

Université de Montréal

**Traitement du cancer par transfert adoptif de lymphocytes T dirigés  
contre un antigène mineur d'histocompatibilité**

Par

Marie-Christine Meunier

Institut de recherche en immunologie et cancer (IRIC)

Département de Sciences Biomédicales  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D) en sciences biomédicales

Option immunologie

Octobre 2006

© Marie-Christine Meunier



W

4

U58

2007

v.078

## AVIS

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

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

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

## NOTICE

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée

**Traitement du cancer par transfert adoptif de lymphocytes T dirigés  
contre un antigène mineur d'histocompatibilité**

Présentée par :

**Marie-Christine Meunier**

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Denis-Claude Roy

Dr Claude Perreault

Dr Jean-François Gauchat

Dr Jacques Galipeau

## SOMMAIRE

Le transfert adoptif de lymphocytes T allogéniques, très utilisé dans le traitement des cancers hématologiques, a connu jusqu'à ce jour un véritable succès. L'effet du greffon contre la leucémie (GVL), obtenu grâce à cette approche, représente l'exemple le plus concluant que le système immunitaire peut être exploité à des fins anti-tumorales. Cet effet GVL est dû surtout à la reconnaissance d'antigènes mineurs d'histocompatibilité (AgMis). Malheureusement, cet effet GVL est souvent associé à la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) causée par la reconnaissance d'épitopes sur les cellules normales de l'hôte par les lymphocytes T allogéniques. Notre équipe a récemment démontré la possibilité de dissocier ces deux effets pour ne garder que l'effet GVL. Ceci est réalisable en injectant des lymphocytes T pré-activés, dirigés contre un seul AgMi dominant. Cette capacité qu'ont les cellules T injectées, dirigés contre un antigène (Ag) dominant, à éliminer des cellules leucémiques sans causer de dommages collatéraux soulève trois questions fondamentales : 1) Les cellules T dirigées contre un AgMi dominant peuvent-elles éliminer aussi des tumeurs solides? 2) Quelles sont les caractéristiques, en termes de programme de différenciation, d'une réponse dirigée contre un Ag dominant, comparativement à un Ag non dominant. 3) Qu'advient-il, en terme de comportement et de persistance à long terme, des lymphocytes T suite à leur transfert? Le but de ce travail était d'étudier ces questions. Pour ce faire, les travaux ont été séparés en trois objectifs. Le premier objectif était de déterminer la capacité de lymphocytes T CD8 adoptivement transférés, dirigés contre un AgMi dominant (l'AgMi dominant H7<sup>a</sup>) à éliminer une tumeur solide (le mélanome) déjà établie. Nos recherches ont démontré que des lymphocytes T activés contre l'AgMi dominant H7<sup>a</sup> peuvent aussi éliminer des tumeurs solides déjà établies. Les événements menant à l'élimination tumorale par les lymphocytes T se déroulent comme suit: en premier lieu, les lymphocytes T infiltrent la tumeur où ils sécrètent d'importantes quantités d'interféron gamma (IFN $\gamma$ ). Cette étape dépend de l'interaction entre VLA-4 sur les cellules T et VCAM-1 exprimé sur les vaisseaux tumoraux. Deuxièmement, la relâche locale d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T anti-H7<sup>a</sup> inhibe l'angiogénèse tumorale et cause l'augmentation de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI) à la surface des cellules tumorales. Ceci entraîne la dégranulation locale, Ag-spécifique, des lymphocytes T anti-H7<sup>a</sup>. Le second objectif du présent travail était de comparer, en termes de programme de différenciation, des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dirigés contre un

AgMi dominant (H7<sup>a</sup>) à des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dirigés contre un AgMi non-dominant (HY). Pour ce faire, nous avons procédé à l'analyse séquentielle des marqueurs de différenciation exprimés par les lymphocytes T. Ceci nous a permis de découvrir que, malgré le fait que le programme de différenciation des lymphocytes T spécifiques à H7<sup>a</sup> et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques à HY soient très similaires, ils ne progressent pas de façon simultanée. Les lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> atteignent leur pic de différenciation très rapidement comparativement aux lymphocytes T dirigés contre HY. De plus, la phase d'expansion et le développement des fonctions effectrices se produit de façon synchrone chez les lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> contrairement aux lymphocytes T anti-HY. Ces résultats suggèrent que les lymphocytes dirigés contre H7<sup>a</sup> seraient de meilleurs effecteurs comparativement aux lymphocytes T dirigés contre un Ag non-dominant tel HY. Le troisième objectif des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse était d'évaluer, en termes de prolifération, de migration et de persistance à long terme, le comportement des lymphocytes T dirigés contre un AgMi dominant (H7<sup>a</sup>) adoptivement transférés chez des hôtes porteurs de tumeurs solides. Nos études ont démontré que les lymphocytes T anti-H7<sup>a</sup> se retrouvent en quantités importantes au niveau des mélanomes en régression. L'observation des temps précoces post transfert adoptif a permis de découvrir que cette infiltration sélective de la tumeur était déjà établie au jour 3 post transfert adoptif. Nos études nous ont aussi permis de découvrir que suite à cet ensemencement, le nombre de lymphocytes T dans la tumeur augmente dramatiquement, contrairement à ce qui se passe dans la rate. Grâce à des études de marquage au CFSE, nous avons aussi trouvé que les lymphocytes T spécifiques à H7<sup>a</sup> dans la tumeur avaient d'avantage proliféré en comparaison à ceux retrouvés dans la rate. Ceci suggère fortement que l'accumulation massive de cellules T anti-H7<sup>a</sup> dans la tumeur est due à une prolifération *in situ*. Ainsi, même des nombres relativement faibles de lymphocytes T injectés peuvent infiltrer la tumeur et détruire des cancers établis. Finalement, nos travaux nous ont également permis d'établir que les lymphocytes T peuvent, dans certaines conditions, persister longuement après leur transfert. Cette persistance est dictée par deux facteurs chez l'hôte : 1) par l'expression de l'Ag H7<sup>a</sup> par les cellules normales de l'hôte et 2) par la fonction thymique du receveur.

**Mot-clé :** Immunothérapie, lymphocytes T, antigènes mineur d'histocompatibilité, tumeur solide, leucémie, transplantation, souris.

## ABSTRACT

Adoptive transfer of allogeneic T lymphocytes, mostly used for treatment of hematopoietic malignancies, has met with a remarkable success rate. The graft-versus-leukemia (GVL) effect, obtained using this approach, represents the most conclusive example that the immune system can cure cancer. The GVL effect is due mainly to recognition of minor histocompatibility antigens (MiHAs). Unfortunately, the GVL effect is often associated to the graft-versus-host disease (GVHD) that is caused by the recognition of epitopes on normal hosts cells by unselected allogeneic T cells. Nevertheless, our team has recently demonstrated that it is possible to avoid this problem and still have the GVL effect. This can be achieved by selectively injecting primed T cells targeted to a single immunodominant MiHA, H7<sup>a</sup>. That H7<sup>a</sup>-specific CD8<sup>+</sup> T cells cause no GVHD was remarkable since this epitope is also expressed on normal host cells. This capacity of injected T cells to eliminate leukemia cells without causing GVHD raised three crucial questions: 1) Could T cells targeted to a single dominant MiHA eradicate established solid tumors? 2) What are, in terms of differentiation program, the characteristics associated to immune responses targeting a dominant epitope like H7<sup>a</sup>. 3) How do T cells behave, in terms of migration, proliferative capacity and persistence, following adoptive transfer into tumor bearing hosts? The goal of this work was to address these fundamental questions. To do so, three main objectives were established. The first objective was to determine the capacity of adoptively transferred T lymphocytes directed against a dominant MiHA (H7<sup>a</sup>) to eliminate established solid tumors (melanomas). Our studies showed that T lymphocytes pre-activated against the dominant MiHA H7<sup>a</sup> could eradicate established solid tumors (melanomas) in mice. The events leading to melanoma eradication by anti-H7<sup>a</sup> T cells involve the following steps. First, primed T cells accumulate at the tumor site. This depends on interaction between VLA-4 on T cells and VCAM-1 on tumor blood vessels. Second, local release of IFN- $\gamma$  by anti-H7<sup>a</sup> T cells inhibited tumor angiogenesis and caused the up-regulation of MHC I expression on tumor cells. Finally, anti-H7<sup>a</sup> CD8 T cells undergo antigen-specific granule exocytosis in the tumor and thereby kill tumor cells. The second objective of this work was to compare, in terms of differentiation program, T lymphocytes directed against a dominant MiHA (H7<sup>a</sup>) to T lymphocytes directed against a non-dominant MiHA (HY), in

order to gain insight into the bases of immunodominance. To this end, we performed temporal studies of differentiation markers expressed by the T lymphocytes. We found that, although the differentiation programs of anti-H7<sup>a</sup> and anti-HY T cells were similar, they did not progress simultaneously. The expansion peak of anti-H7<sup>a</sup> T cells was reached on day 10 while that of anti-HY T cells was attained on day 15 to 20. Between day 10 and day 20, anti-H7<sup>a</sup> T cells were in the contraction phase and anti-HY T cells in the expansion phase. Furthermore, expansion and development of effector function were well synchronized in anti-H7<sup>a</sup> T cells but were disconnected in anti-HY T cells. These results suggest that, by leading to selective expansion of the fittest CTL, immunodominance may be beneficial to the host. The third objective of our work was to evaluate, in terms of proliferative capacity, migration and long term persistence, the behavior of T lymphocytes directed against a dominant MiHA (H7<sup>a</sup>) after adoptive transfer in tumors bearing hosts. Studies performed to fulfill this objective led us to establish that adoptively transferred anti-H7<sup>a</sup> T cells invade, in large numbers, regressing melanomas (day 12). Furthermore, by looking at earlier time points, we found that selective tumor infiltration by anti-H7<sup>a</sup> T cells is established by day 3 after adoptive transfer. Moreover, based on CFSE profiles, we found that H7<sup>a</sup>-specific T cells in the tumor had divided much more extensively than those in the spleen. These data strongly suggest that the massive accumulation of H7<sup>a</sup>-specific T cells in the tumor is due to *in situ* proliferation. Thus even small numbers of injected T cells may invade the cancer site and destroy large established cancers. Finally, we looked at the long term persistence of the injected T lymphocytes. We found that T lymphocytes can persist for a very long time after their injection and elimination of the cancer. Notably their longevity after transfer is dictated by host thymic function and expression of H7<sup>a</sup> by normal host cells.

**Keywords:** Immunotherapy, T lymphocytes, minor histocompatibility antigen, cancer, leukemia, melanoma, transplantation, mice



## TABLE DES MATIÈRES

Sommaire en Français.....	III
Sommaire en Anglais.....	V
Table des matières.....	VII
Liste des figures et des tableaux.....	X
Liste des abréviations.....	XII
Remerciements.....	XIV

### 1. INTRODUCTION

1.1 Immunologie reliée aux cancers.....	p.2
1.1.1 Réponses anti-tumorales par le système inné.....	p.3
1.1.2 Traitement du cancer à l'aide des lymphocytes B.....	p.8
1.1.3 Immunothérapie du cancer faisant appel aux lymphocytes T.....	p.10
1.1.3.1 Généralités.....	p.10
1.1.3.2 Le transfert adoptif de lymphocytes T.....	p.14
1.1.3.3 Mécanismes d'évasion tumorale.....	p.16
1.2. Les antigènes mineurs d'histocompatibilité.....	p.22
1.2.1. Généralités.....	p.22
1.2.2. AgMis : cibles attrayantes pour l'immunothérapie adoptive.....	p.24
1.2.3. H7 <sup>a</sup> , un antigène mineur d'histocompatibilité modèle.....	p.24

**1.3. Le phénomène d'immunodominance.....p.26**

**1.3.1. Concept général.....p.26**

**1.3.2. Implications cliniques.....p.33**

**2. OBJECTIFS DE CETTE THÈSE**

**2.1. Premier objectif.....p.35**

**2.2. Second objectif.....p.36**

**2.3. Troisième objectif.....p.37**

**3. RÉSULTATS**

**3.1. ARTICLE #1 : T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors.....p.39**

**3.2. ARTICLE #2 : Asynchronous differentiation of CD8 T cells that recognize dominant and cryptic antigens .....p.40**

**3.3. ARTICLE #3 : Two host factors regulate persistence of H7<sup>a</sup>-specific T cells injected in tumor-bearing mice.....p.41**

**4. DISCUSSION**

**4.1 Bref rappel des résultats.....p.43**

**4.2. Avantages liés à notre modèle.....p.48**

**4.3. Transposition des données murines à l'humain.....p.52**

**4.4. Perspectives futures et nouvelles questions soulevées.....p.54**

**4.4.1. Généralités.....p.54**

4.4.2. Amélioration du traitement.....	p.56
4.4.3. Mise à profit des résultats portant sur l'immunodominance.....	p. 60
4.4.4. Étude de la migration préférentielle des lymphocytes T.....	p.62
4.4.5. Étude de la mémoire immunologique générée.....	p.76
5. CONCLUSION.....	p.71
6. CONTRIBUTION AUX ARTICLES.....	p.77
7. RÉFÉRENCES.....	p.80

## Liste des Figures et des Tableaux

Figure 1. Étapes menant à l'élimination du mélanome par des lymphocytes T dirigés contre l'AgMi H7<sup>a</sup> adoptivement transférés.....p. 44

### **Article # 1 : T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors**

Figure 1-1 : Anti-H7<sup>a</sup> CD8 T lymphocytes can cure melanoma.....p.1-24

Figure 1-2 : The anti-tumor efficacy of adoptively transferred T cells is regulated by expression of target Ag on tumor cells.....p.1-25

Figure 1-3 : Preferential T-cell accumulation in the tumor is Ag-independent but degranulation is Ag-dependent.....p.1-26

Figure 1-4 : Characterization of TILs and tumor blood vessels. B10 mice injected with B16.F10 melanoma.....p.1-27

Figure 1-5 : TILs-derived IFN- $\gamma$  upregulates MHC I expression on tumor cells And inhibits tumor angiogenesis.....p.1-28

Figure 1-6 : Killing of target cells by anti-H7<sup>a</sup> effectors is TCR-dependent and correlates with MHC I expression.....p.1-29

Figure 1-7 : Supplementary figure 1. Experimental model.....p.1-30

Tableau 1-I : Supplementary table 1. H7<sup>a</sup> genotype of mice and tumors used in this work.....p.1-31

**Article # 2: Asynchronous differentiation of CD8 T cells that recognize dominant and cryptic antigens**

Figure 2-1: . Immunization and design of microarray experiments.....p.2-33

Figure 2-2: Normalized expression profile of selected genes in Ag-primed (H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup> and HYTet<sup>+</sup>) and unprimed (Tet<sup>-</sup>) CD8 T cells.....p.2-34

Figure 2-3: Validation by qrt-PCR and cytometry analysis of genes differentially expressed by anti-HY and anti-H7<sup>a</sup> T cells.....p.2-35

Figure 2-4: Asynchronous expansion of H7<sup>a</sup>- and HY-specific CD8 T cells.....p.2-36

Figure 2-5: Proportion of IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> and CD62L<sup>+</sup> T cells among H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup> and HYTet<sup>+</sup> T cells.....p.2-37

Figure 2-6: Proportion of 1B11<sup>+</sup> and KLRG1<sup>+</sup> T cells among H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup> and HYTet<sup>+</sup> T cells.....p.2-38

Figure 2-7: Anti-HY CD8 T cell responses following priming against HY and H7<sup>a</sup> or only against HY.....p.2-39

Table 2-I: Partial list of genes differentially expressed in H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup> vs Tet<sup>-</sup> CD8 T cells.....p.2-40

Table 2-II: Genes differentially expressed in H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup> relative to HYTet<sup>+</sup> CD8 T cells.....p.2-42

**Article # 3 : Two host factors regulate persistence of H7<sup>a</sup>-specific T cells injected in tumor-bearing mice**

Figure 3-1 : Experimental model and study design.....p.3-21

Figure 3-2 : Anti-H7<sup>a</sup> T cells accumulate in the tumor.....p.3-22

Figure 3-3 : T-cell proliferative dynamics from CFSE profiles.....p.3-23

Figure 3-4 : Persistence of H7<sup>a</sup>-specific CD8<sup>+</sup> memory T cells.....p.3-24

Figure 3-5 : Challenge of long-term chimeras with melanoma cells.....p.3-25

Figure 3-6 : Anti-H7<sup>a</sup> T-cell response following tumor challenge.....p.3-26

## Liste des abréviations

**AAT** : antigène associé aux tumeurs

**Ac** : Anticorps

**Ag** : Antigène

**AgMis** : Antigène mineur d'histocompatibilité

**CCDA** : Cytotoxicité dépendante des anticorps

**CEA** : Antigène carcino-embryonnaire

**CPA** : Cellules présentatrice d'antigène

**CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité

**CTL** : Lymphocytes T cytotoxiques

**DLI** : Injection de lymphocytes d'un donneur

**DMBA** : Diméthylbenzathracène

**Fas-L** : Ligand de la molécule Fas

**GVH** : Greffon versus l'hôte

**GVL** : Greffon versus la leucémie

**GVT** : Greffon versus la tumeur

**IFN $\gamma$**  : Interféron gamma

**IL** : Interleukine

**I.P.** : Intra péritonéale

**I.V.** : Intraveineuse

**LMC** : Leucémie myéloïde chronique

**MCA** : Méthylcholanthrène

**NK** : Cellules tueuse naturelle

**NKT** : Cellules T tueuse naturelle

**T $\gamma$  $\delta$**  : Lymphocytes T gamma delta

**TACH** : Transplantation allogénique de cellules hématopoïétiques

**TCM** : Cellule T mémoire centrale

**TCR** : Récepteur de cellule T

**TEM** : Cellule T mémoire effectrice

**Tet** : Tétramère

**TLR** : Récepteur de type toll

**TNF** : Facteur nécrosant de tumeur

**VCAM-1** : Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1

**VLA-4** : Antigène très tardif-4 (very late antigen-4)

## Remerciements

J'aimerais sincèrement remercier mon directeur de recherche, le Docteur Claude Perreault, pour m'avoir accordé la chance de faire partie de son équipe pendant quelques années et pour avoir su me guider de façon exceptionnelle tout au long de mon cheminement dans les sentiers de la recherche. Il a su m'appuyer dans les moments clés tout en me laissant suffisamment de latitude pour me permettre de développer mes aptitudes en recherche.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude à Chantal Baron pour ses précieux conseils, ses remarques toujours pertinentes, ainsi que pour son soutien technique et intellectuel tout au long de mon doctorat. Ce fût grandement apprécié et inspirant.

Je voudrais enfin remercier tous les membres du laboratoire : Isabelle Louis, Marie-Ève Blais, Jean-Sébastien Delisle, Étienne Caron et Martin Giroux, pour leur bonne humeur et pour avoir créé une ambiance de travail aussi stimulante m'ayant permis de mener à terme mes projets de recherche de façon très agréable.

Ce projet a été réalisé grâce au soutien financier de l'Institut National du Cancer du Canada.



# **1. INTRODUCTION**

# 1. INTRODUCTION

## 1.1. Immunologie reliée aux cancers

Depuis des siècles, le rôle principal attribué au système immunitaire était d'assurer une protection à l'hôte contre la multitude de pathogènes environnementaux auxquels il est quotidiennement confronté. Toutefois, il y a plus d'une quarantaine d'années, Lewis Thomas et Macfarlane Burnet ont proposé que le système immunitaire ait également un rôle à jouer dans la surveillance et la lutte face aux cellules tumorales. Selon eux, la victoire ou la défaite d'un hôte face à une tumeur dépend essentiellement de la balance entre la cinétique de croissance tumorale et la capacité à métastasier des cellules tumorales versus l'habileté de l'hôte à contrôler et à éliminer ces dernières. Ce contrôle tumoral est établi selon eux par le système immunitaire <sup>(95)</sup>. Cette hypothèse souleva l'enthousiasme de nombreux chercheurs à prime abord mais sa véracité fût rudement mise à l'épreuve lorsqu'on découvrit, quelques années plus tard, que les souris NUDE n'avaient pas une incidence accrue de cancers comparativement à des souris immunocompétentes syngéniques. En rétrospective, cette conclusion était prématurée à l'époque étant donné qu'il a par la suite été démontré que les souris NUDE, qu'on croyait dépourvues de lymphocytes, possèdent certaines cellules T et ont une immunité innée normale capable de prévenir le développement de cancers. Le modèle des souris NUDE utilisées à l'époque pour discréditer la théorie de l'immunosurveillance n'était donc pas un modèle adéquat pour le champ d'étude. Plusieurs évidences supportant cette théorie ont émergées au cours des dernières années et ont fait renaître un intérêt certain pour cette dernière. Depuis, les recherches intensives dans le domaine de l'immunothérapie ont permis de fusionner de nombreuses découvertes à cette

théorie originalement controversée et de faire la lumière sur le rôle potentiel de plusieurs types de cellules immunitaires face aux tumeurs. Conséquemment, il est aujourd'hui reconnu que les cellules du système immunitaire inné ainsi que les cellules de l'immunité adaptative ont chacune des qualités anti-tumorales bien spécifiques. Depuis plusieurs années, les chercheurs tentent d'exploiter ces qualités dans le développement de stratégies immunothérapeutiques.

### **1.1.1. Réponses anti-tumorales par le système inné**

Les cellules regroupées sous la bannière de l'immunité innée, incluant les cellules NK, NKT, les lymphocytes T gamma delta ( $\gamma\delta$ ), les macrophages et cellules dendritiques (CD), ont la responsabilité de surveiller et d'aviser l'hôte lorsque survient une brèche de l'intégrité tissulaire. Elles réalisent cette lourde tâche grâce à leur capacité à déceler des signaux de danger et à répondre à ceux-ci très rapidement. Dans un contexte tumoral, ces signaux peuvent être engendrés par le stress génotoxique relié à la transformation cellulaire ou encore à la destruction du microenvironnement entourant les cellules tumorales. Dans des conditions idéales, ces signaux vont induire de l'inflammation, laquelle va activer d'avantage les cellules effectrices innées ayant une activité tumoricide et stimuler les cellules présentatrices d'antigène (CPA), particulièrement les CD, à engouffrer les cellules nécrotiques tumorales et les antigènes (Ag) provenant de tumeurs. Celles-ci vont ensuite devenir matures et migrer dans les ganglions lymphatiques de façon à déclencher une réponse immunitaire adaptative orchestrée par les lymphocytes T et B. Certaines cellules immunitaires innées, telles les cellules tueuses naturelles (NK), sont aussi munies de fonctions effectrices intrinsèques leur permettant de lyser directement les cellules tumorales. Elles sont également capables de produire rapidement d'importantes quantités de cytokines inhibant la croissance tumorale ou

bloquant l'angiogénèse. Elles y parviennent suite à la reconnaissance, via des récepteurs activateurs et inhibiteurs, de ligands à la surface des cellules tumorales. Parmi ces récepteurs on retrouve, par exemple, sur les cellules NK, NKT et T  $\gamma\delta$  le récepteur activateur NKG2D. Ce dernier reconnaît les protéines MIC ou ULBP surexprimées sur plusieurs types de cellules tumorales <sup>(153)</sup>. On retrouve également, sur les cellules NK, un récepteur inhibiteur reconnaissant le CMH de classe I à la surface des cellules. En absence de ce signal d'inhibition, les cellules NK s'activent également <sup>(38, 123)</sup>. Cette situation survient dans plusieurs cas de cancers étant donné que certaines cellules tumorales ont tendance à diminuer significativement l'expression des molécules du CMHI à leur surface. Ainsi, suite à cette absence d'inhibition ou à la reconnaissance via un récepteur activateur, les cellules NK, NKT et lymphocytes T  $\gamma\delta$  vont s'activer, sécréter des cytokines ainsi que de la perforine permettant de lyser les cellules exprimant l'Ag ayant déclenché cette cascade d'événements : les cellules tumorales.

Étant donné les qualités anti-tumorales du système inné, deux grandes approches ont été développées pour tenter de les exploiter. La première approche consiste à exploiter directement les cellules effectrices innées ayant une activité tumoricide directe telles les cellules NK, NKT et T $\gamma\delta$ . La seconde approche consiste à utiliser les CPA afin de promouvoir les réponses innées ou encore de déclencher les réponses adaptatives.

