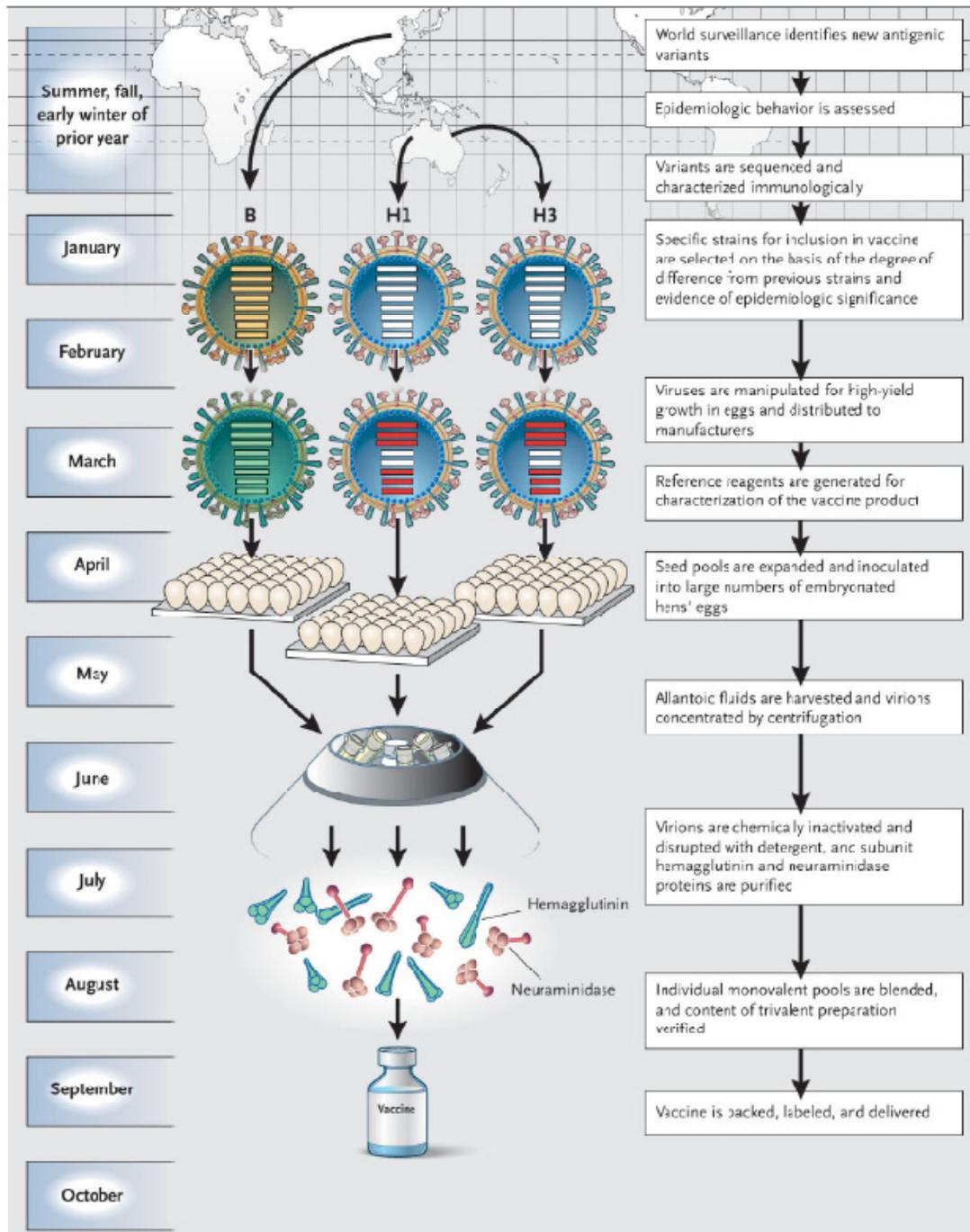
Annexe 2. Provenance des différents cas confirmés d'infection humaine par le virus H5N1 aviaire.

Tiré du site web de l'OMS, http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/.



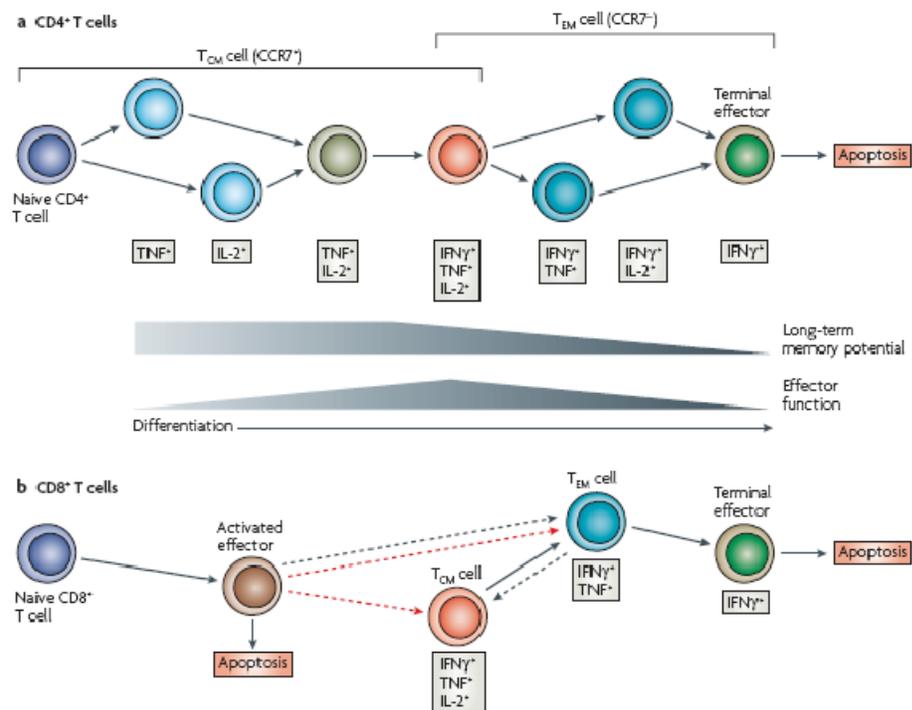
Annexe 3. Schéma de la production d'un vaccin contre l'influenza à sous-unités inactivé.

Adapté de Treanor, New England Journal of Medicine, 2004.



Annexe 4. Un des modèles actuels de la polyfonctionnalité des lymphocytes T mémoires pendant leur processus de différenciation.

a) $CD4^+$ et (b) $CD8^+$. Le marqueur CD62L peut également être utilisé à la place du marqueur CCR7 pour catégoriser les lymphocytes T mémoires en T_{cm} (+) ou T_{em} (-). Tiré de Seder *et al*, *Nature reviews immunology*, 2008. (c) Expression de certains marqueurs en fonction du stade de développement d'un lymphocyte T mémoire. (*) Certains sous-types de lymphocytes T mémoires n'expriment pas CD127. Adapté de Ahlers, *Blood*, 2010 et Klebanoff, *Immunological Reviews*, 2006.



c	Stade de différenciation du lymphocyte T		
	Naïf	Effecteur	Mémoire
Marqueurs de surface			
CD45RA	+	-	- → +
CD45RO	-	+	+ → -
CD127	+	-	+*

Annexe 5. Brief Communication: Identification of T cell epitopes by a novel mRNA
PCR-based epitope chase technique

Authors: Jean-Daniel Doucet, Dominique Gauchat and Réjean Lapointe*

Affiliation: Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) – Hôpital Notre-Dame, Université de Montréal and Institut du Cancer de Montréal (ICM), Montréal, Québec, Canada

***Corresponding author:** Réjean Lapointe, CRCHUM – Hôpital Notre-Dame, Pavillon J.A. DeSève, Room Y-5605, 2099 rue Alexandre DeSève, Montréal, Québec, Canada H2L 2W5; Telephone: (514) 890-8000 #25489 (office), 25504 (laboratory); Fax: (514) 412-7591

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

Contribution de l'étudiant: Toutes les expériences et la rédaction de l'article ont été réalisées par Jean-Daniel Doucet. Dominique Gauchat a contribué à l'élaboration des expériences et à l'analyse des résultats.

Article accepté dans *Journal of Immunotherapy*

Summary

The identification of specific viral and tumor antigen T cell epitopes remains a challenge. Indeed, epitope mapping methods are generally costly and time-consuming. Thus, few techniques allow for efficient CD4⁺ T lymphocyte epitope identification. Here, we introduce a novel polymerase chain reaction (PCR)-based mRNA epitope identification method, called mPEC, to rapidly and precisely identify relevant T cell epitopes recognized by CD8⁺ or CD4⁺ T lymphocytes. This method is based on the use of mRNA fragments synthesized from PCR-amplified cDNA with a choice of 3' end deletions. mRNA fragments are electroporated into autologous antigen-presenting cells to deduce an epitope's localization in a given protein antigen. Considering mRNA's sensitivity to degradation, we also inserted a defined epitope at the mRNA's 3' end to control for electroporated mRNA's integrity and its capacity to be translated. Using this method, we rapidly and successfully identified the specific epitope of 2 CD8⁺ and 1 CD4⁺ T lymphocyte clones derived from influenza model antigens. Hence, mPEC could be used to identify new, *in vivo*-relevant T cell epitopes for cancer immunotherapy and vaccination in general.

Keywords: Major Histocompatibility Complexes of class I and II, T cell epitope, Epitope mapping

Introduction

There is a clear need in viral¹ and tumor² immunology to find a wide array of antigens which can be targeted by both immune CD8⁺ cytotoxic and CD4⁺ helper T cells recognizing epitopes presented by major histocompatibility complex (MHC) classes I and II. Several approaches have been developed to map isolated T cell peptide epitopes¹. So far, peptide loading technologies (i.e. peptide libraries and recent ultraviolet light-dependent MHC-peptide exchange technologies³), mass spectrometry analysis of peptides bound to MHC molecules⁴ and screening of cDNA libraries⁵ have been successful in identifying many T cell epitopes in different diseases. However, these techniques are often time-consuming and may sometimes not reflect genuine epitopes recognized by specific T lymphocytes.

As an alternative, mRNA fragments have been used to characterize the specificity of previously-isolated T cells⁶. This technique utilizes plasmid DNA templates cleaved at available restriction sites, or at new sites inserted by site-specific mutagenesis, from which mRNA fragments of various lengths are generated. Unfortunately, it employs randomly-distributed restriction sites, and requires a long process of site-specific mutagenesis and subsequent DNA subcloning. In addition, a cell line stably-transfected with a defined human leukocyte antigen (HLA) molecule is exploited as antigen-presenting cells (APCs), limiting epitope identification to one single MHC class I allele.

We have, therefore, developed a technique we called mRNA PCR-based epitope chase (mPEC) to rapidly and specifically identify MHC class I or II epitopes from a given antigen recognized by previously-isolated antigen-specific CD8⁺ or CD4⁺ T lymphocytes.

Materials and methods

PBMCs were obtained as described previously⁷ from a healthy individual after informed consent. B lymphocytes immortalized by Epstein-Barr virus (EBV-B) and CD40-activated B (CD40-B) cells were generated as described previously⁸.

NP and M1 matrix proteins from influenza virus A/Puerto Rico/8/1934/H1N1 strain (uniprot # P03466 (NP) and P03485 (M1)) cDNA sequences were optimized for improved expression with GeneOptimizer[©] from Genart (Regensburg, Germany) and cloned into pcDNA3.1(+) plasmid (Invitrogen, Carlsbad, California). Plasmids were transformed into

E. coli One Shot[®] TOP 10 competent cells (Invitrogen) and prepared by plasmid Megaprep kit (Qiagen, Hilden, Germany).

EBV-B or CD40-B cells were sedimented for 15 min at 100 g, resuspended in resuspension buffer with $3 \mu\text{g}/10^6$ cells of DNA or mRNA. Cells were electroporated with 1 pulse at 1,700 V for 20 ms using an MP-100 microporator (Digital-bio, Seoul, Republic of Korea) and resuspended in RPMI 1640 (EBV-B) or Iscove's modified Dulbecco's complete (CD40-B) medium containing 10 % of FBS and 2 mM L-glutamine (all from Wisent, St-Bruno, Canada), without antibiotics.

Antigen-specific bulk T cells from PBMCs stimulated with autologous CD40-B cells electroporated with M1 or NP DNA plasmids were cloned by limiting dilution and cultured as previously described⁸.

The gp100-specific CD8⁺ (g209) T cell clone, kindly provided by Dr. Mark Dudley (NCI; NIH, Bethesda, MD), is specific to native and optimized versions of the gp100 HLA-A*0201-restricted epitope (209-218; ITDQVPFSV and IMDQVPFSV) The latter was used throughout this article and named gp100^{209-218/2M} or g209.

M1, NP or mock (dickkopf homolog 1 (DKK1)) protein cDNA fragments were amplified by standard PCR from pcDNA3.1(+)-M1, -NP or -mock (DKK1) with high-fidelity platinum[®] Pfx DNA polymerase (Invitrogen). The primer sets (Integrated DNA technologies, Coralville, Iowa) are listed in Supplementary Table 1, Supplemental digital content 1. Nucleotide sequences of the M1⁵⁸⁻⁶⁶ epitope and the g209 epitope were added at the 5' end of some of the M1 and NP fragment reverse DNA primers respectively, before a stop codon (Supplementary Table 1, Supplemental digital content 1).

RNA was synthesized *in vitro* as described in Supplementary Methods using the mMessage mMachine[®], poly (A) tailing and MEGAclean[™] kits (Ambion, Austin, Texas).

Synthetic peptides were added to EBV-B cells at a final concentration of 1-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for MHC class I 10-mer peptides (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for longer peptides) (see Supplementary Table 2, Supplemental digital content 1 for sequences) for 3 h at 37°C 5 % CO₂, and then washed once to remove unbound peptides.

T cell clones were washed and cultured for 4 h in Iscove's complete medium supplemented with 120 IU ml⁻¹ of IL-2. Clones' reactivity to MHC-restricted epitopes was tested on the basis of IFN- γ cytokine secretion as described previously⁷.

Results

We generated PCR-amplified cDNA fragments of various lengths with a T7 promoter forward primer localized at the 5' end of the sequence coding for the defined antigen and a matching 3' end reverse primers ending at different sites in the antigen-coding sequence (Supplementary Fig. 1, Supplementary Tables 1-2, Supplemental digital content 1). From these cDNA fragments, we synthesized RNA that we subsequently polyadenylated (Supplementary Fig. 1C, Supplemental digital content 1). We electroporated the resulting mRNA fragments into autologous EBV-B, thereby allowing exact allele product matching. Alternatively, autologous CD40-B lymphocytes can serve as APCs (data not shown).

We then first validated the mPEC method with CD8⁺ T lymphocytes (M1-CD8) specific to a defined model HLA-A*0201 epitope from influenza A virus matrix protein (M1⁵⁸⁻⁶⁶). mRNA covering the full length M1 protein was recognized by M1⁵⁸⁻⁶⁶-specific T cells and successive deletions at the C-terminal end were recognized until the epitope was specifically deleted (Fig. 1, red bars), corresponding, as expected, to M1Δ3.8 fragment. Conversely, the M1Δ3.7 fragment that ends immediately after the epitope sequence was well recognized. This demonstrates the high accuracy potential of the mPEC technique.