Ainsi, tel que mentionné précédemment, certains chercheurs ont donc tenté d'exploiter les cellules innées ayant des capacités tumoricides ou d'utiliser leurs produits dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-tumorales. La première stratégie développée consistait à utiliser une cytokine abondamment produite lors des réponses immunitaires innées : l'interleukine-12 (IL-12), afin d'augmenter l'état d'activation des

cellules effectrices innées. Cette idée est née suite à l'observation suivante. Suite à leur activation, les cellules NK, NKT et cellules  $T\gamma\delta$  produisent d'importantes quantités d'interféron gamma ( $IFN\gamma$ )<sup>(38, 58, 172)</sup>. Cette cytokine exerce une activité anti-tumorale et stimule les autres cellules du système inné, incluant les macrophages et les CD, à produire de l'IL-12. L'IL-12 va à son tour activer d'avantage les cellules réalisant la réponse innée<sup>(125)</sup>. Ce mécanisme d'activation en boucle est hautement important dans l'orchestration d'une réponse anti-tumorale innée car il assure que chaque cellule impliquée soit maintenue dans un état d'activation. L'importance de l'IL-12 dans la lutte aux tumeurs a été démontrée grâce à des études réalisées chez des souris déficientes en IL-12. Ces dernières présentaient une incidence accrue de tumeurs induites expérimentalement<sup>(177)</sup>. Étant donné la capacité de l'IL-12 à amplifier les réponses anti-tumorales, des études ont donc été entreprises afin de mettre à profit les connaissances acquises face à cette cytokine. Des chercheurs ont donc procédé à l'injection systémique d'IL-12 à des souris souffrant de tumeurs. Cette approche est apparue prometteuse lors des essais murins<sup>(73)</sup>. Toutefois il fallu mettre de côté cette option pour l'humain suite à la réalisation qu'une toxicité hépatique lui était associée<sup>(223)</sup>. Étant donné que la stratégie visant à utiliser l'IL-12 ne s'est pas avérée possible, les chercheurs se sont ensuite tournés vers l'idée de faire proliférer et d'activer les cellules NK *in vitro* en les cultivant avec de l'IL-2 pour ensuite les injecter en grands nombres aux patients. Cette approche a généré des réponses anti-tumorales notables ainsi que la rémission complète chez certains patients<sup>(157)</sup>. Malheureusement, ce dénouement favorable était également souvent accompagné d'une toxicité parfois considérable, largement due à la relâche d'importantes quantités de facteur nécrosant de tumeur (TNF) par les cellules NK activées. C'est pourquoi cette seconde stratégie fût également mise à l'écart, à l'exception de certaines tumeurs particulières tel le carcinome du rein ou le cancer avancé de l'estomac<sup>(89)</sup>. Certaines études ont également porté sur l'activation sélective des cellules NKT grâce à l'utilisation du glycolipide alpha-galactoside céramide ou des cellules  $T\gamma\delta$  par

l'administration de composés biphosphates. Ces deux nouvelles stratégies ont généré des résultats prometteurs lors des essais préliminaires <sup>(132, 211)</sup>.

Récemment, des chercheurs ont également cherché à induire des réponses anti-tumorales innées en modifiant de façon importante des cellules NK humaines. Ils ont donc modifié ces cellules NK de façon à ce qu'elles expriment un récepteur chimérique constitué d'un fragment d'immunoglobuline fusionné à la chaîne zêta habituellement associée au TCR dirigé contre l'Ag carcino-embryonnaire (CEA) exprimé par la tumeur. Cette méthode leur a permis d'obtenir des cellules NK capables de lyser des cellules de carcinome du colon *in vitro* et d'inhiber la croissance tumorale *in vivo* suite à un transfert adoptif chez des souris NOD-SCID <sup>(164)</sup>. De telles modifications pourraient être ainsi envisagées pour le traitement de tumeurs CEA+.

Dans un autre ordre d'idées, des chercheurs ont tenté d'amplifier les réponses immunes face aux cancers en administrant certains adjuvants directement à l'intérieur des tumeurs solides de façon à induire de l'inflammation et à recruter des cellules immunes effectrices. Cette approche est encore aujourd'hui couramment utilisée dans le traitement du carcinome de la vessie et a été utilisée dans le traitement du mélanome et des tumeurs neurologiques. Il est maintenant bien reconnu que plusieurs de ces adjuvants contiennent des produits bactériens tels des lipopolysaccharides (LPS) ou encore des oligodéoxynucléotides contenant des motifs CpG reconnus par les récepteurs 'toll like' (TLR) à la surface des cellules innées, qui induisent la production de cytokines pro-inflammatoires et facilitant les interactions productives entre les réponses innées et les réponses immunes adaptatives <sup>(180)</sup>. Des connaissances plus approfondies des événements moléculaires et cellulaires menant au recrutement et à l'activation des cellules immunes suggèrent que les obstacles rencontrés au

site tumoral peuvent être contournés et l'immunité anti-tumorale peut être initiée en procurant les cytokines pro-inflammatoires ainsi que les chémokines au site où se développe une tumeur solide <sup>(78)</sup>. Nos connaissances visant à mettre à profit de tels chémoattractants et activateurs sont encore relativement rudimentaires, mais l'expression de certaines molécules telle LIGHT peut convertir un microenvironnement réfractaire au développement d'une réponse immune en un environnement hautement immunogène dans des modèles murins. D'un autre côté, l'administration systémique d'autres activateurs de l'immunité innée s'est déjà montrée prometteuse cliniquement. L'IFN $\alpha$  inhibe directement la croissance tumorale, augmente la maturation des cellules dendritiques et, malgré une certaine toxicité, est utilisé dans le traitement de certaines malignités tel le carcinome du rein ainsi que la leucémie myéloïde chronique (LMC) <sup>(200)</sup>.

Tel que mentionné précédemment, la seconde approche visant à exploiter les réponses innées consiste à manipuler les CPA capables de déceler une tumeur. Dans cet ordre d'idée, des chercheurs ont donc tenté d'augmenter les nombres de CPA. Pour ce faire, ils ont fourni aux patients le ligand du récepteur de tyrosine kinase Flt-3, exprimé par les précurseurs hématopoïétiques. Le traitement des patients cancéreux avec le ligand soluble de Flt-3 a généré de fortes augmentations du nombre de DC circulantes, mais ces dernières n'étaient pas activées et n'arrivaient donc pas à générer de réponses immunes <sup>(140)</sup>. On a donc ensuite tenté de fournir en parallèle des signaux d'activation des DC afin d'induire de fortes réponses adaptatives. Cette idée porta fruits étant donné que l'administration systémique d'agonistes des TLR ainsi que des anticorps (Ac) dirigés contre CD40 ont induit une bonne activation des DC et des réponses anti-tumorales curatives dans des modèles murins et sont à l'étude au niveau clinique <sup>(101)</sup>.

### 1.1.2. Traitement du cancer à l'aide des lymphocytes B

Les lymphocytes B possèdent également un potentiel anti-tumoral. En effet, l'activation des lymphocytes B entraîne une importante sécrétion d'anticorps (Ac) capables de lier des protéines antigéniques à la surface des cellules tumorales. Cette liaison permet à son tour d'initier la lyse cellulaire orchestrée par le complément et de lier les cellules NK ou les macrophages à la tumeur de façon à induire la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (CCDA). De plus, ils interfèrent avec la croissance tumorale en bloquant la survie, en induisant des signaux d'apoptose ou encore en augmentant l'immunogénécité en facilitant la prise et la présentation des antigènes (ag) tumoraux par les CPA <sup>(140)</sup>. Pour ces raisons, l'augmentation des réponses par les cellules B *in vivo* ou l'injection de grandes quantités d'Ac générés *in vitro* a le potentiel de promouvoir les réponses anti-tumorales. C'est pourquoi plusieurs chercheurs ont orienté leurs études dans cette direction. L'un des premiers Ac monoclonaux murins utilisé dans un but thérapeutique anti-tumoral chez l'humain était dirigé contre le récepteur de l'IL-2 exprimé par plusieurs leucémies et lymphomes T, ainsi que par les lymphocytes T normaux proliférant rapidement. Quoique prometteuse, cette stratégie a été malheureusement confrontée à plusieurs déceptions <sup>(201)</sup>. Des recherches intensives ont par la suite permis d'élucider les raisons de ces échecs. L'immunogénécité des protéines murines ainsi que la modulation des Ag cibles avaient été sous-estimées. Ces échecs ont heureusement pu être surmontés grâce à l'avènement de technologies permettant de modifier au niveau moléculaire les Ac de souris injectés à l'humain en éliminant les séquences murines immunogènes et en augmentant leur efficacité et leur nombre. Ceci a fait en sorte que de nos jours un nombre grandissant d'Ac monoclonaux font partie des pratiques cliniques <sup>(199)</sup>. Un des Ac les plus utilisés, le rituximab, se lie à CD20 et, lorsqu'il est administré seul ou en combinaison avec de la



chimiothérapie, permet d'induire d'important taux de rémission chez des patients atteints de lymphomes B, par un mécanisme impliquant la CCAD <sup>(35)</sup>. Certains Ac peuvent également médier une immunité anti-tumorale indépendante des cellules effectrices. Pour ce faire, ces Ac vont bloquer directement des signaux nécessaires à la survie ou déclencher l'apoptose des cellules tumorales. Parmi ceux-ci on retrouve deux Ac monoclonaux approuvés en clinique réagissant contre le récepteur Her-2/Neu exprimé par les cellules du cancer du sein et le récepteur du facteur de croissance présent sur les tumeurs épithéliales <sup>(17)</sup>. Ces Ac ont un bienfait thérapeutique en bloquant la croissance tumorale. L'activité anti-tumorale des Ac monoclonaux peut également être amplifiée en les couplant à des radio-isotopes ou des drogues ou encore en les modifiant de façon à générer des Ac bispécifiques recombinant capables de lier simultanément une cellule tumorale et d'activer un récepteur à la surface d'une cellule immune tel CD3 ou FcR <sup>(199, 29)</sup>.

Des études ont démontré que le sérum de nombreux patients contient des Ac capables de réagir contre leur tumeur. Toutefois, lors d'une stimulation des lymphocytes B chez un patient, l'effet anti-tumoral risque d'être limité par la quantité d'Ac produits *in vivo*. C'est pourquoi plusieurs chercheurs ont tenté d'amplifier cette activation des cellules B de façon à augmenter le nombre d'Ac générés. La façon la plus simple de stimuler de telles réponses *in vivo* est de procurer des Ag tumoraux sous forme de vaccins, en les mélangeant avec des adjuvants ou conjuguant avec des Ag qui déclenchant une réponse des lymphocytes T auxiliaires <sup>(199)</sup>. De plus, d'autres approches alternatives visant à activer ou amplifier les réponses B *in vivo* par liaison de molécules de co-stimulation telles CD40 ou par administration de cytokines favorisant la prolifération des cellules B telle l'IL-4 ont aussi été investiguées <sup>(161)</sup>. Malheureusement elles n'ont pas amené de résultats intéressants dans les modèles précliniques et pourraient potentiellement être associées au développement d'Ac

auto-réactifs dangereux. Ainsi, dans un avenir prévisible, la thérapie humorale sera dominée par l'administration passive d'Ac monoclonaux spécifiques à certains Ag tumoraux.

### **1.1.3. L'immunothérapie du cancer faisant appel aux lymphocytes T.**

#### **1.1.3.1. Généralités**

Depuis plusieurs années, les recherches visant à utiliser les lymphocytes T dans la lutte face au cancer se sont largement intensifiées. Ceci est indéniablement dû au fait que les lymphocytes T possèdent certaines caractéristiques les rendant extrêmement attrayants en immunothérapie du cancer. Tout d'abord, grâce à leur récepteur de surface (TCR), les lymphocytes T sont capables de reconnaître des peptides anormalement exprimés et présentés par le CMH à la surface des cellules tumorales. Deuxièmement, suite à la reconnaissance de ces peptides, les lymphocytes T s'activent et prolifèrent rapidement et massivement de façon à augmenter les effectifs capables de répondre aux cellules exprimant ces peptides. Troisièmement, les lymphocytes T ont acquis au cours de l'évolution tout un arsenal de molécules leur permettant d'éliminer les cellules malades exprimant ces peptides. Parmi ces molécules on retrouve des cytokines et molécules pro-apoptotiques telles l'IFN, le TNF et Fas. Ils possèdent également des molécules exerçant une cytotoxicité directe telles perforine et granzymes. Ces molécules permettent une élimination des cellules malades suite à leur reconnaissance par les lymphocytes T et à leur activation. Finalement, suivant l'élimination des cellules cibles, les lymphocytes T ont le potentiel de générer une mémoire immunologique à long terme. Ceci minimise de façon importante les risques de rechute reliées à la persistance de cellules tumorales<sup>(92, 140)</sup>.

La séquence d'événements menant à l'élimination de cellules néoplasiques est initiée par la reconnaissance de peptides à la surface des cellules tumorales par les lymphocytes T. Lors d'une transformation maligne, les cellules peuvent subir plusieurs altérations génétiques. Certaines de ces altérations peuvent amener une modification au niveau du répertoire de peptides présentés par les molécules du CMH à la surface des cellules néoplasiques. Ce processus de transformation donne ainsi naissance à des antigènes associés aux tumeurs (AAT)<sup>(140)</sup>. Ces Ag peuvent provenir de protéines codées par des virus associés aux tumeurs, de protéines cytosoliques mutées ou de protéines ayant une expression sélective ou étant surexprimées par certaines cellules tumorales. Il peut s'agir d'Ag tumoraux uniques tels ceux provenant de mutations ou encore de l'oncogenèse virale. Il peut également s'agir d'Ag du soi tels ceux issus d'une surexpression protéique ou d'Ag habituellement exprimés de façon tissu spécifique ou encore d'Ag de différenciation.<sup>(156)</sup>

Plusieurs études réalisées au cours des dernières années ont su mettre en lumière cette capacité qu'ont les lymphocytes T à reconnaître les tumeurs. Ainsi, des travaux récents ont rapporté une incidence accrue de tumeurs chez des souris souffrant de déficiences affectant les lymphocytes T. Dans cette ligne d'idées, le groupe du docteur R. Schreiber a observé une plus grande incidence de tumeurs spontanées, ainsi que de tumeurs induites par le méthylcholanthrène (MCA), chez des souris déficientes pour le gène RAG2, dépourvues de lymphocytes T et B<sup>(167)</sup>. Ce même groupe a démontré que ces résultats étaient également applicables aux souris déficientes pour le gène STAT1, une molécule essentielle à la signalisation de l'IFN- $\gamma$ <sup>(167)</sup>. Une plus grande incidence de tumeurs a également été observée chez des souris déficientes en perforine, par le groupe de H. Hengartner<sup>(188)</sup>. Ceci a également été observé chez des souris déficientes au niveau du récepteur à l'INF- $\gamma$ <sup>(95)</sup>. De plus, la théorie de l'immunosurveillance est supportée par des observations réalisées par le

groupe de docteur Girardi. Cette équipe a démontré que, suite à une injection intradermique de MCA ou de diméthylbenzathracène (DMBA), l'incidence de carcinomes cutanés était augmentée chez des souris déficientes en cellules T<sup>(57)</sup>. Finalement, le groupe du docteur J.A. Trapani a montré une incidence accrue de néoplasies affectant différentes lignées cellulaires lymphoïdes chez des souris déficientes en perforine<sup>(173)</sup>. Ils ont démontré que ces souris étaient mille fois plus susceptibles à des lymphomes que des souris immunocompétentes chez qui le rejet des tumeurs était contrôlé par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup><sup>(173)</sup>. Cette étude démontre ainsi que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, par la cytotoxicité directe, jouent un rôle dans la régulation de certains lymphomes.

Ces exemples ont donc clairement démontré que les lymphocytes T sont capables d'exercer naturellement un certain contrôle tumoral. Toutefois, ceci n'est pas toujours suffisant pour empêcher un développement tumoral. C'est pourquoi, au cours des dernières années, les stratégies visant à augmenter les réponses T se sont multipliées. Les chercheurs ont tout d'abord essayé de développer des vaccins permettant de présenter les AATs de façon à ce qu'ils soient immunogènes et capables de générer des réponses T *in vivo*. Ainsi, ils ont donc utilisé des CD activées afin de présenter ces Ag. Trois méthodes ont été utilisées pour réaliser ceci. Selon la première méthode, les CDs étaient tout d'abord isolées de l'hôte. On introduisait ensuite les Ag tumoraux sélectionnés *ex vivo* et finalement les CDs étaient ré-administrées à l'hôte. La seconde méthode consistait à inoculer à l'hôte des cellules tumorales mortes et modifiées pour sécréter des facteurs tel le GM-CSF qui favorise l'accumulation de CDs<sup>(56)</sup>. La troisième méthode consistait à injecter avec l'Ag des activateurs de DCs tels les ligands de TLR ou des Ac dirigés contre CD40. Finalement, la quatrième méthode consistait à injecter des vecteurs recombinant fournissant à la fois l'Ag et les stimuli au système immunitaire inné pour qu'il puisse adéquatement déclencher une réponse adaptative<sup>(139)</sup>.

Cette dernière catégorie, abordée précédemment, inclus donc les plasmides d'ADN contenant l'Ag et des séquences CpG co-stimulatrices ainsi que des pathogènes recombinants atténués tels des adénovirus ou *Listeria monocytogenes (LM)*, qui expriment l'Ag et procurent des ligands de TLRs permettant de déclencher une réponse innée capable de stimuler le système adaptatif <sup>(139)</sup>. Les études précliniques ayant utilisé ces méthodes ont démontré le rejet de masses tumorales et les essais cliniques ayant exploité ces stratégies ont engendré de l'enthousiasme à partir de quelques régressions tumorales occasionnelles <sup>(96, 131, 158)</sup>. Toutefois, dans la majorité des cas, les bénéfices cliniques reliés à une réponse aux vaccins étaient très limités ou inexistantes. Des progrès devront donc être réalisés afin de maintenir l'activation de CD8 ou de modifier la présentation antigénique *in vivo* avant de pouvoir utiliser ce mode de traitement en clinique. Étant donné les résultats relativement décevants reliés à la vaccination, les chercheurs se sont ensuite tournés vers la possibilité de bloquer les signaux négatifs émanant des tumeurs et limitant les réponses T. Pour ce faire ils ont procédé à l'injection d'Ac bloquant CTLA-4, un régulateur négatif des réponses T. Cette technique fût accompagnée de résultats favorables dans les modèles murins et quelques essais cliniques. En effet, les hôtes ayant reçu de tels Ac présentaient des infiltrations lymphocytaires importantes de leur tumeur, accompagnées de régression complète chez certains patients <sup>(76, 146, 191)</sup>. Malheureusement, outre l'effet bénéfique, l'injection d'Ac dirigés contre CTLA-4 était également accompagnée de dommages collatéraux non négligeables qui ont limité l'utilisation de cette stratégie anti-tumorale <sup>(1)</sup>. Toujours dans l'optique de bloquer les signaux limitant le développement de réponses cytotoxiques anti-tumorales, les chercheurs se sont par la suite tournés vers les lymphocytes T régulateurs. Il s'agit de lymphocytes T CD4+ exprimant la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2, CTLA-4 et le facteur de transcription Foxp3. Les lymphocytes T régulateurs, inhibant les réponses T cytotoxiques, ont été observés dans de nombreux cancers <sup>(140)</sup>. Quoique prometteuses à prime abord, les études réalisées dans des modèles murins ciblant l'ensemble des cellules

exprimant la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2, ont été décevantes dans l'ensemble étant donné que les lymphocytes T CD8 et CD4 activés expriment également ce récepteur. Ainsi, l'injection d'un Ac bloquant ce récepteur bloquait par le fait même le développement des réponses adaptatives anti-tumorales. Les chercheurs ont donc par la suite tenté de cibler d'autres molécules qui pourraient permettre une déletion spécifiques des cellules T régulatrices<sup>(178)</sup>. Par contre, comme pour la déplétion de CTLA-4, l'élimination globale des T régulateurs est également accompagnée d'auto-immunité<sup>(206)</sup>. L'application d'une telle technique chez l'humain nécessitera probablement une ablation de sous populations ciblées de cellules T régulateurs.

Étant donné les résultats décevants reliés à la vaccination dû au manque d'immunogénéicité des AATs, à la perte d'expression de ces TAAs en cours de réponse ou à l'absence de lymphocytes T du répertoire immun du patient, les chercheurs ont donc par la suite tenté de développer une méthode permettant de contourner ces facteurs limitant les bienfaits thérapeutiques. Ils en sont venus à la conclusion que le transfert de lymphocytes T allogéniques par transplantation de moelle osseuse constituait une excellente option.

### **1.1.3.2. Le transfert adoptif de lymphocytes T**

La transplantation de moelle osseuse allogénique constitue aujourd'hui un standard thérapeutique pour plusieurs cancers hématologiques. Il s'agit de substituer la moelle osseuse d'un patient, éliminée par de fortes doses d'irradiation et de chimiothérapie, par une moelle osseuse saine provenant d'un donneur allogénique. Lors d'un tel transfert, le patient reçoit donc une suspension cellulaire hétérogène dans laquelle se retrouvent des cellules souches

hématopoïétiques capables de régénérer l'hématopoïèse chez le receveur ainsi que différents types cellulaires déjà bien différenciés tels que les lymphocytes T. Certains de ces lymphocytes T, présents dans le répertoire du donneur allogénique, sont capables de reconnaître des épitopes différents exprimés à la surface des cellules néoplasiques ou des cellules normales de l'hôte. Ce faisant ils peuvent orchestrer deux types de réponses. La première, appelée réaction du greffon contre l'hôte (GVH), correspond à la reconnaissance d'épitopes à la surface des cellules normales de l'hôte. La seconde, appelée réaction du greffon contre la tumeur (GVT), correspond à la reconnaissance d'épitopes à la surface des cellules tumorales par les lymphocytes T. Les lymphocytes T sont les principales cellules responsables de ces effets. Ainsi, l'élimination des lymphocytes T du greffon avant le transfert au patient entraîne la perte de l'effet anti-tumoral et de la réaction du greffon contre l'hôte<sup>(4, 44, 79, 117)</sup>. Lors d'une transplantation, lorsque le donneur et le receveur sont CMH-identiques, ils diffèrent toutefois au niveau des peptides présentés par ce dernier. Dans de telles circonstances, l'effet anti-tumoral serait dû à la reconnaissance, par les lymphocytes T du donneur, de deux types de peptides présentés à la surface des cellules cancéreuses : les antigènes mineurs d'histocompatibilité (AgMis) et les AATs décrits précédemment. Étant donné que l'effet anti-tumoral est beaucoup moins puissant lors d'une transplantation entre jumeaux identiques, ceci supporte l'idée que l'effet anti-tumoral généré suite à un tel traitement est principalement dû à la reconnaissance d'AgMis.

Lors d'une transplantation de moelle osseuse standard, les lymphocytes T transférés sont dans un état naïf. Ainsi, les cellules T naïves requièrent du temps afin d'acquérir les fonctions effectrices assurant l'élimination des cellules malignes. De plus, leur nombre est relativement restreint et la phase d'expansion clonale permettant d'accroître ce nombre requiert également un certain temps. Ceci explique en partie pourquoi certains patients

succombent à leur tumeur malgré la présence de lymphocytes T capables de reconnaître les cellules malignes. Il est possible de palier ceci en injectant au patient une suspension purifiée de lymphocytes T (DLI) déjà pré-activés *in vitro* avant d'être injectés. Ainsi, les CDs présentant l'Ag peuvent être utilisées pour obtenir les lymphocytes T réactifs face à la tumeur, qui peuvent ensuite être stimulés par des Ac dirigés contre CD3 et CD28 <sup>(72)</sup>. Des cytokines sont également fournies durant la culture cellulaire afin de supporter la prolifération des lymphocytes, leur survie et leur différenciation. Ceci permet d'obtenir de nombreux lymphocytes capables de répondre à la tumeur rapidement et de générer des régressions tumorales notables dans plusieurs cas. Ceci a été démontré dans de nombreuses études cliniques <sup>(16, 37, 70)</sup> et aussi dans certains modèles d'infections virales, notamment contre le cytomégalo virus et le virus Epstein-Barr <sup>(74, 202)</sup>. Les lymphocytes T ont donc un potentiel thérapeutique à considérer dans le développement de stratégies anti-tumorales. Toutefois, dans plusieurs cas des cancers se développent malgré la présence de lymphocytes T théoriquement aptes à répondre à une tumeur. Les tumeurs peuvent empêcher le développement d'une réponse T efficace en interférant à cinq niveaux de la réponse T.

### 1.1.3.3. Mécanismes d'évasion tumorale

Il peut ainsi arriver qu'une réponse immunitaire efficace ne se développe pas contre certains cancers et ce, malgré la présence de lymphocytes T. Cinq raisons pourraient soutenir ceci <sup>(18, 36, 39, 54, 103, 134, 136, 138, 144, 154, 173, 217, 218, 225)</sup>. Tout d'abord, il peut arriver que les lymphocytes T capables de répondre aux cellules tumorales soient trop peu nombreux ou que les peptides exprimés par les tumeurs ne soient pas assez immunogènes pour déclencher une réponse immune. En second lieu, l'absence de réponse des lymphocytes T peut également être reliée à la localisation de certaines tumeurs extra-lymphoïdes. Troisièmement, les cellules



tumorales peuvent également être tolérées par le système immunitaire en inhibant, par sécrétion de divers facteurs et cytokines, les réponses T. Quatrièmement, les cellules tumorales peuvent aussi empêcher l'activation complète des cellules T. Finalement, certaines tumeurs peuvent induire la destruction des cellules effectrices entrant dans l'environnement tumoral. Ces niveaux d'interférence sont abordés dans les paragraphes suivants. Chacun présente des particularités propres mais tous peuvent agir de façon synergique et s'entrecouper. La résultante demeure néanmoins la même dans la majorité des cas : croissance tumorale. Il est donc crucial de considérer ces paramètres lors du développement de stratégies anticancéreuses utilisant les lymphocytes T.