Notably, bad quality or degraded mRNA can result in low protein production which could fail to elicit a T cell response and provide a false negative signal. To control mRNA integrity and protein translation after electroporation, we added at the 3' end of mRNAs a sequence coding for a known peptide which can be recognized by available T lymphocytes. For M1 fragments, the glycoprotein (gp)100 HLA-A*0201 epitope was added (gp100²⁰⁹⁻²¹⁸). Gp100-specific T lymphocytes specifically recognized all M1 constructs bearing the gp100²⁰⁹⁻²¹⁸ epitope (Fig. 1, blue bars), confirming the integrity of all M1 mRNA fragments. As negative specificity controls, gp100²⁰⁹⁻²¹⁸-specific T cells did not recognize full M1 mRNA, and M1⁵⁸⁻⁶⁶-specific T cells did not recognize EBV-B cells pulsed with gp100²⁰⁹⁻²¹⁸ peptide.

We also identified 2 unknown MHC class I and II epitopes derived from model influenza targets with CD8⁺ T lymphocytes specific to influenza A nucleoprotein (NP-CD8), and CD4⁺ T lymphocytes specific to M1 (M1-CD4) by mPEC.

As revealed by IFN- γ secretion, the NP-CD8 T cell clone failed to respond to the mRNA fragment NP Δ 4.4 whereas NP Δ 4.3 was well recognized. Similar results were obtained with MIP-1 β secretion (data not shown). The control M1⁵⁸⁻⁶⁶ peptide added at the 3' end of NP mRNAs (Fig. 2A) was recognized by relevant T cells, showing mRNA fragment integrity. This demonstrated that the NP-CD8 epitope was localized in the deletion between fragments NP Δ 4.3 and NP Δ 4.4, corresponding to an 11 amino acid sequence (positions 68 to 78, Fig. 2A). To these 11 residues, we added 8 amino acids from NP Δ 4.4 fragment at the N-terminal end to account for a loss of a potential epitope spanning both NP Δ 4.3 and NP Δ 4.4, and synthesized 6 peptides covering this sequence (Supplementary Table 2, Supplemental digital content 1). The whole 19-mer peptide was well recognized by the NP-CD8 T cell clone. Only the 10-mer peptide 2 was weakly but specifically recognized, indicating that it could contain the NP-CD8-specific epitope but requires additional amino acid trimming (Fig. 2B).

The mPEC identification method is also effective for MHC class II epitopes, as shown by a 10-mer HLA-DR-restricted MHC class II epitope localized between the M1 Δ 2.7 and M1 Δ 3 constructs specifically recognized by the M1-CD4 T cell clone (Fig. 2C, 2D and Supplementary Table 2, Supplemental digital content 1). M1-CD4 T cells also weakly recognized the 15-mer peptide b which could represent an alternative epitope or heterogeneity in the T cell clone.

Discussion

Antigen-specific epitope mapping remains a challenge beyond the grasp of current identification techniques. On the one hand, peptide libraries demand the synthesis and screening of an impressive number of peptides, an expensive and rather tedious process. Bioinformatic predictions⁹ may reduce the number of peptides tested but are still far from being sufficiently accurate. Furthermore, peptide loading approaches do not take into account epitopes coded by alternative reading frames¹⁰ and post-translationally-modified epitopes^{11,12}. These methods may also identify irrelevant cryptic epitopes that are not processed by APCs *in vivo*¹³.

On the other hand, while analysis of peptides bound to MHC molecules by mass spectrometry⁴ is high throughput, the peptides identified may not necessarily reflect genuine epitopes recognized by specific T lymphocytes¹⁴. Moreover, screening of cDNA libraries demands cumbersome DNA subcloning to identify specific epitope localization.

Hence, we have developed a rapid, accurate and adaptable method called mPEC to map and define the specificity of either MHC class I or II epitopes, even though MHC class II epitopes have traditionally lacked effective identification techniques. Accordingly, MHC class II tetramers are hard to synthesize, and there are often too few MHC class II-bound peptides for mass spectrometry analysis.

PCR-amplified cDNA templates for mRNA synthesis allow the precise identification of T cell epitopes. Interestingly, as our technique uses autologous activated B lymphocytes as APCs, it does not require previous knowledge of the MHC restriction element. However, if required, specific epitope MHC restriction elements can be identified by established methods using blocking antibodies and a panel of EBV-B cells from donors of various HLA allelic variants¹⁵. Expression in APCs also allows the identification of T cell epitopes that will most likely be processed *in vivo* in contrast to other epitope identification techniques. Moreover, localization of these epitopes is confirmed by an original expression control through inclusion of a 3'end control epitope to evaluate mRNA electroporation and translation efficiency. Overall, considering the mPEC technique's ease and precision, it could prove a useful tool to discover new, *in vivo*-relevant T cell epitopes for cancer immunotherapy and vaccination.

Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). R.L. and J.-D.D. are recipients of scholarships from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). The authors thank A. Reuben and Marie-Andrée Forget for careful reading of this manuscript, O. Da Silva from the "Bureau d'aide à la recherche" (CHUM) for text editing and L.-A. Hanafi, C. Perreault and J. Thibodeau for critical review of the manuscript and helpful discussions.

List of Supplemental digital content

Supplemental digital content 1.pdf

Figures and legends

Figure 1. Validation of the mRNA PCR-based epitope chasing approach with a defined HLA-A*0201 epitope from M1 influenza protein. EBV-B cells were electroporated with mock (Ctl) or M1-coding DNA plasmids, or with mRNA prepared from PCR-amplified M1 or mock (Ctl) plasmid cDNA, with the gp100²⁰⁹⁻²¹⁸-coding sequence epitope inserted in the 3' end primer (g209). EBV-B cells were also directly pulsed with peptides corresponding to M1⁵⁸⁻⁶⁶ or gp100²⁰⁹⁻²¹⁸ epitopes. Presentation of relevant epitopes was assessed by co-culture with either M1⁵⁸⁻⁶⁶ (M1-CD8; red bar) or gp100²⁰⁹⁻²¹⁸ (blue bar)-specific T cells. IFN- γ production was quantified by ELISA (range <16 to >5,000 pg·ml⁻¹, error bars, s.d.), representative of 3 independent experiments. The number of amino acids (a.a.) per fragment in the legend is approximated. The M1⁵⁸⁻⁶⁶ epitope to which the M1-CD8 T cell clone is specific is indicated by a green circle.

Figure 2. Identification of unknown MHC class I and II epitopes from influenza antigens by the mPEC method. EBV-B cells were electroporated with mRNA prepared from PCR-amplified NP (A), M1 (C) or mock (Ctl) cDNA, with respectively the M1⁵⁸⁻⁶⁶- (red bar) or gp100^{209-218/2M}- (blue bar) coding sequence epitope added at the 3' end of mRNAs. EBV-B cells were also pulsed with NP-CD8 (B) or M1-CD4 (D) peptides (see Supplementary Table 2, Supplemental digital content 1 for the list of peptides). Presentation of relevant epitopes was assessed by co-culture with either NP-CD8 (A, B) and M1⁵⁸⁻⁶⁶ (A, red bar) or M1-CD4 (C, D) and gp100^{209-218/2M}- (C, blue bar) specific T cell clones. IFN- γ production was quantified by ELISA (range <16 to >10,000 pg·ml⁻¹ (A, C); <16 to 60,000 pg·ml⁻¹ (B, D), error bars, s.d.), representative of 3 independent experiments. The number of amino acids per fragment in the legend is approximated. The NP-CD8 and M1-CD4 epitopes are indicated by a green circle.

References

1. Soethout EC, Meiring HD, Jong APd, et al. Identifying the epitope-specific T cell response to virus infections. *Vaccine*. 2007;25:3200-3203.
2. Pilla L, Rivoltini L, Patuzzo R, et al. Multi-peptide vaccination in cancer patients. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9:1043-1055.
3. Bakker A, Hoppes R, Linnemann C, et al. Conditional MHC class I ligands and peptide exchange technology for the human MHC gene products HLA-A1, -A3, -A11, and -B7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:3825-3830.
4. Engelhard VH. The contributions of mass spectrometry to understanding of immune recognition by T lymphocytes. *Int J Mass Spectrom*. 2007;259:32-39.
5. Robbins P, el-Gamil M, Li Y, et al. Cloning of a new gene encoding an antigen recognized by melanoma-specific HLA-A24-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol*. 1995;154:5944-5950.
6. Britten CM, Meyer RG, Graf C, et al. Identification of T cell epitopes by the use of rapidly generated mRNA fragments. *J Immunol Methods*. 2005;299:165-75.
7. Pelletier S, Tanguay S, Lee S, et al. TGF- α as a candidate tumor antigen for renal cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58:1207-1218.
8. Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, et al. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res*. 2003;63:2836-2843.
9. Zhang Q, Wang P, Kim Y, et al. Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR). *Nucleic Acids Res*. 2008;36:W513-W518.
10. Ho O and Green WR. Alternative translational products and cryptic T cell epitopes: Expecting the unexpected. *J Immunol*. 2006;177:8283-8289.
11. Skipper J, Hendrickson R, Gulden P, et al. An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med*. 1996;183:527-534.
12. Hanada K-I, Yewdell JW and Yang JC. Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature*. 2004;427:252-256.
13. Fairchild PJ, Pope H and Wraith DC. The nature of cryptic epitopes within the self-antigen myelin basic protein. *Int Immunol*. 1996;8:1035-1043.
14. Yewdell JW and Bennink JR. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annual Review in Immunology*. 1999;17:51-88.
15. Contreras CE, Ploton IN, Siliciano RF, et al. Mapping of specific and promiscuous HLA-DR-restricted T-cell epitopes on the *Plasmodium falciparum* 27-kilodalton sexual stage-specific antigen. *Infect Immun*. 1998;66:3579-3590.

Figure 1m2

Doucet et al.

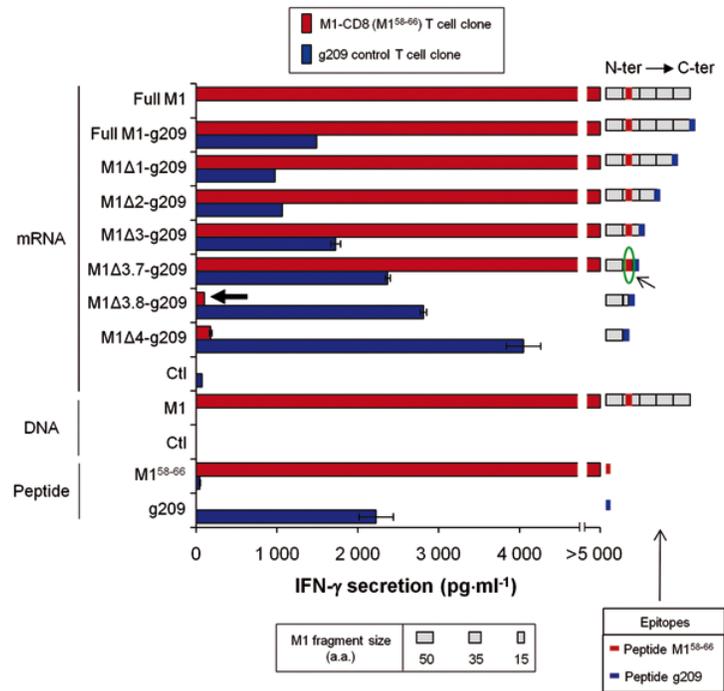
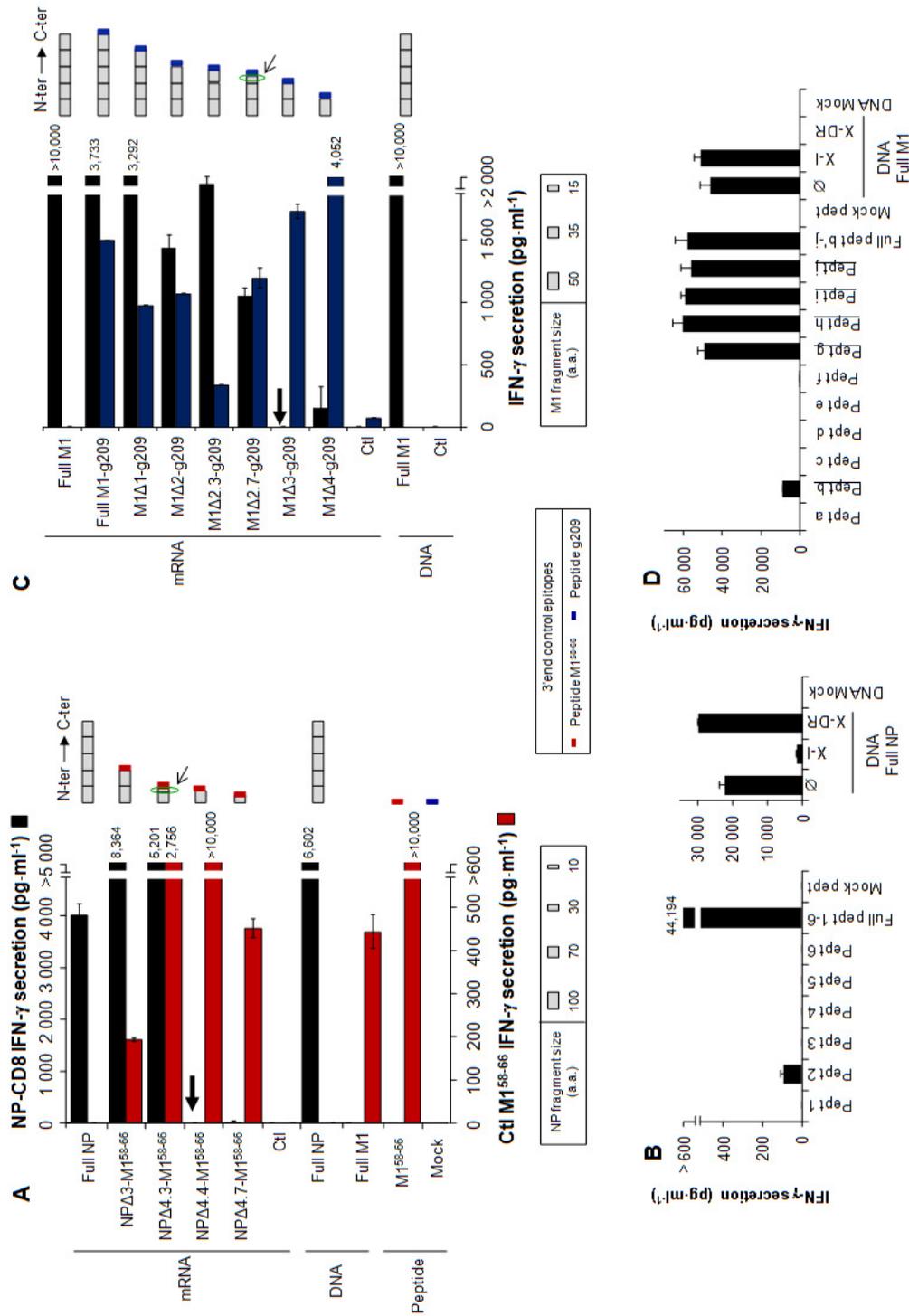


Figure 2m2

Doucet et al.