Les cellules tumorales prolifèrent extrêmement rapidement et la fréquence de lymphocytes T réactifs dans le répertoire de l'hôte peut, dans certains cas, être trop faible pour permettre une expansion assez rapide et suffisamment grande des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) pour permettre d'éliminer la tumeur croissante. Ainsi, l'incapacité du système immunitaire face à l'élimination des tumeurs peut être en partie due à l'absence fonctionnelle de CTL spécifiques à la tumeur. Tel que mentionné précédemment, ce problème peut être contourné en injectant des suspensions cellulaires de lymphocytes T au patient.

Les cellules T réactives contre des épitopes tumoraux peuvent également ne pas réagir *in vivo* à cause de changements des niveaux d'expression de ces épitopes, ou encore, les Ag tumoraux peuvent également être masqués par d'autres protéines et ainsi être tolérés par les cellules T<sup>(140)</sup>. De plus, la tolérance face à certaines tumeurs peut aussi être due à une délétion des thymocytes dans le thymus. En effet, certains Ag spécifiques à des tumeurs peuvent entrer dans la circulation lorsque la charge tumorale est très grande et aller jusqu'au thymus où ils seront présentés par les cellules épithéliales thymiques. Ceci va donc induire la délétion (sélection) des thymocytes capables de réagir contre certains Ag tumoraux et donc

empêcher la génération de lymphocytes T matures capables de détruire la tumeur <sup>(103)</sup>. De plus, les cellules tumorales peuvent exprimer des Ag tumoraux associés au soi. Donc, à moins d'une modification portant sur les niveaux d'expression d'un peptide du soi donné ou encore d'une mutation permettant de générer un nouveau peptide, les cellules T ont été éduquées pour tolérer ces peptides du soi. Ainsi les cellules tumorales sont souvent tolérées par le système immunitaire étant donné qu'elles expriment des peptides du soi face auxquels les lymphocytes T ont été éduqués.

Pour être activés et acquérir les molécules effectrices (perforine, granzymes, IFN $\gamma$ , FasL) nécessaires à l'élimination des cellules néoplasiques, les lymphocytes T naïfs doivent tout d'abord rencontrer des CPA professionnelles présentant des peptides tumoraux dans les organes lymphoïdes secondaires <sup>(140)</sup>. En absence d'activation, ces lymphocytes T naïfs ne pourront pas être activés et migrer au sein de la tumeur et cette dernière pourra continuer de croître. L'induction ou l'absence de réponse de la part des lymphocytes T peut donc également être reliée à la localisation extra-lymphoïde de la tumeur elle-même. Dans plusieurs cas, la tumeur n'est pas dans un environnement favorisant une réponse anti-tumorale ; ou encore, l'arrivée de métastases tumorales aux organes lymphoïdes secondaires favorisant une réponse anti-tumorale survient trop tard pour induire une réponse curative *in vivo*. Ainsi, les tumeurs extra lymphatiques, strictement périphériques peuvent être ignorées et tolérées par le système immunitaire <sup>(134, 173, 225)</sup>. En ce sens, les travaux de Ochsenbein et coll. ont démontré que plusieurs tumeurs solides périphériques, telles certains sarcomes et carcinomes, sont pour cette raison tolérées par le système immunitaire <sup>(134)</sup>.

Le stroma tumoral peut également influencer la visibilité ou l'accès à la tumeur par le système immunitaire. L'accès des lymphocytes T au lit de la tumeur dépend de l'extravasation de ces derniers par une série de molécules d'adhésion. L'absence de certaines

de ces molécules d'adhésion, telles la L-sélectine ou des membres de la famille des intégrines, sur les cellules du lit vasculaire tumoral, a été associée à la perte de l'immunogénéicité de la tumeur étant donné que les cellules T ne peuvent pas s'y rendre <sup>(138)</sup>. De plus, les lymphocytes T naïfs ne possèdent pas les molécules leur permettant de circuler dans les organes périphériques. Cet obstacle peut être surmonté par l'activation des lymphocytes préalablement à leur injection chez un patient.

Afin d'éliminer les cellules tumorales, les lymphocytes T doivent reconnaître leur Ag à la surface des cellules cibles présentés par les molécules CMH. Toutefois, sous la pression sélective, il a été démontré que certaines cellules tumorales échappent au système immunitaire en perdant ou en diminuant l'expression des molécules du CMHI <sup>(19, 36, 39, 54, 136, 144, 217)</sup>. Ceci rend donc la reconnaissance par les cellules T spécifique impossible. De plus, des études menées par les Dr Greenberg et Riddell portant sur le mélanome ont démontré que certaines cellules tumorales empêchent également la reconnaissance par les lymphocytes T en diminuant ou en perdant l'expression du peptide cible (MelanA) présenté par le CMHI à la surface des cellules de mélanome. Ainsi, les cellules T CD8 dans ces modèles ne peuvent pas reconnaître et éliminer les cellules tumorales <sup>(154, 218)</sup>.

Les mécanismes mentionnés précédemment ne peuvent pas être tenu responsables de tous les échecs immunitaires face aux tumeurs. Dans d'autres circonstances, la stimulation efficace des cellules T peut être gênée par certains facteurs immunosuppresseurs ou inhibiteurs. Dans un tel cas, les cellules immunitaires sont capables de reconnaître les cellules néoplasiques mais ne sont pas stimulées efficacement et ne détruisent donc pas les cellules tumorales. Parmi les facteurs inhibiteurs sécrétés par certaines cellules tumorales ou leur stroma on retrouve le TGF $\beta$  (tumor growth factor beta). Ce dernier est une cytokine pléiotropique ayant plusieurs propriétés immunosuppressives <sup>(110)</sup>. Ces propriétés incluent l'inhibition de la

prolifération des cellules T, inhibition de la différenciation des cellules T en lymphocytes cytotoxiques et inhibition des fonctions des CPA. Une étude récente a démontré qu'il était possible d'induire l'élimination de tumeurs en bloquant la signalisation du TGF $\beta$  à l'intérieur des cellules T anti-tumorales <sup>(59)</sup>. Ce mécanisme d'échappement au rejet par le système immunitaire semble donc réversible. D'autres études ont également démontré que plusieurs types de cellules tumorales régulent les réponses immunes adaptatives et innées par la signalisation via le facteur de transcription Stat-3. Selon ces études, l'activation constitutive de Stat-3 supprime l'expression par la tumeur de médiateurs pro-inflammatoires. En absence d'inflammation, les CD8 ne s'activent pas, n'expriment donc pas de molécules de co-stimulation et induisent la tolérance des cellules T <sup>(8, 175, 204)</sup>. Finalement, plusieurs tumeurs sécrètent également de l'IL-10 ou des prostaglandines. Ces deux facteurs sont également reconnus pour inhiber les fonctions immunes.

L'engagement du récepteur NKG2D par les ligands associés aux tumeurs peut promouvoir le rejet tumoral en stimulant les réponses innées et adaptatives <sup>(153)</sup>. Chez l'humain, NKG2D est exprimé sur la plupart des cellules NK, les cellules T $\gamma\delta$  et les cellules T CD8 $\alpha\beta$ . Les ligands de NKG2D incluent les molécules MIC A et MIC B, fonctionnant comme signaux de stress. Ces molécules sont absentes sur la plupart des cellules et tissus mais sont fréquemment exprimées sur les tumeurs épithéliales <sup>(153)</sup>. L'engagement de MIC et de NKG2D active les cellules NK (récepteur activateur) et procure un signal de co-stimulation aux cellules T spécifiques à l'Ag. Une étude du groupe du Dr Groh a démontré que la liaison de MIC induit l'endocytose et la dégradation de NKG2D. De plus, certaines tumeurs sécrètent des molécules MIC solubles. En se liant à son récepteur, le MIC soluble engendre donc la disparition du récepteur à la surface des cellules NK et bloque l'activation des cellules T. Ceci bloque donc de façon importante les réponses immunes innées et acquises face à certaines tumeurs <sup>(65)</sup>.

L'activation complète des lymphocytes T naïfs ne requiert pas seulement un signal fourni par l'engagement du récepteur T (TCR) par des complexes CMH-peptide spécifiques, mais aussi un second signal co-stimulateur livré par les CPA professionnelles (principalement les CD80/86). L'engagement du TCR en absence de ce second signal génère des lymphocytes T anergiques. La majorité des cellules tumorales ne sont pas des CPA professionnelles et plusieurs présentent peu de molécules de co-stimulation. Ainsi, certaines tumeurs, tels certains lymphomes B, permettent une présentation antigénique et une reconnaissance par le TCR adéquate. Toutefois, l'absence de molécules de co-stimulation à la surface de celles-ci peut également mener à l'absence de réponse des lymphocytes T spécifiques réactives suite à l'induction d'une anergie <sup>(32, 33, 80, 165, 187)</sup>.

Certaines tumeurs s'engagent également dans la modulation et la suppression active des fonctions effectrices des cellules immunes. Le ligand de Fas (Fas-L) est une molécule clé dans le développement immun normal et dans l'homéostasie du système immunitaire. La liaison à son récepteur (CD95) induit l'apoptose. Ce signal de mort médié par Fas a plusieurs rôles immunologiques importants. L'apoptose médiée par Fas est impliquée dans la délétion clonale des thymocytes et dans l'acquisition de la tolérance, dans la mort des cellules T induite par activation, dans la mise à terme de la réponse immune et dans la cytotoxicité médiée par les cellules T <sup>(135)</sup>. Plusieurs études ont rapporté l'expression constitutive de Fas-L sur des cellules malignes (lymphomes, leucémie, cancer du colon, mélanome). Ainsi, l'expression de Fas-L à la surface de ces cellules tumorales peut également empêcher leur élimination en induisant l'apoptose des lymphocytes T entrant dans le site tumoral <sup>(64, 68, 135, 176)</sup>. Certaines cellules tumorales peuvent également interférer au niveau des mécanismes de transduction de signaux des lymphocytes T ou encore interférer avec les fonctions effectrices de ces lymphocytes. Par exemple, certaines cellules tumorales empêchent la liaison de la

perforine sécrétée par les cellules immunes effectrices à leur surface, ou encore sont résistantes à l'apoptose induite par Fas-L <sup>(42, 169)</sup>.

Ces modes d'interférence doivent être gardés en tête lorsqu'on veut utiliser les lymphocytes T dans le traitement des cancers. Il n'en reste pas moins que les cellules T cytotoxiques demeurent de très bons candidats pour l'immunothérapie de tumeurs. De plus, le transfert adoptif permet de contourner plusieurs de ces obstacles. Toutefois, le choix de l'Ag qu'ils reconnaissent reste d'une importance capitale. À ce sujet les AgMis semblent des cibles de choix lorsque le but est de déclencher une réponse adaptative T efficace.

## **1.2. Les antigènes mineurs d'histocompatibilité**

### **1.2.1. Généralités**

Les AgMis furent à l'origine identifiés à cause de leur implication dans les rejets de greffes. Ceci fût en tout premier lieu observé dans un modèle murin de rejet de tumeurs greffées <sup>(60)</sup>. Des expériences subséquentes de greffes de peau ont ensuite permis de démontrer la présence d'un large éventail d'AgMis codés par de multiples loci distribués à travers tout le génome <sup>(60)</sup>. Il est maintenant reconnu que les AgMis sont des peptides du soi associés au CMH provenant de la protéolyse partielle de protéines endogènes <sup>(143)</sup>. Ils proviennent de mutations affectant des séquences de protéines hautement conservées et entraînant un polymorphisme. Ce polymorphisme est faible, la majorité des AgMis étant codés par des loci bi-alléliques. Pour être considérés comme AgMis, ces peptides doivent être polymorphiques, mais également immunogènes. En d'autres termes, ils doivent être présentés adéquatement et reconnus par les lymphocytes T de façon à générer une réponse

immune. Ils doivent donc être libérés de leur précurseur et éviter d'être détruits, doivent faire compétition avec succès avec d'autres peptides au niveau de la liaison aux molécules du CMH, et le complexe peptide/CMH généré doit être reconnu par les TCR. Certains AgMis démontrent une expression tissulaire restreinte au système hématologique (tel HA-1 et HA-2) alors que d'autres sont exprimés de façon ubiquitaire (tels H-Y, HA-3 et H7<sup>a</sup>). Plusieurs études suggèrent que cette expression restreinte au système hématopoïétique de certains AgMis en fait d'excellents candidats pour l'immunothérapie adoptive de cancers hématologiques<sup>(60, 141, 143)</sup>. Le nombre d'AgMis différents entre deux lignées de souris, tel C57BL/6 et BalB.B est énorme (>40). Toutefois, des analyses des réponses cytotoxiques chez ces souris ont révélé que, malgré le grand nombre de différences entre les deux lignées, les réponses sont limitées à un nombre restreint d'AgMis, qualifiés d'immunodominants. Également, il a été démontré qu'après une transplantation de moelle osseuse, les réponses T dirigées contre l'hôte sont de nature oligoclonale et ciblent donc un nombre restreint d'AgMis<sup>(23, 141)</sup>. Un phénomène qui est appelé immunodominance. Le phénomène d'immunodominance n'est toutefois pas unique aux AgMis. Au contraire, il représente le patron habituellement utilisé par le système immunitaire en réponse à des virus, aux antigènes tumoraux, ainsi qu'aux auto-Ag. Il sera abordé plus en détails dans les pages suivantes.

## 1.2.2. AgMis : Cibles attrayantes en immunothérapie adoptive

Les AgMis cibles pouvant être considérés comme de bons candidats pour l'immunothérapie adoptive des cancers doivent remplir au moins trois pré-requis. Premièrement, l'Ag idéal devrait être exprimé fonctionnellement à un moment donné à la surface des cellules tumorales de façon à être reconnu par les lymphocytes T allogéniques injectés. Deuxièmement, l'Ag devrait être immunogène, c'est-à-dire apte à déclencher des réponses immunitaires notables au plan clinique. Troisièmement, l'Ag idéal ne devrait pas avoir tendance à muter. Ceci assurerait le maintien d'une réponse anti-tumorale efficace et donc minimiserait les chances de rechutes dues à une perte de la réponse T.

## 1.2.3. H7<sup>a</sup>, un antigène mineur d'histocompatibilité modèle

Certains antigènes mineurs d'histocompatibilité possèdent plusieurs caractéristiques, mentionnées ci-haut, les rendant très attrayants pour l'immunothérapie adoptive. Parmi ceux-ci on retrouve l'AgMi H7<sup>a</sup>. Cet AgMi constitue la base des études présentées dans cette thèse.

H7<sup>a</sup> est un AgMi associé à la molécule H2D<sup>b</sup> du CMH de classe I. Il est exprimé de façon ubiquitaire mais est dix fois plus abondant sur les cellules hématopoïétiques comparativement aux cellules non hématopoïétiques<sup>(47)</sup>. Il s'agit d'un peptide constitué de neuf acides aminés codé par le locus *H7* situé à l'extrémité télomérique du chromosome 9<sup>(143)</sup>. Il s'agit également d'un peptide très immunodominant. À cet effet, une étude a



démontré que lorsque H7<sup>a</sup> est présenté en association avec l'AgMi HY, les réponses des lymphocytes T sont entièrement dirigées contre H7<sup>a</sup>, empêchant par le fait même les réponses contre HY qui sont retrouvées lorsque ce dernier est présenté seul <sup>(148)</sup>. De plus, il a été démontré qu'il existe des différences fonctionnelles importantes entre les lymphocytes T répondant à H7<sup>a</sup> et les lymphocytes T répondants à HY. En effet, les lymphocytes T spécifiques à H7<sup>a</sup> démontrent une augmentation importante des molécules (par exemple la perforine et 1B11) impliquées dans l'activité effectrice des lymphocytes T <sup>(160)</sup>. De plus, des études fonctionnelles ont permis d'établir qu'il s'agit d'un AgMi hautement immunogène très efficace lorsqu'il s'agit d'éliminer des cellules leucémiques. Suite à l'injection chez des hôtes leucémiques, des lymphocytes spécifiques à H7<sup>a</sup> éliminent totalement des cellules leucémiques exprimant à leur surface H7<sup>a</sup> <sup>(52, 122)</sup>.

La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) est certainement une des réactions immunopathologiques les plus importantes déclenchées par les AgMis en médecine clinique. Toutefois, des études ont démontré que seulement un nombre limité d'AgMis ont la capacité de déclencher une GVH. De plus, il a récemment été démontré que le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques à un seul AgMi (H7<sup>a</sup>) permet d'éviter le développement d'une GVH, tout en maintenant une réponse anti-leucémique curative <sup>(52, 122)</sup>.

H7<sup>a</sup> constitue donc un excellent modèle pour l'étude de l'immunothérapie adoptive pour plusieurs raisons :

- Il est très immunodominant et permet de générer une bonne expansion des lymphocytes T spécifiques <sup>(160)</sup>.

- Des taux de guérison notables sont obtenus suite à l'injection de lymphocytes T dirigés contre cet Ag à des souris porteuses de cellules leucémiques exprimant H7<sup>a</sup> (52, 122).
- Sa structure biochimique a été élucidée, permettant d'utiliser des outils tels les tétramères pour l'étude des lymphocytes qui le reconnaissent.
- Des souris congéniques (B10.H7<sup>b</sup>) sont disponibles. Ceci permet une approche réductionniste des réponses anti-H7<sup>a</sup>.
- Il s'agit d'un peptide n'ayant pas tendance à subir de mutations (148).

## 1.3 Le phénomène d'immunodominance

### 1.3.1. Concept général

Le terme immunodominance est mentionné à maintes reprises dans ce mémoire de thèse. Il s'agit d'un phénomène largement répandu en immunologie et extrêmement important à considérer dans l'élaboration de stratégies immuno-thérapeutiques. C'est pourquoi la question de l'immunodominance sera abordée dans les paragraphes à suivre ainsi que dans le second article présenté dans cette thèse. Mais tout d'abord, mentionnons quelques détails supplémentaires sur les étapes traversées par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> lors d'une réponse immune.

Il est généralement admis que les lymphocytes T transitent à travers quatre phases lorsqu'ils répondent à un Ag. La première phase d'une réponse impliquant les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est caractérisée par la reconnaissance des Ag par les lymphocytes, suivi de leur activation. Cette étape d'activation requiert deux signaux. Le premier signal est fourni par la reconnaissance

et l'engagement du complexe du TCR avec les complexes CMH I/peptide spécifiques. Le second signal est fourni par un ensemble d'interactions entre des molécules de co-stimulation et leurs ligands. Ces molécules peuvent agir de façon à augmenter les signaux médiés par le TCR (par exemple : CD28 et CD40) ou à maintenir les réponses T (par exemple : OX40 et 4-1BB) (20, 32, 61, 166182, 185, 210). Ces deux signaux sont habituellement livrés aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs par des CPA, telles les CD, dans les organes lymphoïdes où la rencontre avec les complexes CMH I/peptide est optimale.

Suite à leur activation, les lymphocytes T vont ensuite traverser une phase d'expansion clonale, résultant de l'activation de plusieurs kinases intracellulaires (phospho-tyrosine-kinases : PTK) suite à l'engagement adéquat du TCR. Ceci est suivi d'une phosphorylation de la phospholipase C (PLC $\gamma$ ) spécifique aux phosphatidylsérines (Pi-PLC $\gamma$ ). Lorsqu'elle est activée, la PLC $\gamma$  catalyse la rupture du phosphatidyl-inositol 4,5-biphosphate (PIP2) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et en diacylglicérol (DAG). DAG active la protéine kinase (PKC), une importante sérine/thréonine kinase présente dans les lymphocytes T, et IP3 déclenche la relâche des ions calcium de compartiments intracellulaires et ouvre les canaux calciques membranaires. Ces changements sont ensuite transmis au noyau grâce à une cascade de messagers secondaires présents dans le cytoplasme. Cette cascade de signalisation engendre une activation transitoire de facteurs de transcription, ainsi qu'une augmentation de la transcription de gènes quiescents chez les cellules T naïves. Ceci mène à la synthèse de nouvelles protéines essentielles au cycle cellulaire et aux fonctions effectrices (140).

L'activation des lymphocytes T naïfs mène ainsi à l'induction de mécanismes mitotiques, entraînant les cellules T à se diviser de 7 à 10 fois (90, 121, 194, 212). Des protéines associées au cycle cellulaire telles les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines sont activées lors du contact à l'Ag, ce qui engendre une division cellulaire et une augmentation de la prolifération. Ainsi, lorsque les cellules T naïves reçoivent les signaux antigéniques et de co-stimulation appropriés, une réponse proliférative programmée est enclenchée. Cette réponse

est également modulée par la durée de stimulation du TCR et par les cytokines présentes dans le milieu <sup>(28, 109, 162)</sup>.

Le développement des fonctions effectrices est étroitement lié à ce processus d'expansion clonale. Lorsque les cellules T naïves se différencient en lymphocytes T effecteurs cytotoxiques, leur profil d'expression de gènes est reprogrammé. Ceci est engendré par des changements au niveau de la structure de la chromatine et du profil de facteurs de transcription actifs tels : les gènes codant pour l'IFN $\gamma$  et les molécules cytotoxiques telles la perforine et les granzymes qui ne sont pas exprimés chez les T naïfs mais sont exprimés chez les CD8<sup>+</sup> effecteurs et mémoires <sup>(7, 61, 195, 216)</sup>. Malgré le fait que la synthèse de ces protéines soit régulée par le contact avec l'Ag, les niveaux élevés des transcrits d'ARNm rendent les CD8<sup>+</sup> effecteurs capables de produire les protéines correspondantes en grandes quantités et plus rapidement que les cellules T naïves <sup>(7, 92, 171, 195)</sup>. Lors de la différenciation en cellules effectrices, les patrons de migration sont également modifiés. Les cellules effectrices acquièrent la capacité de migrer aux tissus où se trouve l'inflammation. On assiste ainsi à la diminution de l'expression des molécules de recirculation aux ganglions telle CD62L et à l'apparition de molécules de transit dans les tissus périphériques telle Lfa-1 et V $\alpha$ -4.

Les cellules CD8<sup>+</sup> naïves, précurseurs de CTLs, acquièrent une activité cytotoxique suite à leur activation. Les granules cytotoxiques constituent un des principaux mécanismes utilisés par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> pour détruire leurs cibles. Ces granules, synthétisés *de novo* lorsque la cellule est activée, résident dans le cytoplasme du lymphocyte. Les deux principaux constituants des granules sont la perforine et les granzymes. Suite à leur synthèse, ces derniers subissent des modifications leur permettant d'assumer une conformation active <sup>(140)</sup>.

Par la suite, lorsque la cellule T CD8<sup>+</sup> reconnaît sa cible, une jonction serrée est formée entre les deux cellules. Le signal déclenché par cette jonction cause ensuite la migration vectorielle des granules vers le site de contact entre les deux cellules. Dans un modèle récent il a été suggéré que les granzymes B entrent dans la cellule cible suite à leur liaison à un récepteur

spécifique (récepteur du mannose-6-phosphate-cation-indépendant) <sup>(196)</sup>. Ce récepteur est ensuite internalisé, permettant la relâche des granzymes B dans un compartiment endolysosomal où ils sont inoffensifs. La perforine internalisée procurerait le signal permettant aux granzymes B de quitter ce compartiment et d'aller cliver leurs substrats apoptotiques au niveau du cytoplasme et du noyau. Suite au relâchement des granzymes B dans la cellule cible, ceux-ci clivent et activent la procaspase 3 (et plusieurs autres procaspases telles : 2,3,7,8,9 et 10) <sup>(40, 45, 118, 168, ; 181, 216)</sup>, Bid et ICAD. Le signal pro-apoptotique du granzyme B est amplifié par l'activation des caspases et par le clivage de Bid ainsi que sa translocation à la membrane mitochondriale, où Bax et Bak forment alors un canal permettant la relâche du cytochrome *c*. Le granzyme B est également capable d'agir directement sur les membranes mitochondriales et d'induire la dépolarisation en absence de relâche du cytochrome *c*. L'ensemble de ces mécanismes initie la fragmentation de l'ADN et la destruction par apoptose de la cellule cible. Cette phase effectrice est ainsi caractérisée par une augmentation de la perforine intracellulaire, une diminution des molécules d'adhésion cellulaire aux ganglions (CD62L) ainsi qu'une diminution du récepteur à l'IL-7 (IL-7R ou CD127).

Dans les semaines suivant l'élimination des cellules reconnues par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, la majorité des lymphocytes effecteurs meurent (> 90%). Ce processus permet de limiter la durée des réponses de la part des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et de minimiser les risques de pathologies pouvant être reliées à des réponses excessives <sup>(92)</sup>.

Les cellules qui survivent à la phase de contraction entrent ensuite dans cette dernière phase : la phase mémoire durant laquelle un faible nombre de ces cellules T sont maintenues de façon à conférer une immunité à long terme. Ces cellules présentent également un patron d'expression de protéines de surface différent des cellules T effectrices. Pour leur survie, les lymphocytes T mémoires devront être capables de répondre à certaines cytokines de survie telle l'IL-7 <sup>(140, 203)</sup>. On assiste donc à une ré-expression du récepteur à l'IL-7 à la surface des cellules T mémoires CD8<sup>+</sup>. On assiste également à des modifications au niveau des molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire. Les lymphocytes T mémoires qui se

retrouveront dans les tissus périphériques, désignés lymphocytes effecteurs/mémoires, sont caractérisés par une absence d'expression de CD62L. Par contre, les lymphocytes T mémoires se trouvant dans les organes lymphoïdes sont appelées cellules T mémoires centrales, vont exprimer à nouveau CD62L<sup>(162)</sup>.