Brief Communication: Identification of T cell epitopes by a novel mRNA PCR-based epitope chase technique

Jean-Daniel Doucet, Dominique Gauchat and Réjean Lapointe*

Supplementary Results

M1 mRNA synthesis

We synthesized M1 mRNA fragments as described earlier, from PCR-amplified cDNA amplicons with a high fidelity DNA polymerase¹⁶. In Supplementary Figure 1B, an example is shown of PCR-amplified M1 cDNA templates on 1.5 % agarose gel electrophoresis. M1 cDNA 3'end is shortened by approximately 150 nucleotides between each deletant (approximately 300 nucleotides for NP fragments, data not shown). As expected, the inclusion of a g209 control peptide in the 3'end reverse PCR primer resulted in a minor size increase of the cDNA templates. When needed, specific cDNA templates (M1Δ3 and M1Δ1) were isolated on preparative agarose gel and re-amplified by PCR to ensure purity (data not shown).

Finally, RNA synthesis and poly-adenylation were overviewed by agarose gel electrophoresis under non-denaturing conditions after migration for 15 min to minimize RNA degradation in the gel¹⁷ (Supplementary Fig. 1C). Although 2 size fragments could be seen for some mRNA fragments, these were most likely due to the remaining secondary structures of RNAs (i.e. M1Δ4-g209 RNA fragment). As RNAs are very sensitive to degradation, we cannot confirm beyond doubt that mRNAs were polyadenylated without denaturing conditions and a strict RNase-free environment. However, integrity of mRNAs was further assessed by control T cell clone recognition (Figure 1 and 2 A, C).

M1-coding DNA and mRNA processing by CD40-activated B cells

CD40-activated B lymphocytes (CD40-B) can serve as alternative autologous APCs, since EBV-immortalized B cells require longer preparation (3-6 weeks compared to 10-15 days). Both EBV-B and CD40-B cells electroporated with M1-coding DNA plasmids or mRNA resulted in comparable IFN- γ production by M1⁵⁸⁻⁶⁶ T cells (data not shown). As plasmid DNA- and mRNA-electroporated CD40-B cells have already been used before to

stimulate both CD8⁺ and CD4⁺ T cells^{18,19}, the use of CD40-B cells could therefore quicken the mPEC method.

Identification of an MHC class II epitope from influenza antigens by the mPEC method

The MHC class II M1-CD4 T cell epitope is localized between the M1Δ2.7 and M1Δ3 constructs (Fig. 2C). Hence, we chose the 18 amino acid sequence specifically deleted between these 2 fragments (Supplementary Table 2) to which we added 8 amino acids from M1Δ3 fragment at the N-terminal end to account for potential loss of the P9 amino acid of the core MHC class II epitope. We further added 5 amino acids from M1Δ3 fragment at the N-terminal end to account for the loss of a potentially important flanking region of the MHC class II epitope²⁰. We then synthesized 10 overlapping 15-mer peptides encompassing this sequence (Supplementary Table 2) from which 2 HLA-DR-restricted MHC class II epitopes were recognized by the M1-CD4⁺ T cell clone (Fig. 2D and Supplementary Table 2). Hence, mPEC allows for the identification of MHC class II epitopes. However, the antigens used in this proof-of-principle study are endogenously presented by MHC class II (manuscript in preparation), which is not always the case. MHC class II compartment mobilization sequences could allow presentation of other antigens to CD4⁺ helper T cells^{21,22}.

Identification of MHC class I and II epitopes from influenza antigens by the mPEC method without 3'end control peptide

We also tested the specificities of the M1-CD8 (Supplementary Fig. 2A), NP-CD8 (Supplementary Fig. 2B) and M1-CD4 (Supplementary Fig. 2C) T cell clones by the mPEC method without the 3'end control peptide for some M1 and NP mRNA fragments to ensure the control peptide did not affect structure and processing of the studied sequence. Without the 3'end control peptide (Supplementary Fig. 2), M1 and NP mRNA fragments were recognized to a similar extent to that shown in Figures 1 and 2. Thus, 3'end peptide addition does not interfere with antigen recognition since epitopes are identified in the same amino acid deletion for M1-CD8 and NP-CD8 T cell clones with or without the 3'end peptide addition (Supplementary Fig. 2A-B). Still, without the 3'end peptide, one cannot

determine if the lack of recognition of a T cell is due to specific epitope loss or to mRNA degradation.

Difference in mRNA and plasmid DNA recognition

Finally, few T cell clones failed to recognize electroporated mRNA, while APCs electroporated with a DNA plasmid encoding the same protein were recognized (data not shown). This may illustrate the need for reasonably high avidity T cells to recognize mRNA-electroporated target APCs. Alternatively, more sensitive recognition assays, such as ELISPOT¹², intracellular cytokine assays, or ELISA for other more abundant cytokines such as MIP-1 β (data not shown), could be exploited. Thus, in our experiments, we have co-cultured EBV-B cells 24 h after their electroporation with mRNA to compare with procedure similar to plasmid DNA. However, mRNA-encoded proteins are expressed before those derived from plasmid DNA, and mRNA expression could fade earlier due to lack of ongoing transcription from an existing DNA template. Hence, mRNA-electroporated EBV-B cells could be immediately co-cultured with specific T cells to favor maximum protein expression and epitope presentation and detection, contrarily to DNA-electroporated EBV-B.

Supplementary Methods

HLA typing of donor PBMCs

The HLA genotypes and serotypes of PBMCs were determined by the sequencing services of the Laboratoire d'histocompatibilité, INRS-Institut Armand-Fappier (Laval, Quebec, Canada). HLA genotype of PBMCs from the normal donor was HLA-A*02, 33; B*35, 51; Cw*04, 16; DRB1*04, 11; DQB1*03, 03.

Cell freezing

EBV-B cell lines were cryopreserved in 90% RPMI 1640 complete medium / 10 % DMSO (Sigma, St-Louis, MO), and stored in liquid nitrogen. Antigen-specific T cell clones and CD40-B cells were cryopreserved in 90% FBS (Wisent) / 10 % DMSO (Sigma), and stored in liquid nitrogen.

PCR cycling conditions and cDNA purification

Cycling conditions of M1 and NP PCR amplification were 15 min at 95°C, followed by 35 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 55°C and 90 s at 72°C. GFXtm PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare, Waukesha, WI) was used to purify PCR-amplified cDNAs when needed according to the manufacturer's instructions.