Les étapes brièvement décrites dans les paragraphes précédents caractérisent les réponses immunitaires générées chez des lymphocytes T face à leurs Ag respectifs. Il est toutefois très important de noter que ce ne sont pas tous les Ag qui déclenchent de telles cascades d'événements. En effet, de tous les peptides générés et présentés par le CMH I pouvant potentiellement être présentés aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, seulement une infime fraction induisent des réponses notables chez les lymphocytes T. Ce phénomène par lequel seuls certains Ag déclenchent des réponses immunes se nomme immunodominance<sup>(219)</sup>. Ce phénomène d'immunodominance limite grandement le répertoire des réponses T. Il s'agit d'un phénomène très répandu en immunologie, observé dans des contextes d'infections virales, ainsi que lors de réponses à des auto-antigènes ou à des Ag tumoraux<sup>(80, 99, 219, 220)</sup>. L'immunodominance caractérise aussi les réponses aux AgMis. Cette restriction des réponses aux AgMis fût une grande surprise au départ. En effet, selon des études, deux lignées de souris telles C57BL10 et BALB.B diffèrent par 45 loci reliés aux AgMis. De plus, il peut exister des centaines de gènes codant pour des gènes reliés aux AgMis<sup>(219, 220)</sup>. Toutefois, les réponses T entre deux lignées de souris aussi potentiellement différentes sont dirigées contre un nombre extrêmement limité d'AgMis, habituellement 2 ou 3<sup>(143, 148, 219, 220)</sup>.

Pourquoi certains peptides arrivent-ils à induire des réponses T, alors que d'autres, potentiellement aptes à le faire, échouent? Plusieurs études réalisées au cours des dernières années ont permis de faire la lumière sur les facteurs impliqués dans cette restriction des réponses de la part des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Le premier facteur soulevé concerne la présentation antigénique. Pour qu'un peptide déclenche une réponse, le répertoire de l'individu doit tout d'abord comporter des lymphocytes ayant des TCR capables de répondre à ce peptide<sup>(219)</sup>. Le second facteur concerne la présentation de ce peptide. En effet, pour

déclencher une réponse par les lymphocytes T ayant un TCR capable de répondre, un peptide doit aussi posséder certaines caractéristiques <sup>(219)</sup>. Tout d'abord, il doit être pris et présenté par une CPA, habituellement une CD. En second lieu, il doit se lier avec une affinité suffisante à une molécule du CMH de classe I de façon à former un complexe permettant la reconnaissance par un TCR spécifique d'un lymphocyte T. Troisièmement, le complexe exprimé à la surface de la CPA doit permettre une activation adéquate du lymphocyte menant à son activation entraînant une prolifération et le développement de fonctions effectrices. Pour en arriver à une activation des lymphocytes T, deux paramètres peuvent jouer : 1) L'affinité du TCR pour son ligand <sup>(93, 179)</sup>, 2) Le contexte de présentation par les CPA. Ainsi, l'affinité du TCR pour son ligand (complexe CMH-peptide) joue un rôle important dans le phénomène d'immunodominance. Des études réalisées par l'équipe du Dr Sette et du Dr Ahmed ont permis d'établir que les peptides présentés par une molécule de CMH de classe I présentaient des résidus hautement conservés se trouvant à 2 ou trois positions. La présence de ces résidus rendait les peptides immunogènes. Les peptides présentant ces motifs étaient reconnus avec une meilleure affinité par les TCR qui leurs étaient spécifiques <sup>(219)</sup>. Cette découverte a ensuite permis d'identifier de nombreux peptides potentiellement antigéniques <sup>(151)</sup>. L'activation des lymphocytes T est également dépendante des molécules de co-stimulation exprimées lors de la présentation antigénique. En effet, la présence de molécules de co-stimulation à la surface des CPA favorise grandement le déclenchement d'une réponse par un peptide donné.

Ainsi, certains Ag (immunodominants) sont plus aptes à déclencher des réponses T que d'autres. De plus, certains Ag arrivent à enclencher une réponse immunitaire T lorsqu'ils sont présentés seuls mais n'y arrivent pas lorsqu'ils sont en présence de certains autres Ag à la surface d'une même CPA. Une hiérarchie s'installe dans de telles circonstances. Les conditions dans lesquelles sont présentés ces Ag sont donc déterminantes en ce qui a trait au déclenchement d'une réponse T. Ainsi, certains Ag, qualifiés d'immunodominants, inhibent les réponses aux autres Ag, qualifiés de non-immunodominants, lorsqu'ils sont présentés conjointement. Ce phénomène par lequel des réponses sont générées contre ces Ag immunodominants au détriment des Ag immunodominés présentés à la surface d'une même

CPA se nomme immunodomination <sup>(143)</sup>. En fait, ce phénomène représente le sentier en général adopté par les lymphocytes T lorsqu'ils sont exposés à plusieurs épitopes potentiellement immunogènes en même temps à la surface d'une même CPA.

Le processus d'immunodomination survient également lors de réponses T CD8<sup>+</sup> à des virus <sup>(111, 128, 190)</sup>, à des Ags tumoraux <sup>(189)</sup>, à des AgMis <sup>(148)</sup> ainsi qu'à des vaccins <sup>(53)</sup>. Deux hypothèses générales ont été proposées pour expliquer l'immunodomination. La première idée propose que les peptides immunodominants interfèrent au niveau de la génération des peptides non-dominants à l'intérieur des CPA. Cette idée demeure toutefois peu probable étant donné qu'il a été observé à maintes reprises que la reconnaissance par les lymphocytes T CD8 d'Ag non-dominants n'est pas affectée par la co-expression d'Ag dominants <sup>(128, 148)</sup>. Aussi, plusieurs Ags dominants sont très peu abondants, ce qui rend la compétition pour les molécules du CMH de classe I très peu probable.

La seconde théorie proposée pour expliquer l'immunodomination semblent beaucoup plus plausible. Selon celle-ci, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques aux peptides dominants empêchent les réponses à d'autres peptides. Ils utilisent trois moyens pour réaliser ceci <sup>(219, 220)</sup>. Tout d'abord en compétitionnant au niveau de l'APC pour l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. En second lieu en supprimant de façon systémique les réponses aux Ag non-dominants. Troisièmement, en réduisant la charge antigénique : en répondant rapidement, les lymphocytes T dirigés contre des peptides dominants font en sorte que les peptides non-dominants sont exprimés de façon sous optimale ne permettant pas une activation adéquate des lymphocytes T dirigés contre des peptides non dominants. En d'autres termes, la solution à l'énigme de l'immunodomination résiderait probablement à l'interface entre la cellule T et la CPA. Jusqu'à présent, certaines études ont démontré que le phénomène d'immunodomination disparaît lorsque les CPA sont en excès ou encore lorsque les Ag sont présentés séparément <sup>(143, 148, 155)</sup>. Ceci pourrait être dû à un épuisement des CPA, à une élimination des CPA par les T dirigés contre les épitopes immunodominants ou encore à une monopolisation des CPA par les cellules T anti-dominants. Il est également possible de croire que les cellules T spécifiques aux épitopes immunodominants enverraient des signaux



d'inhibition aux cellules T dirigées contre les épitopes non-immunodominants<sup>(97, 147, 159, 160, 219)</sup>. Est-ce que l'immunodominance serait aussi reliée à la force du signal reçu dans les lymphocytes T immunodominants ? En d'autres termes, est-ce une question d'affinité du TCR pour son ligand ? Il s'agit d'une question encore sans réponse. Toutefois une chose est certaine, les cellules T dirigées contre des épitopes dominants doivent posséder certains avantages fonctionnels leur permettant de surpasser les lymphocytes T dirigés contre des épitopes immunodominés.

### 1.3.2. Implications cliniques

Le phénomène d'immunodominance peut sembler surprenant à prime abord. En effet, cette restriction des réponses T permettrait aux pathogènes d'échapper au système immunitaire en mutant les épitopes ciblés par les lymphocytes T. Ceci a été observé dans des modèles d'infections virales ainsi que dans des modèles de réponses aux tumeurs<sup>(10, 11, 48, 133, 154)</sup>. Cette possibilité doit donc être prise en considération lors de l'élaboration de vaccins contre de tels Ag. Dans une optique plus positive, cette restriction de la diversité des réponses immunes T pourrait également représenter une astuce utilisée par le système immunitaire visant probablement à limiter les risques de reconnaissance auto-immune tout en ciblant les meilleurs épitopes permettant d'éliminer efficacement les pathogènes ou les cellules tumorales. De plus, son implication en transplantation demeure non négligeable. Tel que mentionné précédemment, la GVH demeure une limite importante lors d'une transplantation de moelle osseuse allogénique. Selon les lois de l'immunodominance, celle-ci serait déclenchée par un nombre restreint d'AgMis immunodominants. Il serait donc important de développer des stratégies thérapeutiques ne ciblant pas ces AgMis immunodominants déclenchant des GVH, tout en ciblant ceux permettant de maintenir des réponses anti-tumorales efficaces. Dans cette optique, des connaissances plus approfondies des AgMis responsables de ces deux effets (GVH et GVT), ainsi que des règles régissant le phénomène d'immunodominance pourrait être grandement utile au développement de stratégies anticancéreuses<sup>(118)</sup>.

## **2. OBJECTIFS DE CETTE THÈSE**

## 2. OBJECTIFS DE CETTE THÈSE

### 2.1. Premier objectif

#### **ÉTUDE DE L'EFFICACITÉ DES LYMPHOCYTES T DIRIGÉS CONTRE UN AgMi IMMUNODOMINANT DANS LA LUTTE FACE À UNE TUMEUR SOLIDE.**

Le premier objectif du présent travail était de déterminer si des lymphocytes T CD8 adoptivement transférés et dirigés contre un AgMi pouvaient guérir une tumeur solide déjà bien établie. Pour ce faire nous avons utilisé H7<sup>a</sup> comme modèle d'AgMi immunodominant ainsi que le mélanome B16.F10 comme tumeur solide à traiter. Cette dernière étant une tumeur hautement maligne, proliférant très rapidement et exprimant naturellement très peu de molécules du CMH I.

Dans cette partie du travail nous voulions donc plus spécifiquement établir la capacité de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dirigés contre H7<sup>a</sup> à éliminer des cellules de mélanome établies chez l'hôte depuis une semaine. Ceci était primordial pour deux raisons. Tout d'abord, afin de déterminer l'étendue des tumeurs traitables (hématopoïétiques versus non-hématopoïétiques) par transfert adoptif de lymphocytes T dirigés contre un AgMi. En second lieu, afin de faire la lumière sur les étapes menant à l'élimination éventuelle d'une tumeur solide par des lymphocytes T dirigés contre un AgMi immunodominant. Les résultats relatifs à ce premier objectif sont présentés dans le l'article numéro 1 présenté dans cette thèse intitulé : 'T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors'

## 2.2. Second objectif

### **ÉTUDE DU PROGRAMME DE DIFFÉRENTIATION DES LYMPHOCYTES T CD8<sup>+</sup> SPÉCIFIQUES À UN AgMi IMMUNODOMINANT ET DES LYMPHOCYTES T CD8<sup>+</sup> DIRIGÉS CONTRE AgMi NON-DOMINANT.**

Le second objectif du présent travail était de comparer le programme de différenciation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dirigés contre un AgMi immunodominant et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dirigés contre un AgMis non-immunodominant.

Afin de réaliser cet objectif, nous avons utilisé H7<sup>a</sup> comme modèle d'AgMi immunodominant et HY comme AgMi non-immunodominant. Nous avons entrepris ceci de façon à acquérir de l'information relative aux mécanismes impliqués dans le phénomène d'immunodominance. Ceci était crucial pour deux raisons : Tout d'abord afin de faire la lumière sur les caractéristiques des réponses dirigées contre différents types d'Ag. En second lieu pour obtenir de l'information potentiellement utilisable dans le développement de stratégies thérapeutiques faisant appel aux lymphocytes T dirigés contre des AgMis dominants, tel les lymphocytes T utilisés dans nos essais anticancéreux. Plus on obtient d'informations sur nos outils, plus il est ensuite possible de les manipuler à bon escient.

Les résultats relatifs à ce second objectif figurent dans le deuxième article présenté dans cette thèse intitulé : 'Asynchronous differentiation of CD8 T cells that recognize dominant and cryptic antigens'

### 2.3. Troisième objectif

#### **ÉTUDE DU COMPORTEMENT LYMPHOCYTAIRE ET DE LA MÉMOIRE GÉNÉRÉE SUITE AU TRAITEMENT D'UNE TUMEUR SOLIDE PAR TRANSFERT ADOPTIF DE LYMPHOCYTES T DIRIGÉS CONTRE UN AgMi IMMUNODOMINANT.**

Le troisième objectif du présent travail était d'évaluer la capacité proliférative et de migration des lymphocytes T dirigés contre un AgMi adoptivement transférés chez des hôtes porteurs de tumeurs solides. Durant la réalisation de cet objectif nous avons également entrepris d'établir la capacité de lymphocytes T dirigés contre un AgMi dominant adoptivement transférés à générer une mémoire immunologique à long terme.

Pour répondre à ces objectifs nous avons encore une fois utilisé H7<sup>a</sup> comme modèle d'AgMi immunodominant ainsi que le mélanome B16.F10 comme tumeur solide à traiter. Les résultats relatifs à ce troisième objectif sont exposés dans le troisième article présenté dans cette thèse intitulé : 'Two host factors regulate persistence of H7<sup>a</sup>-specific T cells injected in tumor-bearing mice'.

### **3. RÉSULTATS**

### 3.1. ARTICLE # 1

#### **T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors**

Marie-Christine Meunier<sup>1,2</sup>, Jean-Sébastien Delisle<sup>1,2</sup>, Julie Bergeron<sup>2</sup>, Vincent Rineau<sup>1,2</sup>,  
Chantal Baron<sup>1,2</sup> & Claude Perreault<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Research in Immunology and Cancer, University of Montreal, C.P. 6128,  
Downtown Station, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

<sup>2</sup>Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital,  
Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4

*Nature Medicine, Volume 11, number 11, p. 1222-1229, 2005*

Permission d'inclure cet article dans cette thèse de doctorat : licence numéro 1547790307262  
(licence Rightslink)

**ABSTRACT**

T cells responsive to minor histocompatibility (H) antigens are extremely effective in curing leukemia but it remains unknown whether they could eradicate solid tumors. We report that injection of CD8 T cells primed against the immunodominant H7<sup>a</sup> minor H antigen can cure established melanomas in mice. Tumor rejection was initiated by preferential extravasation at the tumor site of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) producing H7<sup>a</sup>-specific T cells. Intratumoral release of interferon- $\gamma$  had two crucial effects: inhibition of tumor angiogenesis and upregulation of major histocompatibility complex (MHC) class I expression on tumor cells. Despite ubiquitous expression of H7<sup>a</sup>, dissemination of a few H7<sup>a</sup>-specific T cells in extralymphoid organs caused neither graft-versus-host disease (GVHD) nor vitiligo because host nonhematopoietic cells were protected by their low expression of MHC class I. Our preclinical model yields unique insights into how minor H antigen-based immunotherapy could be used to treat human solid tumors.



## INTRODUCTION

The concept of T cell-based cancer immunotherapy generates both enthusiasm and skepticism. This dissension comes from the widely divergent results of the two broad approaches that have been tested so far. Vaccination with tumor associated antigens (TAA), used mainly to immunize patients bearing solid tumors, has yielded very low response rates in humans<sup>1,2</sup>. In contrast, injection of allogeneic T lymphocytes, used primarily for treatment of hematopoietic malignancies, has met with a remarkable success rate<sup>3,4</sup>. The graft-versus-leukemia (GVL) effect is due mainly, albeit perhaps not exclusively, to recognition of minor H antigens<sup>3,5</sup>. This raises the key question: is the discrepancy between the success rate of TAA vaccines and allogeneic T-cell immunotherapy due to the malignant cell lineage (solid tumors versus hematopoietic cancers) and/or to the nature of the target Ags (TAAs versus minor H antigens)? Of particular relevance, could injection of minor H antigen-responsive T cells entail a curative response against solid tumors? Our laboratory has shown that adoptive transfer of T cells primed against a single immunodominant minor H antigen, H7<sup>a</sup> (also called B6<sup>dom1</sup>), could cure leukemia without causing GVHD<sup>6,7</sup>. The primary goal of our work was therefore to use the H7<sup>a</sup> model to determine whether T cells targeted to a single minor H antigen could eradicate established solid tumors.

## RESULTS

### Experimental model

B10 mice and B16.F10 melanoma cells express the allele encoding H7<sup>a</sup>, whereas congenic B10.H7<sup>b</sup> mice express the allele encoding H7<sup>b</sup> (**Supplementary Table 1** online). We intravenously injected irradiated B10 female mice on day 0 with T cell-depleted bone marrow cells from B10.H7<sup>b</sup> female donors and subcutaneously with B16.F10 melanoma cells. On day 3 or 7, these hosts received splenocytes from B10.H7<sup>b</sup> female mice, primed against H7<sup>a</sup> 14 d before adoptive transfer (**Supplementary Fig. 1** online). We took into account that at the time of initial priming, CD8<sup>+</sup> T cells supplied with CD4<sup>+</sup> T-cells help generate more efficient effector cells upon secondary challenge<sup>8</sup>. Thus we used B10.H7<sup>b</sup> female mice primed against B10 male cells as a source of H7<sup>a</sup>-specific CD8<sup>+</sup> T cells. This immunization scheme leads to the expansion of HY-specific CD4<sup>+</sup> T cells and of H7<sup>a</sup>-specific CD8<sup>+</sup> T cells (but not of HY-specific CD8<sup>+</sup> T cells because of the immunodominance phenomenon)<sup>9,10</sup>. Thus, only H7<sup>a</sup>-specific CD8<sup>+</sup> T cells could encounter their cognate antigen in female B10 recipients because both recipients and tumor cells express H7<sup>a</sup> and do not express HY.

### H7<sup>a</sup>-specific T cells mediate potent antitumor responses

Mice bearing B16.F10 tumor received splenocytes as treatment on day 3 (**Fig. 1a,b**). In mice injected with naïve syngeneic splenocytes, melanoma grew rapidly and all mice had to be killed by day 36. In hosts that received splenocytes primed against H7<sup>a</sup>, no death occurred before day 32 and 80% of mice remained free of tumor on day 100. Depletion of CD8<sup>+</sup> T cells from splenocytes completely abrogated the antitumor effect, whereas depletion of CD4<sup>+</sup> T cells had no effect. Thus, CD8<sup>+</sup> T cells primed against H7<sup>a</sup> elicited potent antitumor responses. The cure rate decreased, but was nevertheless at 45% when splenocyte injection was delayed to day 7 (**Fig. 2a,b**). Cured B10 recipients of H7<sup>a</sup>-specific T cells did not show any signs of GVHD or vitiligo (data not shown). This is consistent with our previous report on B10 mice treated for leukemia; even when the number of H7<sup>a</sup>-tetramer<sup>+</sup> T cells injected was increased fourfold (to 10<sup>6</sup> per recipient) relative to the present study (2.5 x 10<sup>5</sup>), no GVHD was observed up to 1 year posttransplant<sup>6</sup>.

### **Tumor eradication is TCR-dependent**

To determine whether the antitumor effect mediated by CD8<sup>+</sup> T cells required T-cell receptor (TCR)-mediated recognition of the target epitope (H7<sup>a</sup>), we treated melanoma-bearing mice with H7<sup>b</sup>-specific rather than H7<sup>a</sup>-specific T cells. Adoptively transferred H7<sup>b</sup>-specific T cells could not encounter their cognate antigen because neither host nor tumor expressed H7<sup>b</sup>. In these conditions, all recipient mice were killed by day 39 because of tumor growth (**Fig. 2**). Hence, TCR-mediated recognition of the target epitope was mandatory for tumor cure. In its absence, tumor progression was nevertheless delayed compared to mice not receiving primed splenocytes. Further data suggest that the weak TCR-independent antitumor activity was a bystander effect mediated by IFN- $\gamma$ .

### **H7<sup>a</sup>-specific T cells localize at the tumor site**

Injection of H7<sup>a</sup>-specific T cells was sufficient to eradicate melanoma cells but did not cause any toxicity to the hosts even though H7<sup>a</sup> is expressed on practically all recipient tissues and organs<sup>11</sup>. To determine whether H7<sup>a</sup>-specific CD8<sup>+</sup> T cells accumulated preferentially to the tumor site, we extracted leukocytes from various tissues and organs of B10 mice bearing B16.F10 tumors on day 19. Although only 1-4% of CD8<sup>+</sup> T cells found in various lymphoid and nonlymphoid organs were labeled by H7<sup>a</sup>-H2D<sup>b</sup> tetramers, this proportion reached 60-80% in the tumors (**Fig. 3a**). Thus, H7<sup>a</sup>-specific T cells were substantially enriched at the tumor site. After recognition of target antigen, effector CD8<sup>+</sup> T cells undergo granule exocytosis that leads to exposure of Lamp1 (CD107a) at their cell surface<sup>12</sup>. Notably, the proportion of tissue infiltrating H7<sup>a</sup>-specific T cells expressing cell-surface Lamp1 was 60-65% in melanoma tumors but only 4-20% in other tissues and organs (**Fig. 3b**). Thus, only in the tumor did H7<sup>a</sup>-specific T cells undergo massive granule exocytosis.

To further analyze T-cell migration to the tumor site, we studied tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) on day 19 in B10 mice injected on day 7 with either naive B10 splenocytes or splenocytes primed against H7<sup>a</sup> or H7<sup>b</sup>. We examined tumors that expressed (B16.F10 and EL4) or did not express (YAC-1) H7<sup>a</sup>. Substantial numbers of

CD8<sup>+</sup> TILs were found in recipients of primed but not unprimed splenocytes ( $P < 0.01$ ; **Fig. 3c**). In recipients of H7<sup>a</sup>-specific or H7<sup>b</sup>-specific splenocytes, approximately 80% of CD8<sup>+</sup> TILs were reactive to H7<sup>a</sup> or H7<sup>b</sup>, respectively (**Fig. 3d**). As in the case of B16.F10 melanoma (**Fig. 3a**), the tumor was the sole site where antigen-reactive T cells accumulated massively in mice bearing subcutaneous EL4 or YAC-1 tumors (data not shown). Accumulation of TILs was not substantially affected by the specificity of the injected splenocytes (H7<sup>a</sup>- or H7<sup>b</sup>-specific), nor by tumor cell expression of H7<sup>a</sup> (**Fig. 3d**). Notably, TILs expressed cell-surface Lamp1 only in recipients of H7<sup>a</sup>-specific T cells that bore tumors expressing H7<sup>a</sup> (**Fig. 3e**) and did not in recipients of H7<sup>b</sup>-specific T cells, or when the tumor was H7<sup>a</sup> negative (YAC-1). Thus, primed CD8<sup>+</sup> T cells accumulated at the tumor site in an antigen-independent manner, but underwent granule exocytosis only when the tumor expressed their cognate antigen.

#### **The phenotype of TILs and tumor blood vessels**

We next analyzed the phenotype of H7<sup>a</sup>- and H7<sup>b</sup>-reactive CD8<sup>+</sup> TILs in melanoma-bearing B10 recipients treated with H7<sup>a</sup>- or H7<sup>b</sup>-specific T cells. We used labeling with H7<sup>a</sup>-H2D<sup>b</sup> tetramers and 1B11 antibody to identify antigen-reactive CD8<sup>+</sup> T cells in recipients of H7<sup>a</sup>-specific and H7<sup>b</sup>-specific splenocytes, respectively. The 1B11 antibody recognizes an activation-associated isoform of CD43 that is upregulated on activated CD8<sup>+</sup> T cells<sup>13</sup>. The key finding was that H7<sup>a</sup>- and H7<sup>b</sup>-reactive TILs, but not antigen-unreactive TILs, had the classical phenotype of effector T cells that extravasate into non lymphoid tissues: CD44<sup>hi</sup>, CD62L<sup>neg</sup>, Lfa-1<sup>hi</sup>, Nkg2d<sup>hi</sup> and Vla-4<sup>hi</sup> (**Fig. 4a**). The phenotype of H7<sup>b</sup>-specific TILs was similar to that of H7<sup>a</sup>-specific TILs. Because the host and tumor expressed H7<sup>a</sup> but not H7<sup>b</sup>, the activated effector phenotype of antigen-primed TILs was independent of the presence of their cognate antigen.

T-cell integrins Lfa-1 and Vla-4 have a prime role in recruitment of effector T cells to inflammatory sites through interactions with their endothelial cell ligands Icam-1 and Vcam-1, respectively<sup>14-16</sup>. Using immunohistochemistry, we therefore evaluated expression of Icam-1 and Vcam-1 on day-19 tumors of melanoma-bearing mice treated with H7<sup>a</sup>-specific T cells. Tumor vessels did not upregulate Icam-1 (data not shown) but

stained strongly for Vcam-1 (**Fig. 4b**). Notably, overexpression of Vcam-1 was specific for the tumor vessels and was not found on vessels from the skin (**Fig. 4b**) spleen, liver and lungs (data not shown) in mice treated with H7<sup>a</sup>-specific T cells. To directly test the role of Vcam-1-Vla-4 interactions in our model, we injected recipients of H7<sup>a</sup>-specific T cells with neutralizing Vcam-1-specific antibody, isotype-matched rat IgG1 or no immunoglobulins. Notably, the antitumor effect of H7<sup>a</sup>-specific T cells was abrogated by injection of Vcam-1-specific antibody but not by the isotype-matched control Ig (**Fig. 4c,d**). These data show that expression of Vcam-1 on tumor vessels is essential for tumor eradication by H7<sup>a</sup>-specific T cells. Furthermore, they support the concept that selective upregulation of Vcam-1 on tumor vessels can explain the preferential accumulation of CD44<sup>hi</sup>Vla-4<sup>hi</sup> effector T cells at the tumor site.

#### **The crucial role of IFN- $\gamma$ in tumor eradication**

Eradication of tumor cells by T lymphocytes depends on two crucial effector mechanisms: production of IFN- $\gamma$  and cell-mediated cytotoxicity<sup>17,18</sup>. We found that in melanoma-bearing B10 recipients treated with H7<sup>a</sup>-specific splenocytes, about 60% of freshly harvested H7<sup>a</sup>-specific TILs were producing IFN- $\gamma$ , and over 90% did so after *in vitro* restimulation (**Fig. 5a**). IFN- $\gamma$  levels measured in tissue extracts were substantially increased in tumors but not in other sites (**Fig. 5b**), and correlated with local concentrations of H7<sup>a</sup>-specific T cells (**Fig. 3a**). When recipients were treated with H7<sup>b</sup>-specific T cells, a substantial but much smaller percentage of H7<sup>b</sup>-specific TILs produced IFN- $\gamma$  (**Fig. 5a**), and the intratumoral levels of IFN- $\gamma$  showed only a modest increase (**Fig. 5b**). Thus, antigen-reactive TILs produced large or small amounts of IFN- $\gamma$  depending on the presence or absence of their cognate antigen.

Expression of ubiquitous minor H antigens (such as H7<sup>a</sup>) on diverse cell types is proportional to MHC class I protein expression<sup>19</sup>, and H7<sup>a</sup> is specifically presented by the H2D<sup>b</sup> MHC class I molecule<sup>11</sup>. A quintessential effect of IFN- $\gamma$  is to upregulate MHC expression<sup>20</sup>. In recipients of H7<sup>a</sup>-specific splenocytes, expression of H2D<sup>b</sup> remained low on normal nonhematopoietic cells but considerably increased on melanoma cells (**Fig. 5c**). Upregulation of H2D<sup>b</sup> on tumor cells was IFN- $\gamma$  dependent because it was abrogated

when mice were injected with IFN- $\gamma$ -specific antibody (**Fig. 5d**). Collectively, the data show that preferential accumulation of H7<sup>a</sup>-specific T cells at the tumor site (**Fig. 3a**) brings about a localized increase in IFN- $\gamma$  levels (**Fig. 5a,b**) that leads to selective upregulation of MHC class I on tumor cells (**Fig. 5c**). By comparison, although adoptively transferred H7<sup>b</sup>-specific T cells also accumulated in the tumors (**Fig. 3c,d**), in the absence of their cognate antigen they produced only small amounts of INF- $\gamma$  (**Fig. 5a,b**) that were insufficient to upregulate MHC class I on tumor cells (**Fig 5d**).

To further evaluate the role of IFN- $\gamma$  in antitumor response, we injected IFN- $\gamma$ -specific antibody to recipients of H7<sup>a</sup>-specific splenocytes. Neutralization of IFN- $\gamma$  prevented upregulation of H2D<sup>b</sup> on tumor cells (**Fig. 5c,d**) and abrogated the granule exocytosis of H7<sup>a</sup>-specific TILs (data not shown). This suggests that degranulation of H7<sup>a</sup>-specific TILs requires a threshold level of H7<sup>a</sup> on tumor cells (**Fig. 3e**) that is reached only when MHC class I is upregulated by IFN- $\gamma$ .

To evaluate whether the angiostatic effect of IFN- $\gamma$  contributed to the antitumor effect of H7<sup>a</sup>-specific CD8<sup>+</sup> T cells, we used IFN- $\gamma$  receptor-deficient (*Ifngr1*<sup>-/-</sup>) mice as recipients. Under these conditions, IFN- $\gamma$  produced by H7<sup>a</sup>-specific TILs could bind to its receptor on melanoma cells but not on host-derived tumor stroma<sup>21</sup>. In recipients of naive B10 splenocytes, staining of endothelial cells with CD31-specific antibody disclosed a rich arborescence of blood vessels in growing melanomas (**Fig. 5e**). In contrast, tumors infiltrated by H7<sup>a</sup>-specific TILs, which produce copious amounts of IFN- $\gamma$  (**Fig. 5a,b**), were necrotic and deficient in blood vessels. Tumors that were infiltrated by H7<sup>b</sup>-specific TILs, which produce small amounts of IFN- $\gamma$ , showed a reproducible but modest decrease in tumor angiogenesis (**Fig. 5e**). The salient finding was that tumors in *Ifngr1*<sup>-/-</sup> hosts developed a rich blood vessel network and tumor growth lead to the death of all recipients by day 30 (**Fig. 5e,f**). Moreover, injection of IFN- $\gamma$ -specific antibody totally abolished the antitumor activity of H7<sup>a</sup>-specific T cells and all mice had to be killed by day 26 (**Fig. 5f**). These data show that eradication of melanoma cells requires interaction

between T cell-derived IFN- $\gamma$  and its receptor on host cells, and point to tumor angiostasis as a key downstream effect of IFN- $\gamma$ .

### **MHC levels regulate susceptibility to H7<sup>a</sup>-specific T cells**

We next sought to determine whether susceptibility to killing by H7<sup>a</sup>-specific T cells was regulated by expression of MHC class I. To this end, we assessed induction of apoptosis by H7<sup>a</sup>-specific T cells in various target cells using the cell-permeable fluorogenic caspase 3 and 7 substrate PhiPhiLux. Splenocytes from mice primed against H7<sup>a</sup> were restimulated *in vitro* once and used as effector cells. When assessed on neoplastic cell lines and wild-type B10 cells, H2D<sup>b</sup> expression was about tenfold higher on hematolymphoid relative to nonhematolymphoid cells (**Fig. 6a**). These data are consistent with the fact that the number of H7<sup>a</sup> peptides per cell is approximately tenfold less on nonhematopoietic relative to hematopoietic cells<sup>6</sup>. Of note, when cultured with IFN- $\gamma$ , normal nonhematopoietic cells increased expression of MHC class I to the same level as B16.F10 melanoma cells (**Fig. 6b**). When tested on freshly harvested mouse cells and untreated tumor cells, H7<sup>a</sup>-specific cells specifically killed H7<sup>a</sup> hematolymphoid cells, but spared H7<sup>b</sup> splenocytes and H7<sup>a</sup> nonhematopoietic cells (**Fig. 6c**). Culture for 48 h in the presence of IFN- $\gamma$  markedly increased susceptibility of skin cells (fibroblasts and keratinocytes) and B16.F10 cells to H7<sup>a</sup>-specific effectors (**Fig. 6d**). As targets, we next used normal and tumor cells freshly harvested from B10 mice treated either with H7<sup>a</sup>-specific splenocytes or with syngeneic B10 splenocytes. In the latter experiment, only B16.F10 tumor cells harvested from recipients of H7<sup>a</sup>-specific splenocytes were killed by H7<sup>a</sup>-specific effectors (**Fig. 6e,f**). Susceptibility to killing by H7<sup>a</sup>-specific CD8 T cells (**Fig. 6c-f**) was strongly correlated with expression levels of MHC class I (**Fig. 5c,d** and **Fig. 6 a,b**). Killing of normal and neoplastic nonhematopoietic cells absolutely required a supply of IFN- $\gamma$ ; in its absence, only hematolymphoid cells expressed high enough levels of MHC class I to be killed. In melanoma-bearing B10 recipients of H7<sup>a</sup>-specific splenocytes, preferential accumulation of effector cells in the tumor (**Fig. 3a**) brings on a local increase in IFN- $\gamma$  levels and a specific upregulation of MHC class I on tumor cells (**Fig. 5b,c**). Consistent with these data, tumor cells harvested from these mice are uniquely susceptible to killing by H7<sup>a</sup>-specific T cells (**Fig. 6e**).

Two observations strongly suggest that induction of apoptosis by H7<sup>a</sup>-specific effectors represents genuine TCR-dependent cytotoxicity: susceptibility to killing of H7<sup>a</sup> targets (**Fig. 6c-f**) closely correlated with their MHC class I expression (**Fig. 5c,d** and **Fig. 6 a,b**); and H7<sup>b</sup> splenocytes were resistant (**Fig. 6c**). Consistent with this notion, we found that killing of three types of H7<sup>a</sup> targets was inhibited by H7<sup>a</sup>-H2D<sup>b</sup> tetramers but not by irrelevant tetramers nor by blocking antibody against Nkg2d (**Fig. 6g**). The inhibitory effect of H7<sup>a</sup>-H2D<sup>b</sup> tetramers was specific because these tetramers did not inhibit killing of HY-expressing targets by HY-specific T cells (data not shown). The Nkg2d-specific antibody used in our experiments inhibits killing of YAC-1 targets by natural killer cells<sup>22</sup>. We therefore conclude that induction of apoptosis by H7<sup>a</sup>-specific T cells was TCR-specific and independent of Nkg2d.



## DISCUSSION

This study shows that established solid tumor can be eradicated without inducing GVHD by injecting CD8<sup>+</sup> T cells primed against a single immunodominant minor H antigen, here H7<sup>a</sup>. Our data strongly suggest that the chain of events leading to eradication of solid tumor by H7<sup>a</sup>-specific T cells proceeded as follows. First, preferential accumulation of primed T cells occurred at the tumor site. This initial step was antigen independent. Second, the local release by H7<sup>a</sup>-specific T cells of IFN- $\gamma$  had two crucial effects: inhibition of tumor angiogenesis and upregulation of MHC class I on tumor cells. Finally, H7<sup>a</sup>-specific CD8<sup>+</sup> T cells underwent antigen-specific granule exocytosis in the tumor.

Specific attack on tumor cells in our model was initiated by the preferential accumulation of H7<sup>a</sup>-specific T cells in the tumor. Extravasation to non lymphoid sites is a feature of effector T cells, not of naive T cells. These data point to the importance of injecting activated T cells and suggest that adoptive transfer of unprimed T cells will likely be of limited efficacy for treatment of solid tumors. Conceptually, preferential migration of activated CD8<sup>+</sup> T cells to the tumor site makes sense. Tumor progression involves processes such as tissue invasion that activate inflammatory responses<sup>23</sup>, and the prime role of effector T cells is to migrate to inflammatory sites<sup>24</sup>. Consistent with this, H7<sup>a</sup>-specific TILs had the typical phenotype of effector T cells found in extralymphoid inflammatory sites: CD44<sup>hi</sup>, CD62L<sup>neg</sup>, Lfa-1<sup>hi</sup>, and V $\alpha$ -4<sup>hi</sup>. In CD44<sup>hi</sup>V $\alpha$ -4<sup>hi</sup> T cells, coanchoring of CD44 and V $\alpha$ -4 into a single bimolecular complex provides an efficient mechanism for egress of activated T cells into inflamed tissues<sup>25,26</sup>. Vcam-1, the ligand of V $\alpha$ -4, is not expressed on normal blood vessels, but several studies have shown that upregulation of Vcam-1 is one of the most salient features of tumor neovessels<sup>27-30</sup>. Consistent with this, we found upregulation of Vcam-1 specifically in tumor blood vessels. Moreover, we showed that the antitumor effect of H7<sup>a</sup>-specific T cells was totally abrogated by injection of Vcam-1-specific antibody. Though we cannot currently exclude a role for other receptor-ligand pairs, our data strongly suggest that interactions between T-cell V $\alpha$ -4 and Vcam-1 on tumor vessels account for the preferential accumulation of H7<sup>a</sup>-specific T cells to the tumor site.

Tumor eradication in our model was absolutely subordinate to a local supply of IFN- $\gamma$  by H7<sup>a</sup>-specific T cells. Two effects of IFN- $\gamma$  were required for tumor eradication: tumor angiostasis and upregulation of MHC class I on tumor cells. These data show that T-cell rejection of solid tumors requires targeting of both tumor vessels and neoplastic cells. In the absence of IFN- $\gamma$ , expression of MHC class I on nonhematopoietic cells was below the threshold needed for killing by H7<sup>a</sup>-specific effector T cells. Preferential homing of H7<sup>a</sup>-specific T cells to the tumor site brought about a selective upregulation of MHC class I on tumor cells. Thus, targeted delivery of IFN- $\gamma$  by TILs was key to the tumor selectivity of H7<sup>a</sup>-specific T cells.

A key element responsible for the potency of the GVT effect mediated by minor H antigen-specific T cells is that minor H antigens are nonself epitopes for the allogeneic T-cell donor. Thus, whereas TAA-specific T cells elicited by cancer vaccines recognize their target antigen with low avidity (because of the constraints imposed by self tolerance), immunodominant minor H antigen-specific T cells react with high avidity with their nonself target<sup>31-33</sup>. Recent progress in engineering of high-avidity TCRs<sup>34</sup> and in transfer genes encoding the TCR in human T lymphocytes<sup>35</sup> might further improve our ability to generate high-avidity T cells for cancer immunotherapy in humans.

There is evidence that targeting a single minor H antigen entails no toxicity whatsoever to the recipient. Thus, whether donor and recipient present one (congenic mice) or multiple (C3H.SW vs C57BL/10) minor H antigen differences, injection of T cells specific for a single host minor H antigen does not cause GVHD<sup>6,36</sup>. Results presented herein should therefore provide an impetus for translating our minor H antigen-based approach into human clinical trials for treatment of solid tumors. The design of such trials would involve host lymphodepletion followed by injection of two populations of donor cells: hematopoietic stem cells and primed donor T cells specific for a single host minor H antigen expressed on tumor cells. One potential target would be HA-1 because it is expressed on most solid tumors<sup>37</sup>. Lymphodepletion and injection of hematopoietic stem cells serve to prevent two complications: rejection of transplanted

donor cells and development of bone marrow aplasia in the recipient. The first is relevant in all cases, the second is important in cases where the target minor H antigen is expressed on host hematopoietic cells. Indeed, in contrast with epithelial cells, hematopoietic cells express high levels of MHC class I molecules and their recognition by minor H antigen-specific T cells might cause bone marrow aplasia. To prevent the occurrence of GVHD, the hematopoietic stem cell inoculum must be depleted of T-cells<sup>6</sup>. Finally, this study allowed us to solve a perplexing and important question: how can T lymphocytes specific for an epitope that is not tumor-specific selectively eradicate tumor cells without causing GVHD? The key element was the preferential migration of primed T cells to the tumor site. If generally applicable, this concept may alleviate a major hurdle of adoptive immunotherapy of solid tumors: it would be possible to target an MHC class I-associated epitope even if it might be expressed on some or even most nonneoplastic cells. This is particularly relevant to minor H antigens because, aside from a few that are restricted to the hematopoietic lineage<sup>38</sup>, most minor H antigens have a wide tissue distribution<sup>11,19,39</sup>.

## METHODS

**Mice and statistics.** We obtained the following strains of mice from the Jackson Laboratory and bred in the Guy-Bernier Research Center: B10.C-H7<sup>b</sup>/Sn (B10.H7<sup>b</sup>), C57BL/10J (B10) and IFN- $\gamma$ -receptor deficient mice (B6.129S7-*Ifngr1*<sup>tm1Agt/J</sup> (*Ifngr1*<sup>-/-</sup>)). We cared for mice and performed experimental procedures under approval from the Animal Care Committee of the Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital and according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. We tested differences between group means using Student *t*-test.

**Tumor cells.** We obtained EL4 thymoma, B16.F10 melanoma and YAC-1 lymphoma cell lines from the American Type Culture Collection.

**Cell transplantation.** H7<sup>a</sup>-positive recipients (B10 or *Ifngr1*<sup>-/-</sup> mice) received 1,200 cGy total body irradiation from a <sup>60</sup>Co source at a dose rate of 128 cGy/min on day 0, the day of transplant. On day 0, mice also received 10<sup>7</sup> T-depleted bone marrow cells as a single intravenous injection through the tail vein and 2 x 10<sup>5</sup> tumor cells as a single subcutaneous injection in the right flank. Tumor size was measured every 48 h and mice were killed when the largest tumor diameter reached 17 mm. On day 3 or 7, splenocytes (5 x 10<sup>7</sup>) from either unprimed donors or donors immunized against H7<sup>a</sup> or H7<sup>b</sup> were given intravenously (**Supplementary Fig. 1** online). Splenocyte suspensions (5 x 10<sup>7</sup> cells) from donors primed against H7<sup>a</sup> or H7<sup>b</sup> contained 2.5 ± 0.3 x 10<sup>5</sup> antigen-specific (tetramer-positive) CD8<sup>+</sup> T cells. We performed priming of B10.H7<sup>b</sup> donors against H7<sup>a</sup> by intraperitoneal injection of 2 x 10<sup>7</sup> B10 spleen cells 14 d before adoptive transfer. We similarly performed priming of B10 donors against H7<sup>b</sup> by injection of B10.H7<sup>b</sup> cells.

**Depletion T-cell subsets and Vcam-1 blocking.** We depleted splenocytes of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes with microbeads (Mylteni Biotec Inc.) before injection into recipients. We maintained depletion of T-cell subsets in host mice by intraperitoneal injection with 200  $\mu$ g CD4-specific (Gk1.5) or CD8-specific (2.43) antibody on days 0, 3, 6, 9, 12 and 15. We obtained antibodies from hybridoma supernatants (American Type

Culture Collection), cultured them initially following the manufacturer's instructions and subsequently sub-cultured in serum-free medium (Invitrogen). We then concentrated culture supernatants using CentriconPlus-80 (Millipore Corporation) and buffered them with a TRIS 1M pH 8.0 solution to a pH of 7.6. We performed antibody quantification by radial immunodiffusion (The Binding Site Inc.). For blocking of Vcam-1 *in vivo*, we intravenously injected recipient mice with 250  $\mu$ g of purified antibody to mouse Vcam-1 (Biolegend, clone 429) every 72 h from day 7 to 30. Control mice received isotype-matched rat IgG1.

**Flow cytometry and immunohistochemistry.** We purchased antibodies specific for the following molecules from BD Pharmingen: CD8 (53-6.7), CD31 (MEC 13.3), activation-induced CD43 isoform (1B11), H2D<sup>b</sup> (KH95), Lamp1 (1D4B) and Nkg2d (CX5). Abs against Lfa-1 (RM800030) and V $\alpha$ -4 (RM110035) were from Antigenix America Inc., and those against CD44 (11-0441) and CD62L (11-0621) from eBioscience. We obtained phycoerythrin-labeled H7<sup>a</sup>-H2D<sup>b</sup>, H7<sup>b</sup>-H2D<sup>b</sup> and LCMVgp33-41/H2D<sup>b</sup> tetramers from the tetramer core facility of the Canadian Network for Vaccines and Immunotherapeutics. Intracellular staining for IFN- $\gamma$  was realized with the CYTOFIX/CYTOPERM kit from BD Pharmingen on freshly harvested cells or cells stimulated *in vitro* for 4 hours with phorbol myristyl acetate and ionomycin. We analysed cell suspensions on a FACScalibur using the CellQuest program (Becton Dickinson) as previously described<sup>6,7</sup>. We snap froz specimens for immunohistochemistry in isopentane and stored at -80°C until used. We fixed sections in cold acetone, incubated them with primary antibodies at room temperature for 1 h, washed in PBS-Tween, and incubated them with secondary antibody (biotin labeled rat IgG1-specific, BD Pharmingen) for 1 h. After antibody staining, we incubated sections with avidin-alkaline phosphatase for 30 min, then naphtol and fast red for 8 min at 20 °C.

**IFN- $\gamma$  dosage and depletion *in vivo*.** We performed IFN- $\gamma$  dosage studies using cytometric bead array system (mouse inflammation kit) from Becton Dickinson following the manufacturer's instructions. For IFN- $\gamma$  depletion *in vivo*, we intravenously injected

recipient mice. with 10  $\mu\text{g}$  of antibody to IFN- $\gamma$  (BD Pharmingen, R4-6A2) or isotype control immunoglobulin (BD Pharmingen, R3-34) every 48 h from day 7 to 17.

**Cytotoxicity assay.** We isolated nonhematolymphoid target cells as previously described<sup>39</sup>. We obtained H7<sup>a</sup>-specific splenocytes from B10.H7<sup>b</sup> mice injected with  $2 \times 10^7$  B10 splenocytes on day -14. We restimulated splenocytes harvested on day 0 *in vitro* for 5 days with B10 splenocytes in complete medium and then used them in cytotoxicity assays. We evaluated cytolytic activity of H7<sup>a</sup>-specific T cells using the PhiPhiLux cell-permeable fluorogenic caspase 3 and 7 substrate (OncoImmunit Inc) as previously described<sup>40</sup>. We performed blocking experiments by adding saturating concentrations of purified Nkg2d-specific antibody and/or MHC-peptide tetramers during the cytotoxicity assay.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by Grant 014271 (to C.P.) from the National Cancer Institute of Canada. M.-C.M is supported by a training grant from the National Cancer Institute of Canada. J.-S.D. is supported by a training grant from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. C.P. holds a Canada Research Chair in Immunobiology. We thank J.A Kashul for editorial assistance.

## REFERENCES

1. Finn, O. J. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nature Rev. Immunol.* **3**, 630-641 (2003).
2. Rosenberg, S. A., Yang, J. C., & Restifo, N. P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* **10**, 909-915 (2004).
3. Bleakley, M. & Riddell, S. R. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 371-380 (2004).
4. Perreault, C. & Brochu, S. Adoptive cancer immunotherapy: discovering the best targets. *J. Mol. Med.* **80**, 212-218 (2002).
5. Molldrem, J. J. *et al.* Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat. Med.* **6**, 1018-1023 (2000).
6. Fontaine, P. *et al.* Adoptive transfer of T lymphocytes targeted to a single immunodominant minor histocompatibility antigen eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat. Med.* **7**, 789-794 (2001).
7. Meunier, M. C., Roy-Proulx, G., Labrecque, N., & Perreault, C. Tissue distribution of target antigen has a decisive influence on the outcome of adoptive cancer immunotherapy. *Blood* **101**, 766-770 (2003).
8. Bevan, M. J. Helping the CD8<sup>+</sup> T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 595-602 (2004).
9. Pion, S. *et al.* On the mechanisms of immunodominance in cytotoxic T lymphocyte responses to minor histocompatibility antigens. *Eur. J. Immunol.* **27**, 421-430 (1997).
10. Roy-Proulx, G., Meunier, M. C., Lanteigne, A. M., Brochu, S., & Perreault, C. Immunodomination results from functional differences between competing CTL. *Eur. J. Immunol.* **31**, 2284-2292 (2001).



11. Eden, P. A. *et al.* Biochemical and immunogenetic analysis of an immunodominant peptide (B6<sup>dom1</sup>) encoded by the classical *H7* minor histocompatibility locus. *J. Immunol.* **162**, 4502-4510 (1999).
12. Rubio, V. *et al.* Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nat. Med.* **9**, 1377-1382 (2003).
13. Harrington, L. E., Galvan, M., Baum, L. G., Altman, J. D., & Ahmed, R. Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans. *J. Exp. Med.* **191**, 1241-1246 (2000).
14. Von Andrian, U. H. & Mackay, C. R. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1020-1034 (2000).
15. Issekutz, A. C. & Issekutz, T. B. The role of E-selectin, P-selectin, and very late activation antigen-4 in T lymphocyte migration to dermal inflammation. *J. Immunol.* **168**, 1934-1939 (2002).
16. Thatte, J., Dabak, V., Williams, M. B., Braciale, T. J., & Ley, K. LFA-1 is required for retention of effector CD8 T cells in mouse lungs. *Blood* **101**, 4916-4922 (2003).
17. Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **21**, 137-148 (2004).
18. Spiotto, M. T., Rowley, D. A., & Schreiber, H. Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors. *Nat. Med.* **10**, 294-298 (2004).
19. Griem, P. *et al.* Uneven tissue distribution of minor histocompatibility proteins versus peptides is caused by MHC expression. *Cell* **65**, 633-640 (1991).
20. Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 163-189 (2004).
21. Schüler, T. & Blankenstein, T. Cutting Edge: CD8<sup>+</sup> effector T cells reject tumors by direct antigen recognition but indirect action on host cells. *J. Immunol.* **170**, 4427-4431 (2003).