mRNA and synthesis controls

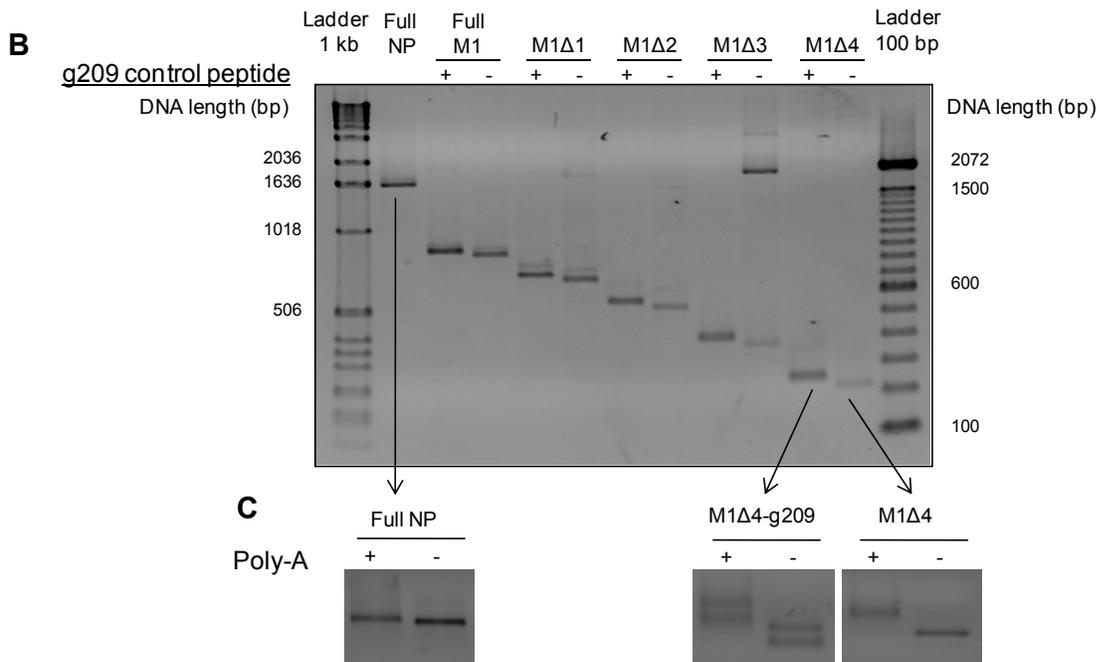
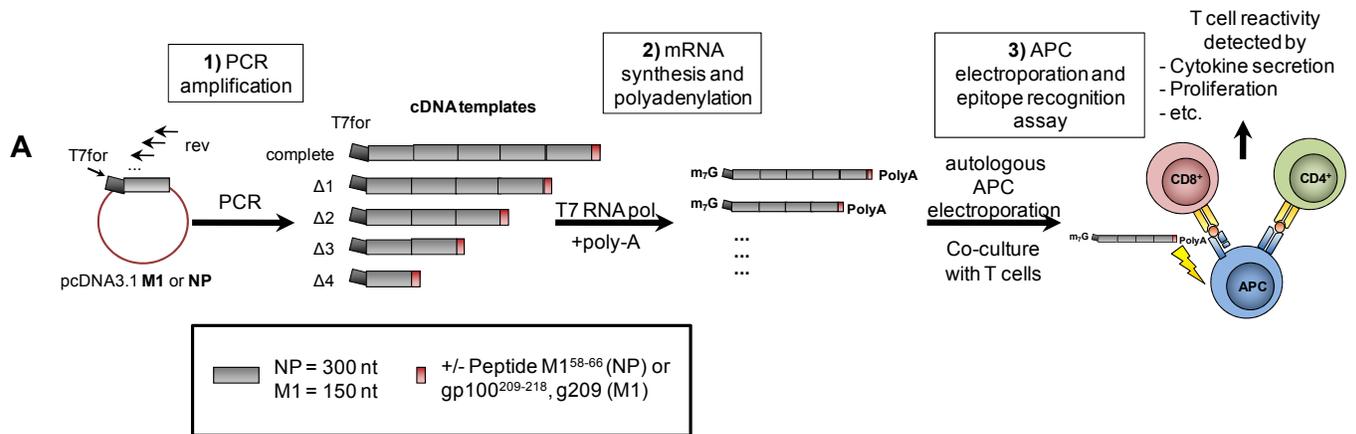
cDNA and mRNA sample integrities were assessed after migration on 1.5 % agarose gels in non-denaturing/non-RNase-free conditions for approximately 15 min.

Supplementary Figures and legends

Supplementary Figure 1	mRNA preparation from PCR-amplified cDNA
Supplementary Figure 2	Identification of MHC class I and class II epitopes from influenza antigens by the mPEC method in the absence of 3'end control epitopes
Supplementary Table 1	PCR primer sequences for DNA template PCR synthesis
Supplementary Table 2	Peptides synthesized to test NP-CD8 and M1-CD4 T cell clone specificity with the mPEC method

Supplementary Figure 1

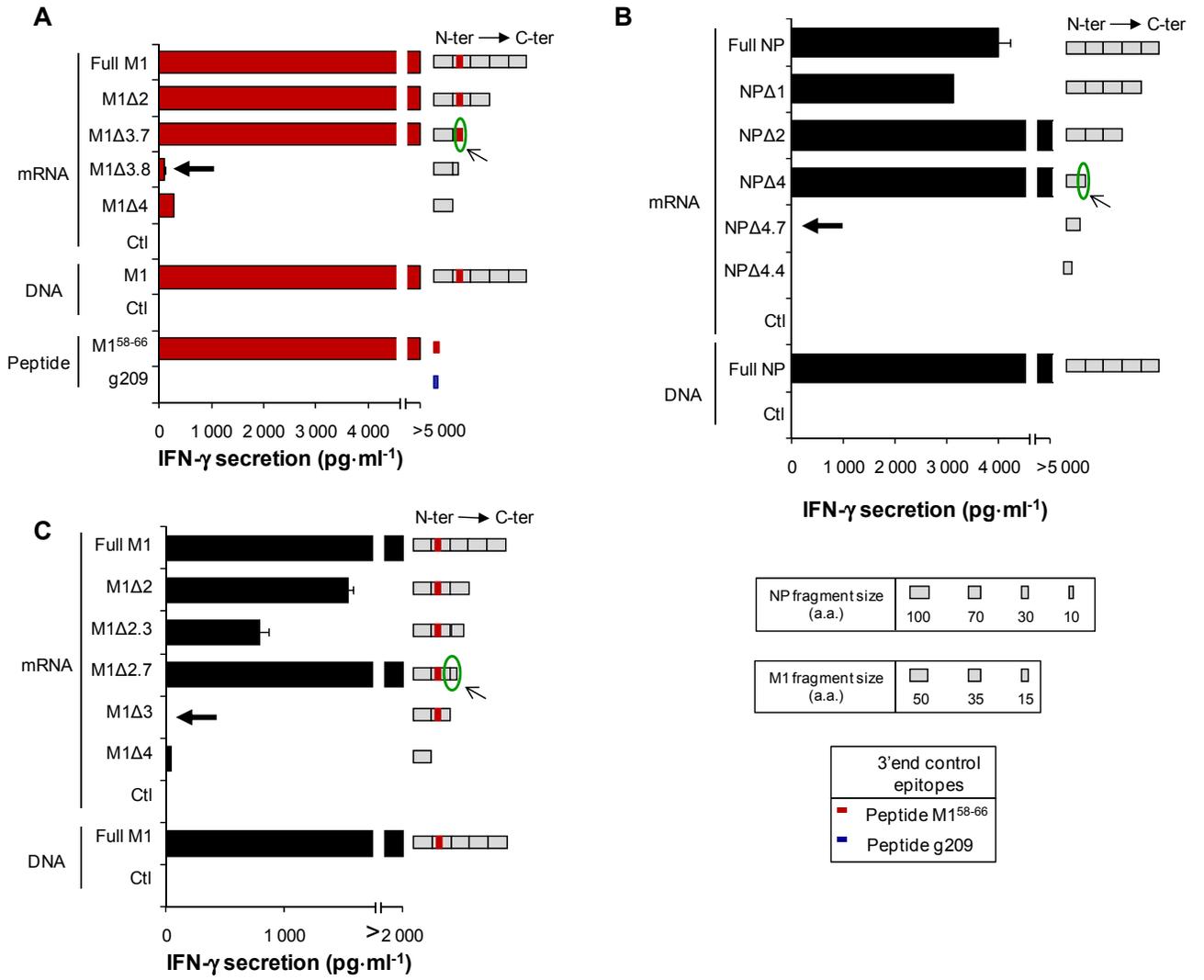
Doucet et al.