22. Ogasawara, K. *et al.* NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity* **20**, 757-767 (2004).
23. Wang, T. *et al.* Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat. Med.* **10**, 48-54 (2004).
24. Butcher, E. C. & Picker, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* **272**, 60-66 (1996).
25. Siegelman, M. H., Stanescu, D., & Estess, P. The CD44-initiated pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion. *J. Clin. Invest.* **105**, 683-691 (2000).
26. Nandi, A., Estess, P., & Siegelman, M. Bimolecular complex between rolling and firm adhesion receptors required for cell arrest; CD44 association with VLA-4 in T cell extravasation. *Immunity* **20**, 455-465 (2004).
27. Kuzu, I., Bicknell, R., Fletcher, C. D., & Gatter, K. C. Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors. *Lab. Invest.* **69**, 322-328 (1993).
28. Dienst, A. *et al.* Specific occlusion of murine and human tumor vasculature by VCAM-1-targeted recombinant fusion proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 733-747 (2005).
29. Byrne, G. J. *et al.* Serum soluble vascular cell adhesion molecule-1: role as a surrogate marker of angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1329-1336 (2000).
30. Amatschek, S. *et al.* Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res.* **64**, 844-856 (2004).
31. Gervois, N., Guilloux, Y., Diez, E., & Jotereau, F. Suboptimal activation of melanoma infiltrating lymphocytes (TIL) due to low avidity of TCR/MHC-tumor peptide interactions. *J. Exp. Med.* **183**, 2403-2407 (1996).

32. Hernandez, J., Lee, P. P., Davis, M. M., & Sherman, L. A. The use of HLA A2.1/p53 peptide tetramers to visualize the impact of self tolerance on the TCR repertoire. *J. Immunol.* **164**, 596-602 (2000).
33. Yoshimura, Y. *et al.* Duration of alloantigen presentation and avidity of T cell antigen recognition correlate with immunodominance of CTL response to minor histocompatibility antigens. *J. Immunol.* **172**, 6666-6674 (2004).
34. Li, Y. *et al.* Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display. *Nat. Biotechnol.* **23**, 349-354 (2005).
35. Morgan, R. A. *et al.* High efficiency TCR gene transfer into primary human lymphocytes affords avid recognition of melanoma tumor antigen glycoprotein 100 and does not alter the recognition of autologous melanoma antigens. *J. Immunol.* **171**, 3287-2777 (2003).
36. Korngold, R., Leighton, C., Mobraaten, L. E., & Berger, M. A. Inter-strain graft-vs.-host disease T-cell responses to immunodominant minor histocompatibility antigens. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **3**, 57-64 (1997).
37. Klein, C. A. *et al.* The hematopoietic system-specific minor histocompatibility antigen HA-1 shows aberrant expression in epithelial cancer cells. *J. Exp. Med.* **196**, 359-368 (2002).
38. Spierings, E., Wieles, B., & Goulmy, E. Minor histocompatibility antigens - big in tumour therapy. *Trends Immunol.* **25**, 56-60 (2004).
39. de Bueger, M., Bakker, A., Van Rood, J. J., van der Woude, F., & Goulmy, E. Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. Ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens. *J. Immunol* **149**, 1788-1794 (1992).
40. Liu, L. *et al.* Visualization and quantification of T cell-mediated cytotoxicity using cell-permeable fluorogenic caspase substrates. *Nat. Med.* **8**, 185-189 (2002).

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** H7<sup>a</sup>-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes can cure melanoma. Tumor surface area (**a**) and survival (**b**) of experimental groups treated as described and injected on day 0 with B16.F10 melanoma cells and on day 3 with unprimed syngeneic splenocytes or with H7<sup>a</sup>-specific splenocytes. B10.H7<sup>b</sup>-derived H7<sup>a</sup>-specific splenocytes were unmanipulated, CD4<sup>+</sup> T-cell depleted or CD8<sup>+</sup> T-cell depleted. There were 6-10 mice per group. Each dot in **a** represents the tumor in one mouse.

**Figure 2.** The antitumor efficacy of adoptively transferred T cells is regulated by expression of target antigen on tumor cells. Tumor surface area (**a**) and survival (**b**) of experimental groups treated as described and injected with B16.F10 melanoma cells on day 0 and splenocytes on day 7. B10 mice were treated with unprimed syngeneic splenocytes, or splenocytes primed against H7<sup>a</sup> or H7<sup>b</sup>. There were 10-20 mice per group. Each dot in **a** represents tumor in one mouse; dots below the dashed line represent tumor-free mice. The mean survival times for the three groups (**b**) were significantly different: red versus blue,  $P = 1.7 \times 10^{-12}$ ; red versus green,  $P = 2.9 \times 10^{-10}$ ; blue versus green,  $P = 1.5 \times 10^{-7}$ .

**Figure 3.** Preferential T-cell accumulation in the tumor is antigen independent but degranulation is antigen dependent. B10 mice received tumor cells on day 0 and H7<sup>a</sup>-specific (black bars), H7<sup>b</sup>-specific (white bars) or unprimed (gray bar) splenocytes on day 7. Cell suspensions from tissues and organs were obtained on day 19, stained with H7<sup>a</sup>-H2D<sup>b</sup> tetramers and antibodies against CD8, activation-induced isoform of CD43 (1B11) and Lamp1, and analyzed by flow cytometry. Labeling with H7<sup>a</sup>-H2D<sup>b</sup> tetramers and 1B11 monoclonal antibody<sup>13</sup> were used to identify antigen-reactive CD8<sup>+</sup> T cells in recipients of H7<sup>a</sup>-specific and H7<sup>b</sup>-specific splenocytes, respectively. We studied lymphocytes infiltrating various tissues of melanoma-bearing B10 mice (**a,b**) and various tumor types (**c-e**). (**a**) Percentage of CD8<sup>+</sup> T cells that expressed H7<sup>a</sup>-H2D<sup>b</sup> tetramer and

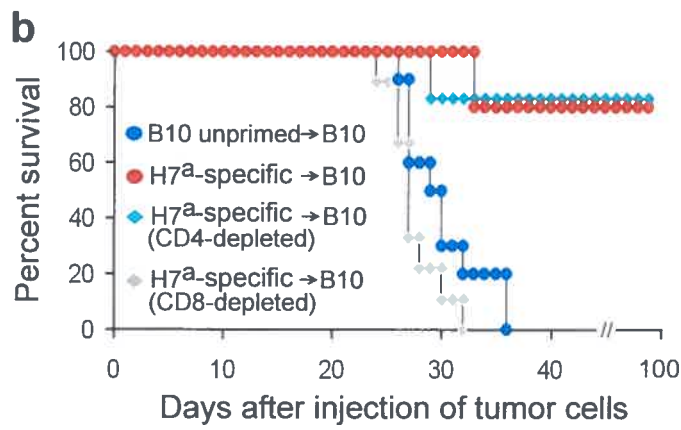
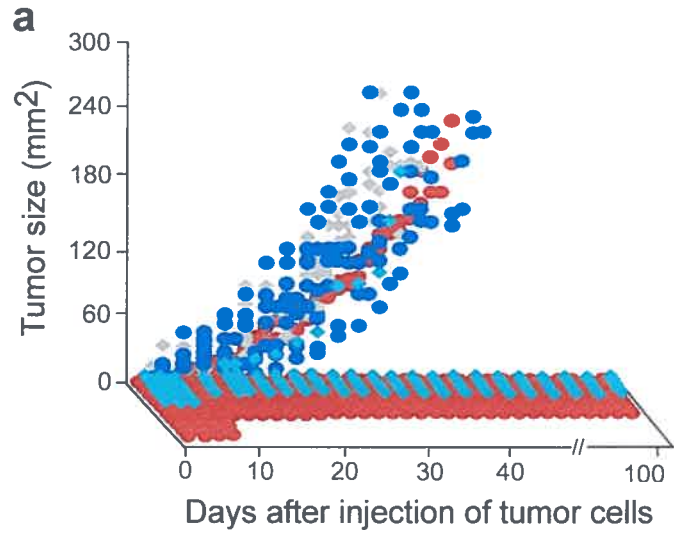
(b) percentage of Lamp1<sup>+</sup> cells among CD8<sup>+</sup> H7<sup>a</sup>-H2D<sup>b</sup> tetramer<sup>+</sup> T cells in recipients of H7<sup>a</sup>-specific splenocytes. (c) Percentage of CD8<sup>+</sup> T cells among all cells explanted from the tumor (neoplastic cells and tumor-infiltrating leukocytes). (d) Percentage of antigen-reactive T cells among CD8<sup>+</sup> T cells. (e) Percentage of Lamp1<sup>+</sup> cells among antigen-reactive CD8<sup>+</sup> T cells. Bars correspond to mean percentages  $\pm$  s.d. (three mice per group). Numbers over bars represent absolute numbers (mean  $\times 10^3$ ) of relevant T cells per million organ or tissue cells (a) or per tumor (c-e). \*  $P < 0.01$  relative to recipients of H7<sup>a</sup>-specific or H7<sup>b</sup>-specific splenocytes; †  $P < 0.01$  compared with mice bearing B16.F10 or EL4 tumors treated with H7<sup>a</sup>-specific splenocytes.

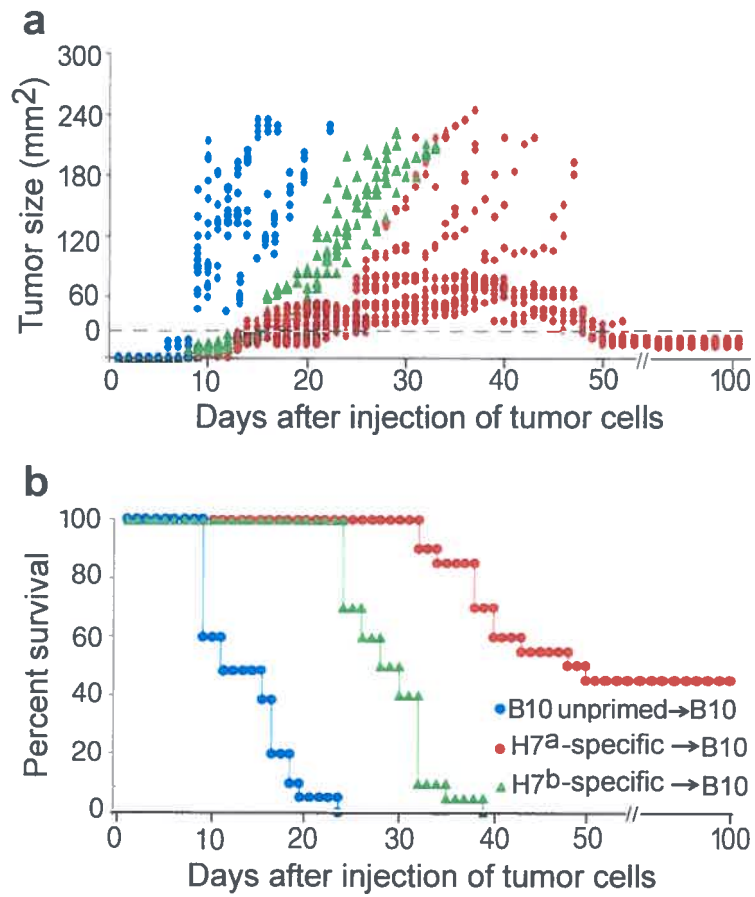
**Figure 4.** Characterization of TILs and tumor blood vessels. B10 mice injected with B16.F10 melanoma cells received H7<sup>a</sup>-specific, H7<sup>b</sup>-specific or unprimed syngeneic splenocytes on day 7. (a) TILs harvested on day 19 were stained with H7<sup>a</sup>-H2D<sup>b</sup> tetramers and antibodies against CD8, CD43 activation-associated glycoform (1B11), CD44, CD62L, Lfa-1, Nkg2d and V1a-4. Labeling with H7<sup>a</sup>-H2D<sup>b</sup> tetramers and 1B11 monoclonal antibody<sup>13</sup> was used to identify antigen-reactive CD8<sup>+</sup> TILs in recipients of H7<sup>a</sup>-specific and H7<sup>b</sup>-specific splenocytes, respectively. CD8<sup>+</sup> splenocytes from untreated B10 mice were used as negative controls. MFI, mean fluorescence intensity. (b) Frozen sections of tumors and normal skin obtained on day 19 were stained with Vcam-1-specific antibody. (a,b) One representative experiment out of three. (c,d) The antitumor effect of H7<sup>a</sup>-specific T cells can be inhibited by antibody specific for Vcam-1. Tumor surface area (c) and survival (d) in mice treated with unprimed syngeneic splenocytes or H7<sup>a</sup>-specific splenocytes. Recipients of H7<sup>a</sup>-specific splenocytes were injected with antibody to mouse Vcam-1, isotype-matched rat IgG1 or no immunoglobulins. There were eight mice per group. Each dot in c represents tumor in one mouse; dots below the dotted line represent tumor-free mice. Mean survival times: black versus red or green,  $P < 0.002$ ; green versus red, difference not statistically significant.

**Figure 5.** TILs-derived IFN- $\gamma$  upregulates MHC class I expression on tumor cells and inhibits tumor angiogenesis. Mice injected with B16.F10 melanoma cells received H7<sup>a</sup>-specific, H7<sup>b</sup>-specific or unprimed splenocytes on day 7. Experiments depicted in (a-e)

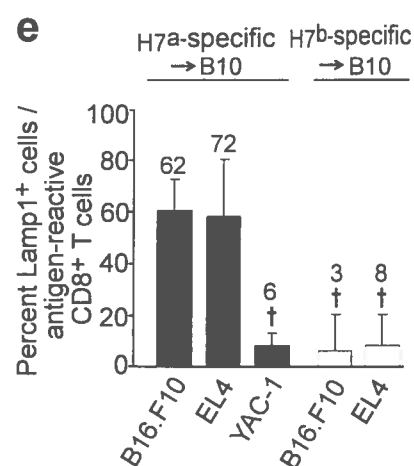
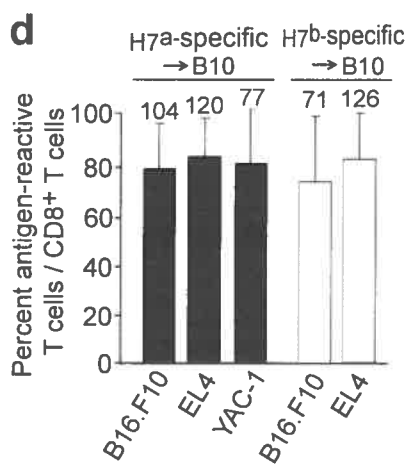
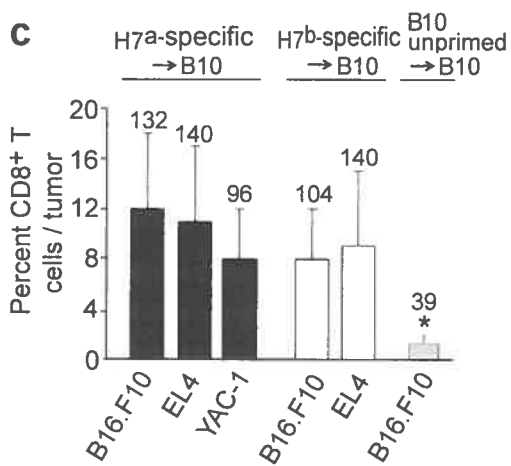
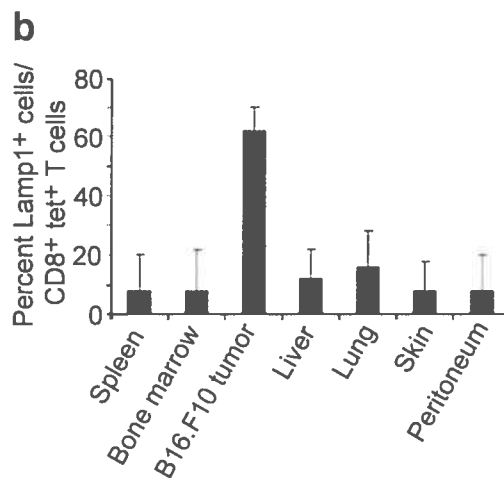
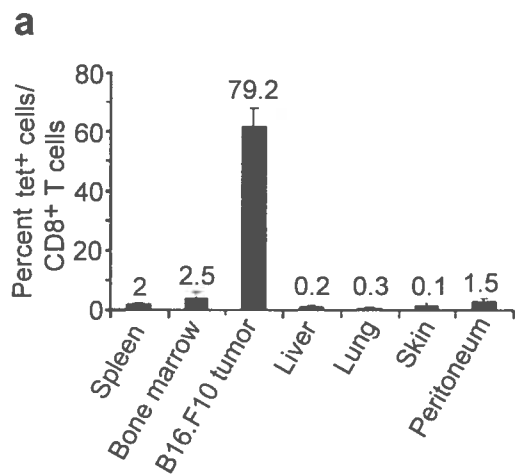
were performed on day 19 on three mice per group. In flow cytometry histograms (**a,c,d**), dotted lines represent staining with isotype control antibody. (**a**) Intracellular staining for IFN- $\gamma$  was performed on freshly harvested and *in vitro* restimulated antigen-reactive TILs. (**b**) IFN- $\gamma$  concentrations were measured in extracts from various tissues (mean  $\pm$  s.d.). (**c,d**) Freshly harvested skin, liver and tumor cells were stained with H2D<sup>b</sup>-specific antibody (numbers in graphs correspond to the mean fluorescence intensity). (**e**) Tumor angiostasis is IFN- $\gamma$  dependent. Day-19 tumors from B10 or *Ifngr1*<sup>-/-</sup> recipients were immunostained with CD31-specific antibody. (**f**) Tumor eradication is IFN- $\gamma$  dependent. Mice were treated with unprimed B10 T cells or H7<sup>a</sup>-specific splenocytes. Recipients of H7<sup>a</sup>-specific splenocytes were either *Ifngr1*<sup>-/-</sup> or B10 hosts; B10 hosts were treated with depleting IFN- $\gamma$ -specific antibody, isotype matched antibody or no antibody. There were ten mice per group.

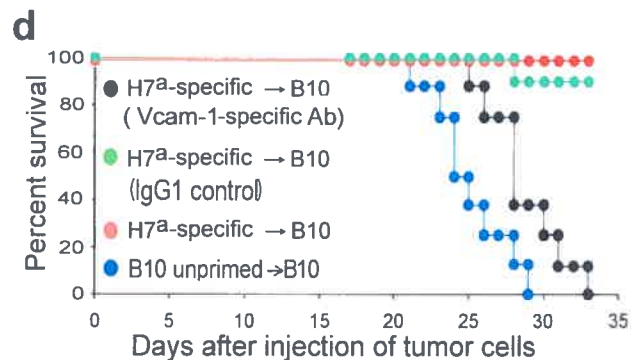
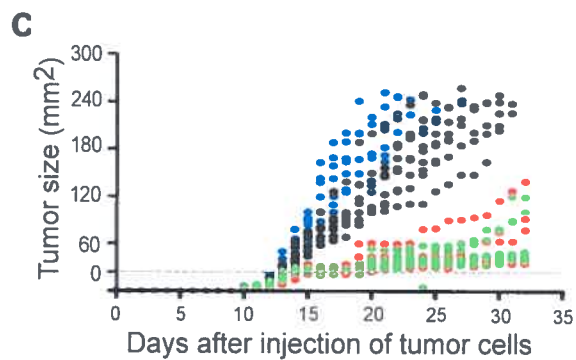
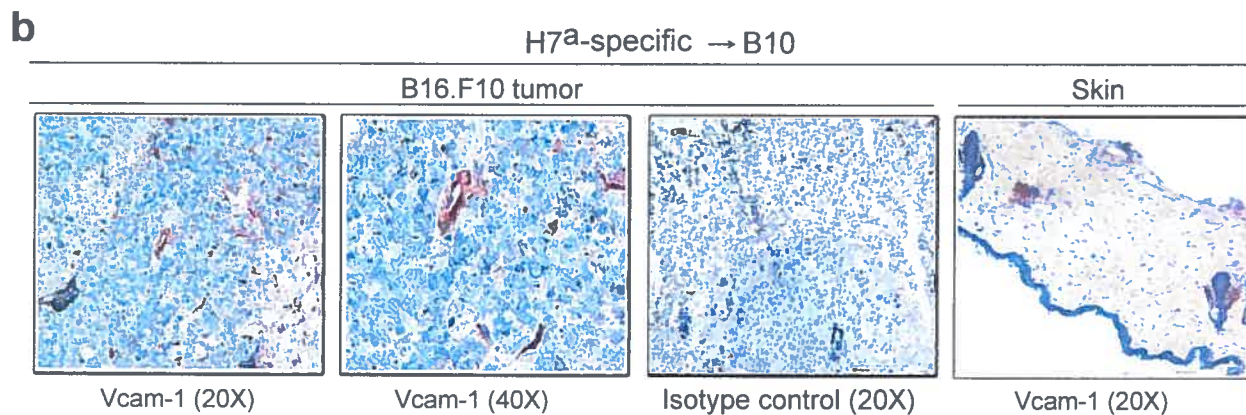
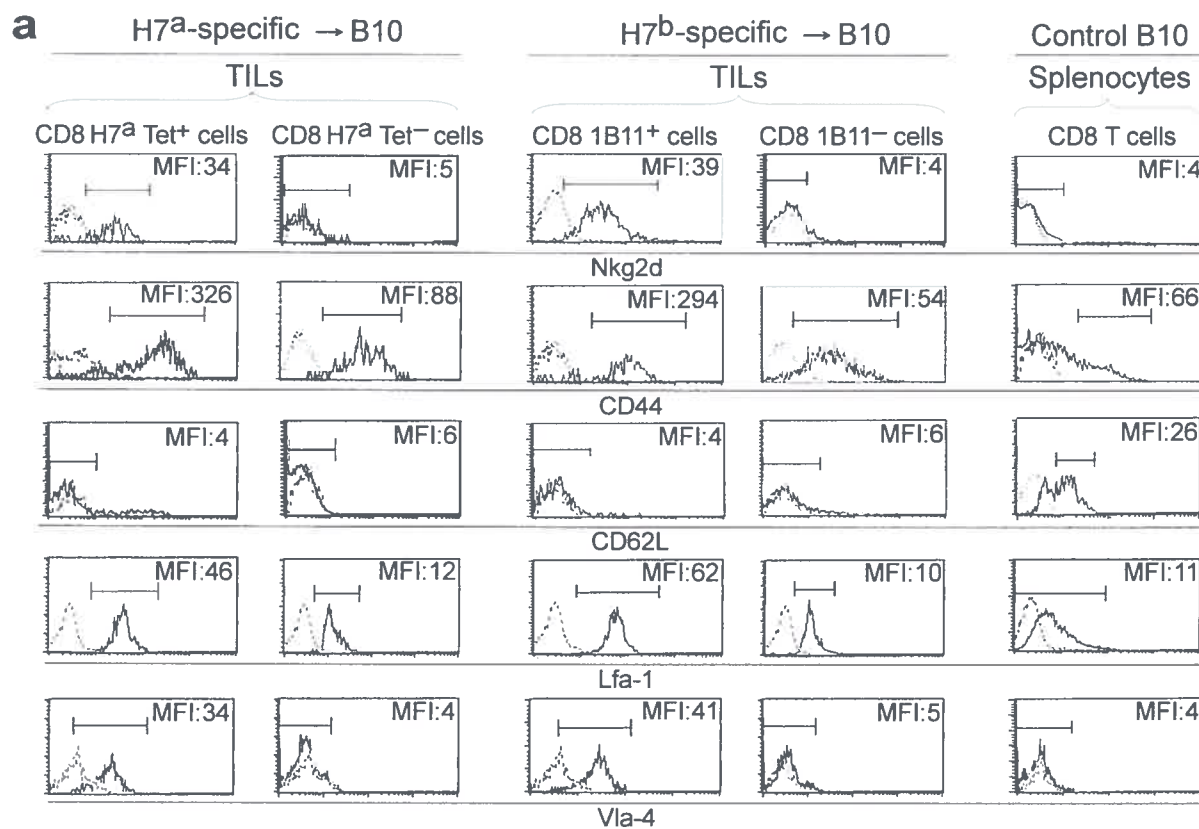
**Figure 6.** Killing of target cells by H7<sup>a</sup>-specific effectors is TCR dependent and correlates with MHC class I expression. (**a,b**) Labeling with H2D<sup>b</sup>-specific antibody was performed on various cell types. Numbers in graphs correspond to the mean fluorescence intensity of cells stained with antibody to H2D<sup>b</sup> (solid lines) and dotted lines represent staining with isotype control antibody: (**a**) tumor cell lines (B16.F10 melanoma and EL4 lymphoma) and normal cells from untreated B10 mice; (**b**) cells cultured for 48 h with IFN- $\gamma$ . (**c-g**) After incubation of target cells with H7<sup>a</sup>-specific T cells, PhiPhiLux was added and target cells were analyzed for apoptosis using flow cytometry analysis. (**c-f**) Effector to target ratios (E:T) were 25:1 (black bars), 10:1 (gray bars) and 1:1 (open bars). (**c**) B16.F10 and EL4 tumor cell lines and normal cells from untreated B10 mice. (**d**) Target cells cultured with IFN- $\gamma$ . (**e-f**) Freshly explanted cells from B16.F10 melanoma bearing mice treated with H7<sup>a</sup>-specific splenocytes (**e**) or with syngeneic B10 splenocytes (**f**). (**g**) Inhibition of target cell killing by H7<sup>a</sup>-H2D<sup>b</sup> tetramers, the irrelevant LCMVgp33-41/H2D<sup>b</sup> tetramer (negative control), and Nkg2d-specific antibody. \*  $P < 0.001$  relative to cytotoxicity in absence of inhibition.