Supplementary Figure 1. mRNA preparation from PCR-amplified cDNA. (A) Schematic representation of M1 or NP synthetic mRNA fragments prepared from PCR-amplified cDNA and co-culture of electroporated autologous EBV-B cells with specific T cells. (B) M1 PCR-amplified cDNA fragments with or without 3'end gp100^{209-218/2M} control peptide (g209) were migrated on 1.5 % agarose gel for 1 h. (C) Migration of some M1 RNA fragments synthesized from M1 cDNA fragment templates, with or without subsequent poly-adenylation, was performed for 15 min on 1.5 % agarose gel in non-denaturing, non-RNase-free conditions. The same controls were used for NP fragments and for all other fragments (data not shown).

Supplementary Figure 2

Doucet et al.



Supplementary Figure 2. Identification of MHC class I and class II epitopes from influenza antigens by the mPEC method in the absence of 3'end control epitopes. EBV-B cells were electroporated with mRNA prepared from PCR-amplified (A) NP or (C) M1 cDNA. EBV-B cells were also directly pulsed with M1⁵⁸⁻⁶⁶ (red bar) or gp100^{209-218/2M} (blue bar) peptides. Presentation of relevant epitopes was evaluated by co-culture with either (A) M1-CD8, (B) NP-CD8 or (C) M1-CD4 specific T cells. IFN- γ production was assessed by ELISA (range <16 to >5,000 pg·ml⁻¹), representative of 3 independent experiments. The number of amino acids per fragment in the legend is approximated. Each T cell clone epitope is delineated by a green circle.

Supplementary Table 1. PCR primer sequences for DNA template PCR synthesis. The reverse nucleotide sequence of the stop codon added at the 3' end of all DNA fragments is in blue. The reverse nucleotide sequence of M1⁵⁸⁻⁶⁶ peptide added at the 3' end of NP DNA fragments is in red. The reverse nucleotide sequence of the g209-2M peptide added at the 3' end of all M1 DNA fragments is in green.

Primer names	DNA sequence (5' --> 3')
T7 promoter for BGH rev	TTAATACGACTCACTATAGGG TAGAAGGCACAGTCGAGG
NPrevsegM1 ⁵⁸⁻⁶⁶	TTACAGGGTGAACACGAAGCCCAGGATGCCGAAGTAGCTGCCCTCGT
NPrevseg4	TTACTGTCCAGCGCTAGCCC
NPrevseg4-M1 ⁵⁸⁻⁶⁶	TTACAGGGTGAACACGAAGCCCAGGATGCCCTGTCCAGCGCTAGCCC
NPrevseg3A	TTACCGGAAGGGGTTCGATGCC
NPrevseg2	TTATCTCCAAAAATTCCGGT
NPrevseg2-M1 ⁵⁸⁻⁶⁶	TTACAGGGTGAACACGAAGCCCAGGATGCCCTCTCCAAAAATTCCGGT
NPrevseg1A	TTACAGCTCCCGCATCCACT
NPrevseg0_7-M1 ⁵⁸⁻⁶⁶	TTACAGGGTGAACACGAAGCCCAGGATGCCCTCCGGCGCTGGGGTGTT
NPrevseg0_67	TTACCGTCTTTTCGTCGAAGG
NPrevseg0_67-M1 ⁵⁸⁻⁶⁶	TTACAGGGTGAACACGAAGCCCAGGATGCCCGTCTTTCGTCGAAGG
NPrevseg0_33	TTAGATGTAGAACCGGCCGA
NPrevseg0_33-M1 ⁵⁸⁻⁶⁶	TTACAGGGTGAACACGAAGCCCAGGATGCCGATGTAGAACCGGCCGA
M1revseg	TTACTTGAACCGCTGCATCT
M1revseg-g209	TTACACGCTGAAGGGCACCTGGTCCATGATCTTGAACCGCTGCATCT
M1-4revseg	TTAGCTGCTGCCGGCCATCT
M1-4revseg-g209	TTACACGCTGAAGGGCACCTGGTCCATGATGCTGCTGCCGGCCATCT
M1-3revseg	TTAACACACCAGGCCGAAGG
M1-3revseg-g209	TTACACGCTGAAGGGCACCTGGTCCATGATACACACCAGGCCGAAGG
M1-2revseg	TTAGGCCTTGTCCATGTTGT
M1-2revseg-g209	TTACACGCTGAAGGGCACCTGGTCCATGATGGCCTTGTCCATGTTGT
M1-2_7revseg	TTAGTAGATCAGGCCCATGC
M1-2_7revseg-g209	TTACACGCTGAAGGGCACCTGGTCCATGATGTAGATCAGGCCCATGC
M1-2_3revseg	TTACTCTTTGGCGCCGTGGA
M1-2_3revseg-g209	TTACACGCTGAAGGGCACCTGGTCCATGATCTCTTTGGCGCCGTGGA
M1-1revseg	TTACAGCCATTCCATCAGCA
M1-1revseg-g209	TTACACGCTGAAGGGCACCTGGTCCATGATCAGCCATTCCATCAGCA
M1-1_3revseg	TTACAGGGTGAACACGAAGC
M1-1_3revseg-g209	TTACACGCTGAAGGGCACCTGGTCCATGATCAGGGTGAACACGAAGC
M1-1_2revseg	TTACTTGGTCAGGGGGCTCA
M1-1_2revseg-g209	TTACACGCTGAAGGGCACCTGGTCCATGATCTTGGTCAGGGGGCTCA

Supplementary Table 2. Peptides synthesized to test NP-CD8 and M1-CD4 T cell clone specificity with the mPEC method. Recognized T cell-specific epitopes are underlined. Amino acids were added at the N-terminal of peptides to account for a potential epitope spanning both NPΔ4.3 and NPΔ4.4 mRNA fragments (in blue).

	NP-CD8 peptides
peptide 1-6	<u>LSAFDERRNKYLEEHPSAG</u>
peptide 1	<u>LSAFDERRNK</u>
peptide 2	<u>AFDERRNKYL</u>
peptide 3	<u>DERRNKYLEE</u>
peptide 4	<u>RRNKYLEEHP</u>
peptide 5	<u>NKYLEEHPSA</u>
peptide 6	<u>KYLEEHPSAG</u>
	M1-CD4 peptides
peptide a-j	<u>ALNGNGDPNNMDKAVKLYRKLKREITFHGAKE</u>
peptide b'-j	<u>GNGDPNNMDKAVKLYRKLKREITFHGAKE</u>
peptide a	<u>ALNGNGDPNNMDKAV</u>
peptide b	<u>NGNGDPNNMDKAVKL</u>
peptide c	<u>NGDPNNMDKAVKLYR</u>
peptide d	<u>DPNNMDKAVKLYRKL</u>
peptide e	<u>NNMDKAVKLYRKLKR</u>
peptide f	<u>MDKAVKLYRKLKREI</u>
peptide g	<u>KAVKLYRKLKREITF</u>
peptide h	<u>VKLYRKLKREITFHG</u>
peptide i	<u>LYRKLKREITFHGAK</u>
peptide j	<u>YRKLKREITFHGAKE</u>
	M1⁵⁸⁻⁶⁶ peptide
	GILGFVFTL
	g209-2M peptide
	IMDQVPFSV