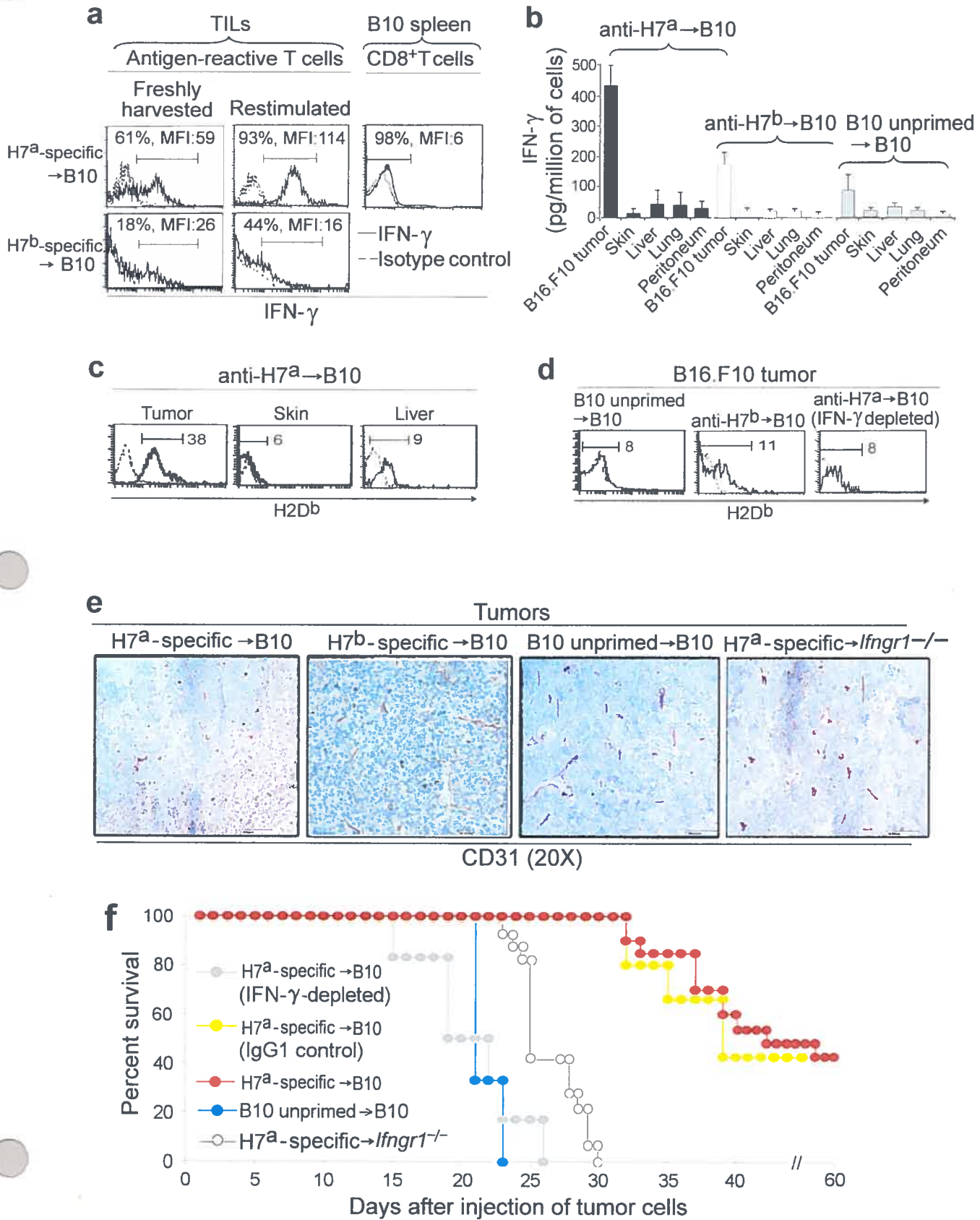


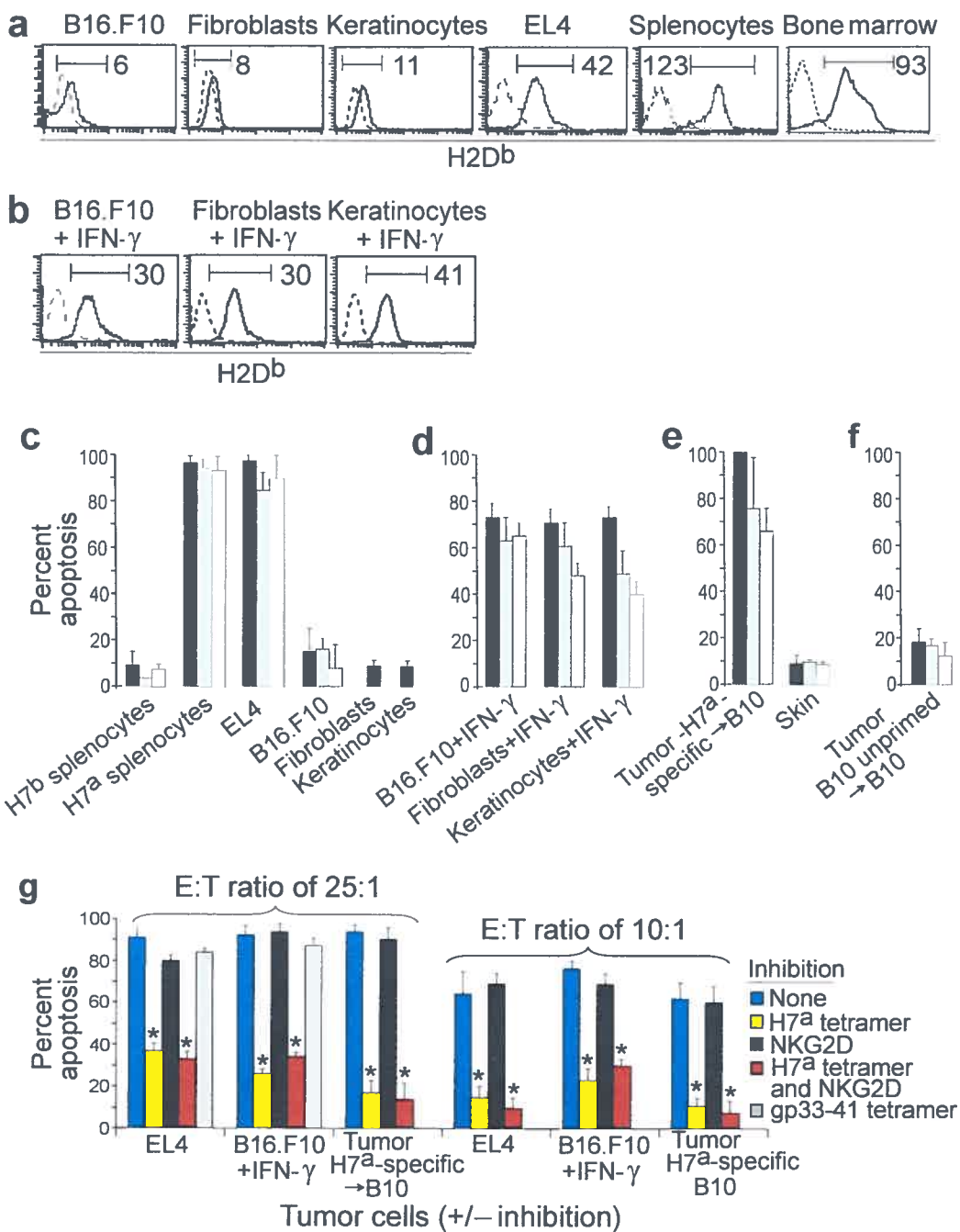


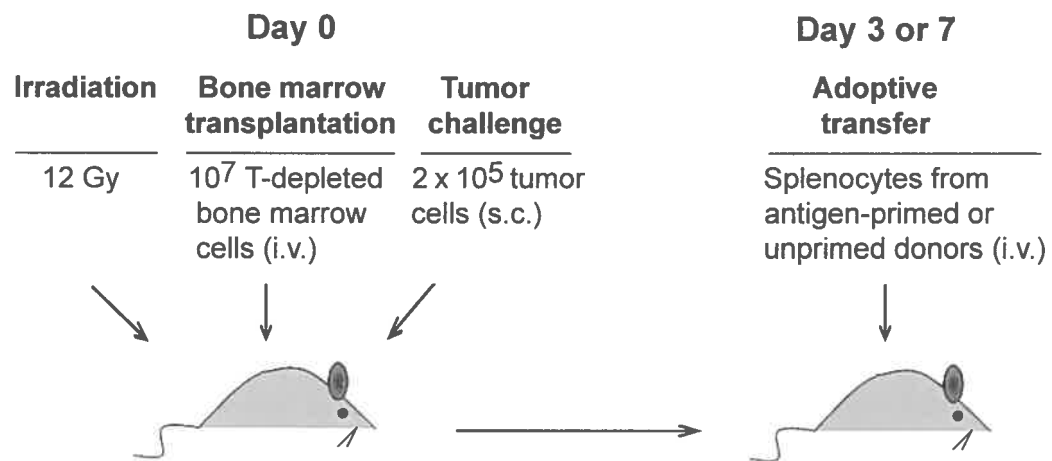












**Supplementary Figure 1.** Experimental model. Irradiated female recipients were injected on day 0 with  $10^7$  T cell-depleted bone marrow cells (i.v.) and  $2 \times 10^5$  tumor cells (s.c.). Unless stated otherwise, tumor cells were B16.F10 melanoma cells. For treatment, on day 3 or 7, mice received splenocytes from unprimed or Ag-primed donors. Splenocytes were syngeneic (B10 or B10.H7<sup>b</sup>) with the bone marrow cells.

Mice	H7 <sup>a</sup>	Tumor	H7 <sup>a</sup>
B10	+	B16.F10	+
<i>lfng1</i> <sup>-/-</sup>	+	EL4	+
B10.H7 <sup>b</sup>	-	YAC-1	-

**Supplementary Table 1.** H7<sup>a</sup> genotype of mice and tumors used in this work.

## 3.2. ARTICLE # 2

# Asynchronous differentiation of CD8 T cells that recognize dominant and cryptic antigens <sup>1</sup>

Chantal Baron\*<sup>†</sup>, Marie-Christine Meunier\*<sup>†</sup>, Étienne Caron\*<sup>†</sup>, Caroline Côté\*<sup>†</sup>,  
Mark J. Cameron<sup>‡</sup>, David J. Kelvin<sup>‡</sup>, Richard LeBlanc<sup>§</sup>, Vincent Rineau\*<sup>†</sup>  
and Claude Perreault\*<sup>†2</sup>

\*Institute of Research in Immunology and Cancer, University of Montreal, Montreal, QC,  
Canada H3C 3J7

<sup>†</sup>Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, QC,  
Canada H1T 2M4

<sup>‡</sup>Toronto General Research Institute, 200 Elizabeth Street, Toronto, ON,  
Canada M5G 2C1

<sup>§</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Fleurimont, QC, Canada J1H 5N4

*The Journal of Immunology, Volume 177, p. 8466-8475, 2006*

## Abstract

Restriction of T cell responses to a few epitopes (immunodominance) is a central feature of immune responses. We analyzed the entire transcriptome of effector CD8 T cells specific for a dominant (H7<sup>a</sup>) and a cryptic (HY) mouse Ag, and performed a longitudinal analysis of selected T cell differentiation markers. We found that Ag specificity had a relatively modest influence on the repertoire of genes that are transcriptionally modulated by the CD8 T cell differentiation program. Although the differentiation programs of anti-H7<sup>a</sup> and anti-HY T cells were similar, they did not progress simultaneously. The expansion peak of anti-H7<sup>a</sup> T cells was reached on day 10 while that of anti-HY T cells was attained on day 15 to 20. Between day 10 and day 20, anti-H7<sup>a</sup> T cells were in the contraction phase and anti-HY T cells in the expansion phase. Furthermore, expansion and development of effector function were well synchronized in anti-H7<sup>a</sup> T cells but were disconnected in anti-HY T cells. We propose that, by leading to selective expansion of the fittest CD8 T cells, immunodominance may be beneficial to the host. Inhibition of T cell response to cryptic Ag would ensure that host resources (APC, cytokines) for which T cells compete, are devoted to T cells with the best effector potential. One implication is that favoring expansion of the fittest effector T cells in general may be more important than increasing the diversity of the T cell repertoire.



## Introduction

Under experimental conditions, it is relatively easy to elicit CD8 T cell responses against an epitope presented alone on professional APCs, provided Ag-reactive T cells are present in the T cell repertoire. However, this situation has little to do with real-life conditions. Indeed, during the course of infection, T cells are confronted with APCs that present a multitude of nonself epitopes. Strikingly, under the latter circumstances, CD8 T cells respond to only a few immunodominant epitopes and neglect other potentially immunogenic peptides (cryptic epitopes). Restriction of CD8 T cell responses to a few selected epitopes has been termed immunodominance, a central and robust feature of immune responses (1-8). At face value, immunodominance is counterintuitive. Focusing on one or a few targets allows pathogens to escape by selectively mutating the relevant epitope(s) (9). The risk is particularly severe in the case of pathogens with a high mutation rate such as HIV, influenza virus and hepatitis C virus (10-12). Thus, immunodominance presents a major hurdle to developing vaccines that generate effective CD8 T cell responses (7). In fact, the sole hypothetical justification for immunodominance is that limiting the diversity of the immune response might reduce the potential for crossreactive autoimmune recognition (13).

The immunodominance hierarchy is largely dictated by the immunodomination process whereby dominant epitopes abrogate response to nondominant epitopes (14). Immunodomination results from cross-competition between T cells specific for different epitopes (15). The mechanisms of immunodomination remain ill-defined. In most models, the elusive key event occurs at the T cell/APC interface since immunodomination disappears when

competing epitopes are presented on different APCs or when APCs are present in large excess (3,16-21). Several non mutually exclusive explanations have been proposed for this. Dominating T cells may kill or exhaust APCs, monopolize APC resources, or directly send inhibitory signals to nondominant T cells (7,15,19,22,23). Two studies reported that injection of very large numbers of memory CD8 T cells specific for immunodominated Ag did not enable these T cells to compete more successfully against T cells that recognized dominant epitopes (14,24). Thus, except perhaps in some extreme situations, dominating T cells do not win the competition at the T cell/APC interface because they are more abundant than other T cell clonotypes in preimmune animals (23). Dominating T cells win the competition because they possess some elusive functional advantage over other T cells (14,19,23).

In order to decipher the mechanisms and the ultimate role of immunodominance, we sought to compare the differentiation program of T cells specific for dominant and cryptic Ags (cryptic Ags elicit T cell responses when they are presented alone, but not when presented with other Ags on the same APC). By ultimate role, we mean, as proposed by Casanova and Abel, the biologically relevant and evolutionarily selected function of immunodominance in host defense (25). We therefore analyzed global patterns of gene expression in effector CD8 T cells specific for two model minor histocompatibility Ags (MiHAs)<sup>3</sup> presented by H2D<sup>b</sup>: HY and H7<sup>a</sup> (formerly called B6<sup>dom1</sup>) that are encoded by the *Uty* and *Simp/Stt3b* genes, respectively (26-28). We rationalized that selecting these Ags would maximize the sensitivity of our studies because H7<sup>a</sup> and HY lie at opposite ends of the immunodomination scale (that is, in their ability to exert and resist immunodomination). Thus, while cell surface expression of H7<sup>a</sup> prevents priming against many MiHAs present on C57BL/6 cells, H7<sup>a</sup>-specific CD8 T cells consistently resist

immunodomination by T cells specific for a myriad of other MiHAs (16,19,22). In contrast, HY MiHA elicits CD8 T cell responses only when presented alone. H7<sup>a</sup> totally abrogates responses to HY when both Ags are presented on the same APC (16,19). We found that the differentiation programs of anti-H7<sup>a</sup> and anti-HY T cells were similar, but did not progress simultaneously. In addition, expansion and development of effector function were well synchronized in anti-H7<sup>a</sup> T cells but were disconnected in anti-HY T cells.

## Materials and Methods

### *Mice*

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

### *Immunization and cell preparation*

Six- to ten-wk-old B10.H7<sup>b</sup> female mice were immunized by i.p. co-injection of  $2 \times 10^7$  B10 and  $2 \times 10^7$  B10.H7<sup>b</sup> male spleen cells. Single-cell suspensions were prepared from the spleen of immunized mice on the indicated days after Ag priming. Erythrocytes were lysed and CD8<sup>+</sup> cells were enriched by magnetic depletion of B220<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> cells with microbeads (Dyna, Oslo, Norway).

### *Microarray experiments*

**Cell sorting.** Enriched CD8 cells were stained with FITC-labeled anti-CD8a Ab (BD Pharmingen, San Diego), H7<sup>a</sup> (KAPDNRETL)/H2D<sup>b</sup>-PE tetramers (Tet) and HY (WMHHNMDLI)/H2D<sup>b</sup>-APC Tet (CANVAC, Montreal, QC, Canada). CD8<sup>+</sup> H7<sup>a</sup> Tet<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> HY Tet<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> H7<sup>a</sup> Tet<sup>-</sup> HY Tet<sup>-</sup> (CD8<sup>+</sup> Tet<sup>-</sup>) cells were sorted using a FACSVantage SE with Diva option (BD Biosciences, San José). Purity of sorted cell populations was always  $\geq$  98%. Tet<sup>+</sup> populations containing between 8–300 thousand cells and Tet<sup>-</sup> populations containing 2–3 million cells were obtained for each mouse and were processed separately.

**Oligonucleotide microarrays and data analysis.** Total RNA was isolated from sorted populations using TRIzol (Invitrogen/Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Due to the small numbers of cells involved, 100 ~ 1000 ng total RNA was linearly amplified using MessageAMP aRNA kits (Ambion, Austin, Texas) as per the manufacturer's instructions. Two Tet<sup>+</sup> samples (one HY<sup>+</sup> and one H7<sup>a+</sup>) provided insufficient amounts of cRNA and were not processed further. The remaining samples were prepared for oligonucleotide microarray analysis using Affymetrix two-cycle cDNA synthesis and IVT kits according to the manufacturer's protocols (Affymetrix, Santa Clara, CA). Labeling of the samples (n = 13), hybridization of cRNA (15 µg) to Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 oligonucleotide arrays and scanning on an Affymetrix GeneChip scanner 3000 were performed according to standard Affymetrix protocols (see [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)) at the Centre for Applied Genomics at the Hospital for Sick Children (Toronto, ON, Canada). The numbers of independent biological replicates were as follows: CD8<sup>+</sup> H7<sup>a</sup> Tet<sup>+</sup> (4 samples), CD8<sup>+</sup> HY Tet<sup>+</sup> (4 samples) and CD8<sup>+</sup> Tet<sup>-</sup> (5 samples). After quantile normalization, Affymetrix probeset summaries were obtained from raw intensities using the Robust MultiArray Analysis subroutine implemented in R and obtained from the Bioconductor program repository website (<http://bioconductor.org/>). A numerical filter was used to select genes with median expression levels above 50, allowing for poorly measured genes and genes not appreciably expressed in a sample to be excluded. Significant genes were then selected through pairwise comparisons of the cell types using Student's *t*-test. Transformed data were displayed using the Gene Linker Platinum software (Biosystemix Ltd, Sydenham, ON, Canada). Microarray data are MIAME-compliant and have been submitted to the Gene Expression Omnibus ([www.ncbi.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nih.gov/geo); accession no. GSE2924).

*Quantitative real-time PCR (qrt-PCR) analysis*

Qrt-PCR was performed on cDNA obtained from Tet<sup>+</sup> CD8 T cells using an ABI Prism Sequence Detection System 7000 (Applied Biosystems; Foster City, CA) as previously described (29). Triplicate wells were averaged and the target gene values were normalized for *Hprt* content. We used specific primers and probes (TaqMan gene expression assays) from Applied Biosystems.

*Flow cytometry analysis*

Enriched CD8<sup>+</sup> cells were labeled with anti-CD8-APC or -PE, anti-CD62L-FITC, anti-IL-7R (CD127)-PE, anti-CD43-FITC (1B11), anti-KLRG1-FITC, and H7<sup>a</sup>/H2D<sup>b</sup> or HY/H2D<sup>b</sup> Tet (PE- or APC-conjugated). Stained cells were analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur and the CellQuest program (BD Biosciences). We obtained all Ab from BD Biosciences, except for anti-IL-7R that we purchased from eBioscience (San Diego, CA).

## Results

### *Immunization and design of microarray experiments*

Our first specific objective was to compare the transcriptome of anti-H7<sup>a</sup> and anti-HY CD8 effector T cells using the integrative potential of genome-scale microarrays (30). Since we were searching for intrinsic differences between these two T cell populations, we made every effort to eliminate extraneous confounding variables. Thus, we studied CD8 T cell populations that *a priori* differed only by their antigen specificity (H7<sup>a</sup> or HY). Our experimental protocol led to expansion of anti-HY and anti-H7<sup>a</sup> CD8 T cells that were primed concomitantly in the same host and received similar CD4 help (Fig. 1). Thus, B10.H7<sup>b</sup> female mice were primed by i.p. injection of a cell mixture containing B10 and B10.H7<sup>b</sup> male splenocytes. Because of the immunodomination phenomenon, H7<sup>a</sup> abrogates recognition of HY presented on the same APC (B10 male splenocytes), but not of HY presented on separate APCs (B10.H7<sup>b</sup> male splenocytes) (3). Thus, with this immunization scheme, each population of APC triggered CD8 T cells specific for a single MHC I-associated epitope. Recognition of B10.H7<sup>b</sup> male splenocytes led to expansion of CD8 T cells specific for the H2D<sup>b</sup>-restricted HY Ag, whereas B10 male APC entailed selective expansion of CD8 T cells specific for the H2D<sup>b</sup>-restricted H7<sup>a</sup> Ag (16,19,22,26,27). Of note, both populations of Ag-specific CD8 T cells received CD4 help solely from CD4 T cells specific for the MHC II-restricted HY Ag (31). Mice were sacrificed on day 14 after priming, and splenocytes from each mouse were processed separately (biological replicates). After depletion of B220<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> cells, splenocytes were stained with anti-CD8 Ab

as well as  $H7^a$ Tet and HYTet (labeled with different fluorochromes). Then, three populations of  $CD8^+$  splenocytes were purified using FACS cell sorting:  $HYTet^+$ ,  $H7^a Tet^+$ , and  $Tet^-$ . RNA of sorted T cells was extracted and linearly amplified, cRNA was prepared, and Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 oligonucleotide arrays were used to analyze gene expression.

*Differential gene expression in  $H7^a Tet^+$  vs.  $Tet^-$  CD8 T cells*

CD8 T cell activation initiates a complex differentiation program that culminates with cell proliferation, cytokine secretion, acquisition of cytotoxic activity and eventually apoptosis (32,33). Microarray experiments on mouse CD8 T cells have shown that this differentiation program can modify transcription of hundreds of genes (34-36). We first assessed the gene expression profile of effector CD8 T cells primed against the immunodominant  $H7^a$  MiHA. Differentially expressed genes were defined according to two criteria: a  $\geq 2.5$ -fold difference in transcript levels between  $H7^a Tet^+$  and  $Tet^-$  cells, and a p-value  $\leq 0.02$  (Student's *t*-test). Based on these criteria, 222 genes were induced and 86 were repressed in anti- $H7^a$  T cells relative to  $Tet^-$  CD8 control cells (Fig. 2A,B). Differentially expressed genes are involved in multiple cellular processes such as transcription, signal transduction, protein synthesis, cell proliferation and transport (Fig. 2C); the complete 308-gene data set is shown in supplementary Table I (available online). A partial list of the differentially expressed genes is provided in Table I to illustrate that the gene expression profile of anti- $H7^a$  CD8 effector T cells was similar to that of effector CD8 T cells specific for viral or OVA epitopes (34-36).

*Differential gene expression in anti- $H7^a$  vs. anti-HY CD8 effector T cells*

We next asked whether the 308 transcripts that characterize T cells primed against  $H7^a$  were



differentially expressed among  $H7^a$ - and HY-specific T cells. Cluster analysis revealed that the gene expression profile of  $HYTet^+$  T cells was remarkably similar to that of  $H7^a Tet^+$  T cells (Fig. 2A,B). Strikingly, taking a >1.5-fold difference and a p-value < 0.05 as selection criteria, we found that only 15 of 308 genes were differentially expressed in  $H7^a$ - vs. HY-specific T cells (Table II). This means that CD8 T cells specific for a dominant and a cryptic MiHA had very similar gene expression profiles. Seven genes were expressed at higher levels in  $H7^a$ -specific than HY-specific T cells. *Ii7r* codes for IL-7R (CD127) whose expression provides survival signals that allow Ag-primed T cells to become memory cells (37,38). Granzyme A (*Gzma*), a serine protease in the cytotoxic granules of cytotoxic T lymphocytes, induces caspase-independent cell death when introduced with perforin into target cells (39,40). Vamp5 is a member of the SNARE family of proteins that is responsible for the last stage of docking and subsequent fusion in diverse intracellular or intercellular processes (41); the vesicle fusion mediated by SNARE complexes is involved in TCR targeting to the immunological synapse (42). *S100a4* regulates cell cycle progression and differentiation, whereas *Csflr* (Gene Expression Omnibus DataSets 433 and 755), *Ftl1* (43) and *Edg8* (44) are upregulated on activated relative to naive T cells, but definition of their precise roles awaits further studies.