Supplementary references

16. Nishioka M, Mizuguchi H, Fujiwara S, et al. Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme *J Biotechnol.* 2001;88:141-149.
17. Euler HV, Khoshnoud R, He Q, et al. Time-dependent RNA degradation affecting cDNA array quality in spontaneous canine tumours sampled using standard surgical procedures. *Int J Mol Med.* 2005;16:979-985.
18. Schultze JL, Michalak S, Seamon MJ, et al. CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest.* 1997;100:2757-2765.
19. Van den Bosch Ga, Ponsaerts P, Nijs G, et al. Ex vivo induction of viral antigen-specific CD8 T cell responses using mRNA-electroporated CD40-activated B cells. *Clin Exp Immunol.* 2005;139:458-67.
20. Godkin AJ, Smith KJ, Willis A, et al. Naturally processed HLA Class II peptides reveal highly conserved immunogenic flanking region sequence preferences that reflect antigen processing rather than peptide-MHC interactions. *J Immunol.* 2001;166:6720-6727.
21. Lepage S and Lapointe R. Melanosomal targeting sequences from gp100 are essential for MHC class II-restricted endogenous epitope presentation and mobilization to endosomal compartments. *Cancer Res.* 2006;66:2423-32.
22. Wang R-F. Identification of MHC class II-restricted tumor antigens recognized by CD4⁺ T cells. *Methods.* 2003;29:227-235.

Curriculum vitae

Formation scolaire

M. Sc. sciences biomédicales

Université de Montréal, diplomation prévue : 2010

2007-

B. Sc. biochimie

Université Laval

2004-2007

Prix et distinctions

	Montant (\$)	Début	Fin
Bourse de conférence CSI 2010 – Immuno-montréal	500	04-2010	04-2010
Bourse rédaction Sciences biomédicales	2500	12-2009	12-2009
Bourse d'étude du FRSQ – Maîtrise	15 000	09-2008	09-2010
Bourse d'excellence Canderel de l'ICM	1000	04-2008	03-2009
Médaille d'argent de la gouverneure générale du Canada, Université Laval	-	06-2008	06-2008
Bourse d'excellence du CHUM - Maîtrise	2000	12-2007	12-2007
Bourse d'excellence Canderel de l'ICM	1000	04-2007	03-2009
Bourse d'étude des IRSC - Maîtrise	17 500	07-2007	08-2008
Society of chemical industry	-	08-2007	08-2007
Bourse Didier-Dufour du CRC de l'U. Laval	1500	08-2006	08-2006
Bourse de premier cycle du FRSQ	4375	05-2006	07-2006
Bourse de premier cycle du CRSNG	5700	05-2005	08-2005

Liste des publications et communications

1) *Articles dans des revues scientifiques avec comité de lecture*

- Ouellet, M, Doucet J-D, Voyer, N, Auger, M. (2006) Membrane Topology of a 14-mer Model Amphipathic Peptide: A Solid-State NMR Spectroscopy Study, *Biochemistry*, 46 (22): 6597-606.

- Doucet, J-D, Gauchat, D, Lapointe, R. Identification of T cell epitopes by a novel mRNA PCR-based epitope chasing technique, *Journal of Immunotherapy*, sous presse.

- Doucet, J-D, Forget, M-A, Grange, C, Ronan, R N, von Messling, V, Lapointe, R. Endogenously expressed matrix I and nucleoprotein structural influenza proteins are efficiently presented by both major histocompatibility complexes class I and II, *Journal of General Virology*, sous presse.

2) *Présentations orales*

- Doucet, J-D, Gauchat, D, Lapointe, R. (12/11/2010) Identification of T cell epitopes by a novel mRNA PCR-based epitope chasing technique, *Pandemic preparedness meeting*, Montreal, Canada.

- Doucet, J-D, Gauchat, D, Lapointe, R. (23/4/2010) Identification of T cell epitopes by a novel mRNA PCR-based epitope chasing technique, *3rd Annual Cancer Immune Therapy Symposium*, Niagara Falls, Canada.

- Doucet, J-D, Forget, M-A, Grange, C, Lapointe, R. (16/12/2009) Réponse cellulaire pan-spécifique contre l'influenza : Analyse de la présentation d'antigènes conservés, *12^e congrès annuel des étudiants stagiaires du CRCHUM*, Montréal, Canada.

- Doucet, J-D, Forget, M-A, Grange, C, Lapointe, R. (27/2/2009) Réponse cellulaire pan-spécifique contre l'influenza : Optimisation de la présentation d'antigènes conservés, *18e Journée scientifique de l'Institut du Cancer de Montréal*, Montréal, Canada.

- Doucet, J-D, Forget, M-A, Grange, C, Lapointe, R. (11/11/2008) Réponse cellulaire pan-spécifique contre l'influenza : Optimisation de la présentation d'antigènes conservés, *Séminaire de maîtrise*, Montréal, Canada.

- Doucet, J-D, Ouellet, M, Auger, M et Voyer, N. (28/10/2005) Étude du mécanisme d'action de peptides à potentiel antimicrobien par RMN à l'état solide, *17e colloque des étudiants de premier cycle en chimie de l'Université de Sherbrooke*, Sherbrooke, Canada.

3) Présentations par affiche

- Doucet, J-D, Gauchat, D, Lapointe, R. (12/11/2010) Pan-specific cellular response against influenza: The presentation of conserved antigens in humans, *Pandemic preparedness meeting*, Montreal, Canada.

- Doucet, J-D, Forget, M-A, Grange, C, Lapointe, R. (25/4/2010) Pan-specific cellular response against influenza: The presentation of conserved antigens in humans, *2010 meeting of the Canadian Society for Immunology*, Niagara Falls, Canada.

- Doucet, J-D, Gauchat, D, Lapointe, R. (22/4/2010) Identification of T cell epitopes by a novel mRNA PCR-based epitope chasing technique, *3rd Annual Cancer Immune Therapy Symposium*, Niagara Falls, Canada.

- Doucet, J-D, Forget, M-A, Grange, C, Lapointe, R. (24/4/2009) Réponse cellulaire pan-spécifique contre l'influenza : Optimisation de la présentation d'antigènes conservés, *2^e rencontre scientifique du groupe d'intérêt en immunologie du CHUM*, Montréal, Canada.

- Doucet, J-D, Forget, M-A, Grange, C, Lapointe, R. (19/3/2009) Réponse cellulaire pan-spécifique contre l'influenza : Optimisation de la présentation d'antigènes conservés, *11^e congrès annuel des étudiants stagiaires du CRCHUM*, Montréal, Canada.

- Forget M-A, Doucet, J-D, Leclerc, D, Lapointe R. (19/3/2009) Évaluation de la réponse immunitaire contre DKK1 dans les cancers communs, *11^e congrès annuel des étudiants stagiaires du CRCHUM*, Montréal, Canada.

- Ouellet, M, Doucet, J-D, Voyer, N, Auger, M. (20-25/8/2006) Membrane Topology of a 14-mer Amphipathic Model Peptide in Interaction with Aligned Model Membranes: A Solid-State NMR Spectroscopic Study, *The XXIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, Göttingen, Allemagne.

Demande de Brevet

Lapointe, R et Doucet, J-D. Identification of T cell epitopes by a novel mRNA PCR-based epitope chase technique. US provisional patent application. Soumis le 22 avril 2010.

Stage de recherche en milieu universitaire

- Caractérisation d'un système inductible Tet-on dans l'hépatome 7777 v7.6 Été 2006
CRHDQ, laboratoire du Dr Luc Bélanger
- Synthèse sur support solide de peptides à potentiel antimicrobien 2005-2006
et étude de leur mécanisme d'action
Université Laval, Dép. de chimie, laboratoire du Dr Normand Voyer