Eight genes were overexpressed in HY-specific relative to  $H7^a$ -specific T cells. *Sell* codes for CD62L whose downregulation decreases T cell reentry in the lymph nodes thereby favoring migration of effector T cells to nonlymphoid tissues (45). Upregulation of *Klrg1* is associated with replicative senescence and may functionally participate in down-regulation of CD8 T cell responses (37,46-49). In CD4 T cells, *Fus* upregulation is associated with Th2 as opposed to Th1 polarization (50). Upregulation of *Eomes* may promote terminal differentiation and impair the

survival potential of CD8 T cells (51). *Mfhas*, *Pcbp2*, *Rps8* and *Ung* are housekeeping genes whose precise roles in T lymphocytes have yet to be evaluated.

#### *Quantitative real-time PCR and flow cytometry analyses*

To validate the Affymetrix array profiles and to provide further quantitative data, we assessed by qrt-PCR or flow cytometry the expression of four genes that were differentially expressed in HY- vs. H7<sup>a</sup>-specific CD8 T cells and were deemed to be of particular relevance: *Il7r*, *Klrg1*, *Sell* and *Gzma*. Qrt-PCR confirmed the relative changes in expression of *Il7r*, *Klrg1* and *Gzma* while Ab staining confirmed the differential expression of CD62L (Fig. 3). Of note, different mice were used for the microarray experiments (n = 5) and the validation studies (n = 3), further underpinning the robustness of the differences that we found between H7<sup>a</sup>- and HY-specific CD8 T cells.

#### *Time-sequential evaluation of anti-H7<sup>a</sup> and anti-HY T cell differentiation*

Time is an essential dimension of complex systems (52). We therefore asked whether differences in gene expression profile of anti-H7<sup>a</sup> and anti-HY T cells were peculiar to day 14 or would be present during all phases of the immune response. To this end, we assessed from day 7 to 100 the expansion of anti-H7<sup>a</sup> and anti-HY T cells and their expression of selected genes. Based on our Qrt-PCR data (Fig. 3), we analyzed the expression of the following cell surface proteins: CD62L, IL-7R (CD127), KLRG1 and the activation-induced glycoform of CD43 (recognized by the 1B11 Ab). Since no Ab are available against mouse granzyme A, we used 1B11 staining as a surrogate marker for the granule exocytosis pathway (53,54).

At all time points, the frequencies of  $H7^a Tet^+$  T cells were greater than those of  $HY Tet^+$  T cells (Fig. 4A). Since the frequencies of anti- $H7^a$  and anti-HY T cell precursors in the preimmune repertoire are similar (23), anti- $H7^a$  T cells underwent more extensive expansion than anti-HY T cells. The salient finding though was the lack of synchronicity between expansion of the two T cell populations. Anti- $H7^a$  T cells reached maximal expansion (100%) on day 10 when anti-HY T cells had only reached 20% of their peak response (Fig. 4B). Expansion of anti-HY T cells reached its maximum between day 15 and 20, when anti- $H7^a$  T cells were into their contraction phase.

IL-7R is downregulated following Ag stimulation and is reexpressed on memory T cells (37). The proportion of  $IL-7R^+$  T cells decreased to attain a nadir of about 12% in both anti- $H7^a$  and anti-HY T cell populations, and thereafter increased in memory T cells (Fig. 5A). Notably, during the first 20-30 days after immunization, the profile of IL-7R expression correlated with the kinetics of expansion and contraction: IL-7R modulation lingered 5 days behind in anti-HY relative to anti- $H7^a$  T cells. The lowest proportions of  $IL-7R^+$  T cells (Fig. 5A) were observed at about the same time as the expansion peaks (Fig. 4). The picture was different with CD62L (Fig. 5B). The overall evolution of CD62L as a function of time was similar for the two T cell populations, but during the effector phase (day 7-30) the proportion of  $CD62L^+$  elements was consistently lower in anti- $H7^a$  than anti-HY T cells (Fig. 5B). In the memory T cell pool (day 100), the proportions of  $IL-7R^+$  and  $CD62L^+$  elements were similar for anti-HY and anti- $H7^a$  T cells (Fig. 5).

From day 10 to 20, the proportion of 1B11<sup>+</sup> cells as well as the mean fluorescence intensity (MFI) of 1B11<sup>+</sup> cells were slightly though significantly lower for HY-specific relative to H7<sup>a</sup>-specific T cells (Fig. 6A). Here, the notable point is that for both T cell populations, expression of 1B11 epitopes reached a peak between day 7 and 10 and decreased rapidly thereafter. On day 10, numbers of anti-H7<sup>a</sup> T cells were at their zenith whereas anti-HY T cells had reached only 20% of their maximal expansion (Fig. 4). Since expression of 1B11 epitopes (activation-induced CD43 glycoform) on CD8 T cells correlates with cytotoxic effector function (53,55), our data suggest that expansion and acquisition of effector function dovetailed well in H7<sup>a</sup>-specific but were ill-synchronized in HY-specific T cells.

KLRG1 is an inhibitory receptor. Its ligation by cadherins hampers CD8 T cell proliferation and cytotoxic activity (48,49). We found that accumulation of KLRG1<sup>+</sup> cells in the two T cell populations proceeded at similar pace for the first 10 days after immunization, but diverged by day 15 (Fig. 6B). From day 15 to 100, the proportion of KLRG1<sup>+</sup> cells was consistently higher for HY-specific relative to H7<sup>a</sup>-specific T cells.

#### *Anti-HY CD8 T cell response following priming against HY without H7<sup>a</sup>*

As mentioned in the Introduction, H7<sup>a</sup> totally abrogates responses to HY when both Ags are presented on the same APC but not when they are presented on separate APCs (16,19). We can infer from the H7<sup>a</sup>/HY model as well as other models (20,56) that presentation of the dominant and cryptic epitope on separate APCs mitigates immunodomination. This does not mean however that presentation of the two epitopes on separate APCs totally eliminates

immunodomination. We therefore asked whether H7<sup>a</sup>-specific T cells might interfere with the expansion and differentiation of HY-specific T cells even when they are primed by distinct APCs. To this end, we compared the expansion and differentiation of HY-specific CD8 T cells in two groups of mice: mice primed against H7<sup>a</sup> and HY (as depicted in Fig. 1) and a cohort of B10.H7<sup>b</sup> female mice primed only against HY (by injection of B10.H7<sup>b</sup> male cells). We evaluated in both groups the expansion of HY-specific T cells and their expression of four differentiation markers (IL-7R, CD62L, activation-induced CD43 glycoforms, and KLRG1) (Fig. 7). Two key points can be made from analyses of anti-HY CD8 T cells obtained after priming with HY alone vs. HY + H7<sup>a</sup>. First, the peak of expansion was reached on day 15 (Fig. 7A,B), five days later than for anti-H7<sup>a</sup> T cells (Fig. 4). Second, modulation of expression of the four differentiation markers as a function of time was identical in both groups (Fig. 7C-F). Thus, absence of competing T cells does not modify the cardinal features of anti-HY CD8 T cells, that is, their slow expansion rate and their differentiation program. Nevertheless, lack of competing H7<sup>a</sup> T cells slightly increased the expansion rate of HY-specific T cells and significantly augmented the magnitude of their expansion. This suggests that even when competing T cells are not in close proximity (their cognate Ag is not presented by the same APC), the H7<sup>a</sup>-specific CD8 T cells may hamper expansion of HY-specific CD8 T cells, presumably by competing for cytokines.

## Discussion

H7<sup>a</sup> and HY lie at opposite ends of the immunodominance scale in H2<sup>b</sup> mice. To evaluate and compare their differentiation program, we first analyzed the entire transcriptome of day 14 H7<sup>a</sup>- and HY-specific effector CD8 T cells, and then performed a time-sequential study of selected differentiation markers. Few microarray experiments have been performed on purified mouse T cell subsets (34-36), and to the best of our knowledge, none has compared the transcriptome of T cells with different Ag specificity. Ag encounter triggers an instructive developmental program that unfolds over weeks or months following initial Ag priming (33,57,58). Our initial finding was that on day 14, T cells specific for the dominant (H7) and the cryptic Ag (HY) had very similar gene expression profiles. Out of the 308 genes that were most differentially expressed by Tet CD8 T cells relative to naive CD8 T cells, 293 were expressed at similar levels in anti-H7 and anti-HY T cells (Fig. 2). Thus, about the time of maximal T cell expansion (day 14), Ag specificity has a relatively modest influence on the repertoire of genes that are<sup>a+a</sup> transcriptionally modulated by the CD8 T cell differentiation program. The gene expression profiles of anti-H7<sup>a</sup> and anti-HY T cells may display more dramatic differences during the earliest stages in the responses, perhaps principally vis-à-vis production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (59-61). However, it will be necessary to devise new methodological approaches to address this important issue. Indeed, the amount of RNA (100 ng) required to study the entire transcriptome and the very low numbers of HY-specific T cells detectable before day 10-14 (Fig. 4 and 7) precluded us from performing Affymetrix GeneChip experiments in the earliest stage of the response. Further studies are also mandatory to evaluate whether post-translational modifications such as phosphorylation and ubiquitination are differentially regulated in T cells

specific for dominant and cryptic Ag. Nevertheless, we found on day 14 some significant differences in the expression of a small subset of genes that can impinge on T cell fitness.

In complex systems, timing is everything. Perhaps the most salient finding of the present study is that although the differentiation programs of anti-H7<sup>a</sup> and anti-HY T cells were similar, they did not progress simultaneously. That expansion of anti-H7<sup>a</sup> and anti-HY T cells would have different magnitudes (Fig. 4A) is consistent with their position in the immunodominance hierarchy: H7<sup>a</sup> is dominant and HY cryptic. What was not expected however, is that their expansion and contraction would not be synchronized. The expansion peak of anti-H7<sup>a</sup> T cells was reached on day 10 while that of anti-HY T cells was attained on day 15 to 20 (Fig. 4B). Between day 10 and day 20, anti-H7<sup>a</sup> T cells were in the contraction phase and anti-HY T cells in the expansion phase. Both on anti-H7<sup>a</sup> and anti-HY T cells, the proportion of IL-7R<sup>+</sup> cells (Fig. 5A) was negatively correlated with T cell pool sizes (Fig. 4); IL-7R<sup>+</sup> expression reached its nadir at the time of maximal expansion and increased afterwards. At face value, our findings appear to be at odds with studies showing that CD8 T cells with different Ag specificities expand and contract synchronously in response to LCMV or *L. monocytogenes* infection (57,58,62). We propose that this discrepancy can be explained by the nature of the Ags. Studies on immune response to pathogens have focused on the strongest epitopes, those at the high end of the immunodominance scale. Immune response to cryptic epitopes (such as HY) cannot be studied in classical infection models because, under these conditions, multiple epitopes are presented on the same APC and the immune system therefore neglects cryptic determinants (2). In our model, the dominant and cryptic epitopes were presented by different APC. Accordingly, we have found no other in-depth analysis of the differentiation program of CD8 T cells specific

for cryptic determinants (determinants that are immunogenic only when presented alone). Further studies of T cell responses to cryptic determinants will be required to evaluate the generality of our observations on HY. However, one current difficulty with such studies is the lack of cryptic MHC I-restricted epitopes whose molecular structure is well defined (a prerequisite for generation of MHC-peptide Tet).

In contrast to expansion and IL-7R<sup>+</sup> expression, levels of CD62L and activation-induced CD43 glycoforms evolved concurrently in anti-H7<sup>a</sup> and anti-HY T cells (Fig. 5B, 6A). Nevertheless, during the effector phase of the immune response, downregulation of CD62L and upregulation of CD43 glycoforms were more pronounced on anti-H7<sup>a</sup> than anti-HY T cells. Considering the strong correlation between expression of activation-induced CD43 glycoforms and cytotoxic activity of CD8 T cells (53,54), our data suggest that the differentiation program of anti-HY effector T cells is not well adjusted. In anti-H7<sup>a</sup> cells, upregulation of 1B11 epitopes was greatest around the time of maximal expansion (day 7-10) (Fig. 4, 6A). Upregulation of 1B11 epitopes on anti-HY T cells also reached a peak around day 7-10 when expansion of anti-HY T cells was minimal. However, when numbers of HY-specific T cells attained their zenith, levels of activation-induced CD43 glycoforms had declined considerably. In other words, expansion and development of effector function were well synchronized in anti-H7<sup>a</sup> T cells but were disconnected in anti-HY T cells. Anti-HY T cells had another handicap: from day 15 onward, the proportion of KLRG1<sup>+</sup> cells was greater among anti-HY relative to anti-H7<sup>a</sup> CD8 T cells. KLRG1 upregulation has a negative impact on CD8 T cell function because KLRG1 interactions with cadherins on normal tissues inhibit CD8 T cell proliferation and cytotoxic activity (46-49).



How KLRG1 expression is regulated is basically unknown. Nevertheless, evidence suggests that KLRG1 expression on CD8 T cells identifies cells that have undergone extensive cell division (46,47,63). How can we reconcile the latter concept with the fact that i) H7<sup>a</sup>- and HY-specific T cell precursors have similar frequencies in naïve mice [in *in vitro* limiting dilution assays using peptide coated APCs (23)] and that ii) HY-specific T cells accumulate to lower level than H7<sup>a</sup>-specific T cells following Ag priming (Fig. 4)? One plausible explanation is that although H7<sup>a</sup>- and HY-specific T cell precursors have similar frequencies in naïve mice, the proportion of T cell precursors that are effectively primed following *in vivo* immunization is different. Thus the absolute number of precursor T cells that are recruited and participate to the immune response could be orders of magnitude greater for H7<sup>a</sup>- relative to HY-specific T cells. Accordingly, because HY-specific T cells found after day 15 would derive from a very limited number of primed precursors, they would show evidence of replicative senescence even though they do not accumulate to high levels.

Collectively, our data demonstrate that the rapid expansion of H7<sup>a</sup>-specific T cells together with their well-synchronized modulation of *Gzma*, CD62L and activation-induced CD43 glycoforms makes them better effectors than HY-specific T cells. We reported that H7<sup>a</sup>- and HY-specific T cell precursors have similar frequencies in non immune mice, and that H7<sup>a</sup>-specific CD8 T cells harvested at the time of primary response show highly restricted T cell receptor (TCR) diversity (23). Thus, the immunodominant status of H7<sup>a</sup> is not a question of T cell precursor frequency or TCR diversity. Furthermore, H7<sup>a</sup>/D<sup>b</sup> and H-Y/D<sup>b</sup> complexes have similar half-lives (8 h) (22). However, two observations strongly argue that H7<sup>a</sup> must deliver stronger TCR signals than HY:

H7<sup>a</sup> is expressed at much higher levels than HY at the cell surface (16,22), and anti-H7<sup>a</sup> T cells exhibit a much more rapid TCR:epitope on-rate than anti-HY T cells (23). During the course of infection, a 24-48 h delay in generation of effector CD8 T cells can make the difference between life and death (64). From this perspective, the discrepancies between anti-H7<sup>a</sup> and anti-HY T cells are dramatic (Table 2, Fig. 4-6). Moreover, the concept that immunodomination leads to selective expansion of the fittest CD8 effector T cells suggests that, contrary to the dominant paradigm, immunodomination may be beneficial to the host. Indeed, during the course of immune responses, T cells compete for Ag and other APC resources as well as for pro-survival cytokines (65-67). We propose that inhibition of T cell response to cryptic Ags ensures that host resources for which T cells compete are devoted to T cells that have the best effector potential. This might favor rapid clearance of pathogens not only at the time of primary but also upon the subsequent encounters, because immunodomination has a major (though not exclusive) role in shaping the repertoire of the memory T cell compartment (24,68,69). One implication is that, in general, favoring expansion of the fittest effector T cells may have more importance than increasing the diversity of the T cell repertoire. Usually, immunodominant T cells recognize Ag-bearing APC with higher avidity than non dominant T cells (70,71). Since high avidity CD8 T cells are more effective at pathogen clearance than the low-avidity CD8 T cells (72), it might therefore make sense to “neglect” T cells with the lowest functional avidity, that is, those specific for cryptic epitopes. However, whether immunodomination of subdominant epitopes is advantageous to the host is not clear since, at least in some cases, T cell responses to subdominant epitopes may contribute to pathogen eradication (73,74).

Finally, that effector CD8 T cells are generated more rapidly after priming with H7<sup>a</sup> than

HY explains previous observations on *in vivo* clearance of APC: H7<sup>a</sup> - but not HY-specific CD8 T cells rapidly eliminate APC bearing their cognate Ag (75). Since cryptic epitopes are poor immunogens, it can be assumed that they require longer duration of Ag presentation than dominant epitopes (32,76). We therefore postulate that by curtailing the duration of Ag presentation [through APC deletion or exhaustion (75,77-81)], immunodominant CD8 effector T cells selectively impair priming against cryptic epitopes. This model may explain why HY is immunogenic when presented alone (unlimited duration of Ag presentation), but silent when presented with H7<sup>a</sup> on the same APC (short duration of Ag presentation).

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Peter Wilkinson for help with preprocessing of microarray data, Shani Mintzberg for technical assistance and J.A. Kashul for editorial assistance.

## Footnotes

<sup>1</sup> This work was supported by grant #014271 (CP) from the National Cancer Institute of Canada (NCIC). MCM was supported by a training grant from the NCIC. CP holds a Canada Research Chair in Immunobiology.

<sup>2</sup> Address correspondence and reprint requests to Claude Perreault, Institute of Research in Immunology and Cancer, University of Montreal, Casier postal 6128, succ. Centre-ville,

Montréal, QC, Canada H3C 3J7. E-mail address [REDACTED]

<sup>3</sup> Abbreviations used in this paper: MFI, mean fluorescence intensity; MiHA, minor histocompatibility Ag; qrt-PCR, quantitative real-time PCR; Tet, tetramer.

## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1.** Immunization and design of microarray experiments. Five B10.H7<sup>b</sup> female mice were primed by i.p. injection of a cell mixture containing  $2 \times 10^7$  B10 male splenocytes and  $2 \times 10^7$  B10.H7<sup>b</sup> male splenocytes. On day 14 after priming, splenocytes were labeled with anti-CD8 Ab, H7<sup>a</sup>-PE Tet and HY-APC Tet. Three populations of CD8<sup>+</sup> splenocytes were purified by FACS sorting: HYTet<sup>+</sup>, H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup>, and Tet<sup>-</sup> CD8 T cells. The percent purity post-sorting was always  $\geq 98\%$  as depicted on the post-sorting dot plots (data are representative of five separate experiments). RNA of sorted cells was extracted and amplified, cRNA was prepared and hybridized on mouse Affymetrix Genome 430 2.0 oligonucleotide arrays.

**FIGURE 2.** Normalized expression profile of selected genes in Ag-primed (H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup> and HYTet<sup>+</sup>) and unprimed (Tet<sup>-</sup>) CD8 T cells. We found that 308 genes were differentially expressed in H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup> vs. Tet<sup>-</sup> CD8 T cells ( $\geq 2.5$ -fold difference in transcript levels and a Student's *t*-test  $p$ -value  $\leq 0.02$ ). (A,B) Clusters of differentially expressed genes in H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup> ( $n = 4$ ), HYTet<sup>+</sup> ( $n = 4$ ) and Tet<sup>-</sup> ( $n = 5$ ) CD8 T cells. Genes up-regulated (A;  $n = 222$ ) and down-regulated (B;  $n = 86$ ) in Tet<sup>+</sup> relative to Tet<sup>-</sup> CD8 T cells are represented. Expression profiles show a clear dichotomy between Tet<sup>+</sup> and Tet<sup>-</sup> CD8 T cells and a high level of similarity between H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup> and HYTet<sup>+</sup> CD8 T cells. (C) Proportions of functional classes of differentially expressed genes. Gene annotations were derived from Source (<http://source.stanford.edu>). Genes whose function is not well documented ( $n = 102$ ) were not included in the pie chart.

**FIGURE 3.** Validation by qrt-PCR and cytometry analysis of genes differentially expressed by anti-HY and anti-H7<sup>a</sup> T cells. Fold changes of transcript levels in H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup> vs. HYTet<sup>+</sup> cells obtained in microarray experiments (A) and by qrt-PCR (B). (C) Percentage of H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup> and HYTet<sup>+</sup> cells that were CD62L<sup>+</sup> (CD62L is the product of the *Sell* gene). The histogram shows one representative experiment, and the boxed values represent the mean  $\pm$  SD for three mice. Note that data in B and C were obtained from different mice (n = 3) from those in A (n = 5).

**FIGURE 4.** Asynchronous expansion of H7<sup>a</sup>- and HY-specific CD8 T cells. Mice were immunized as depicted in Fig. 1. At various times after immunization, splenocytes were harvested and stained with anti-CD8 Ab, H7<sup>a</sup>Tet and HYTet. (A) Proportion of Tet<sup>+</sup> T cells among CD8 T cells. (B) Tet<sup>+</sup> T cells were normalized to the peak of the response (day 10 for H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup> T cells and day 20 for HYTet<sup>+</sup> T cells). Numbers in parentheses on the X axis represent the number of mice studied at each time point. Error bars represent the standard error of the mean. \* p < .05, \*\* p < .001 (Student's *t* test).

**FIGURE 5.** Proportion of IL-7R<sup>+</sup> and CD62L<sup>+</sup> T cells among H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup> and HYTet<sup>+</sup> T cells. Mice were immunized as depicted in Fig. 1. At various times after immunization, splenocytes were harvested and stained with anti-CD8 Ab, H7<sup>a</sup>Tet, HYTet and Ab against IL-7R (A) or CD62L (B). Tet<sup>+</sup> CD8 T cells were undetectable on day 0. The open circles on day 0 indicates that in general naive CD8 T cells are IL-7R<sup>+</sup> and CD62L<sup>+</sup>. Error bars represent the standard error of the mean. \* .001 < p < .05 (Student's *t* test).

**FIGURE 6.** Proportion of 1B11<sup>+</sup> and KLRG1<sup>+</sup> T cells among H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup> and HYTet<sup>+</sup> T cells. Mice were immunized as depicted in Fig. 1. At various times after immunization, splenocytes were harvested and stained with anti-CD8 Ab, H7<sup>a</sup>Tet and HYTet as well as Ab against (A) activation-induced CD43 glycoform (1B11) or (B) KLRG1. Histograms in (A) show the mean 1B11 MFI of H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup> and HYTet<sup>+</sup> T cells. Tet<sup>+</sup> CD8 T cells were undetectable on day 0. The open circles on day 0 indicate that in general naive CD8 T cells are 1B11<sup>-</sup> and KLRG1<sup>-</sup>. Error bars represent the standard error of the mean. \* .001 < p < .05 (Student's *t* test).

**FIGURE 7.** Anti-HY CD8 T cell responses following priming against HY and H7<sup>a</sup> or only against HY. Data for HY-specific T cells obtained after priming against HY and H7<sup>a</sup> (as depicted in Fig. 1) are reproduced from Figures 4-6. To study anti-HY responses in the absence of anti-H7<sup>a</sup> priming, a new cohort of B10.H7<sup>b</sup> female mice was primed by i.p. injection  $2 \times 10^7$  B10.H7<sup>b</sup> male splenocytes. (A) Proportion of HYTet<sup>+</sup> T cells among CD8 T cells. (B) HYTet<sup>+</sup> T cells were normalized to the peak of the response. (C-F) Proportion of IL-7R<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, 1B11<sup>+</sup> and KLRG1<sup>+</sup> T cells among HYTet<sup>+</sup> T cells. Error bars represent the standard error of the mean. \* p < .05, \*\* p < .001 (Student's *t* test).

## REFERENCES

1. Berger, M., P. J. Wettstein, and R. Korngold. 1994. T cell subsets involved in lethal graft-versus-host disease directed to immunodominant minor histocompatibility antigens. *Transplantation* 57: 1095-1102.
2. Yewdell, J. W., and J. R. Bennink. 1999. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 51-88.
3. Perreault, C., D. C. Roy, and C. Fortin. 1998. Immunodominant minor histocompatibility antigens: the major ones. *Immunol. Today* 19: 69-74.
4. Choi, E. Y., G. J. Christianson, Y. Yoshimura, N. Jung, T. J. Sproule, S. Malarkannan, S. Joyce, and D. C. Roopenian. 2002. Real-time T-cell profiling identifies H60 as a major minor histocompatibility antigen in murine graft-versus-host disease. *Blood* 100: 4259-4264.
5. Kjer-Nielsen, L., C. S. Clements, A. W. Purcell, A. G. Brooks, J. C. Whisstock, S. R. Burrows, J. McCluskey, and J. Rossjohn. 2003. A structural basis for the selection of dominant  $\alpha\beta$  T cell receptors in antiviral immunity. *Immunity* 18: 53-64.
6. Schirmbeck, R., D. Stober, S. El Kholy, P. Riedl, and J. Reimann. 2002. The immunodominant,  $L^d$ -restricted T cell response to hepatitis B surface antigen (HBsAg) efficiently suppresses T cell priming to multiple  $D^d$ -,  $K^d$ -, and  $K^b$ -restricted HBsAg epitopes. *J. Immunol.* 168: 6253-6262.
7. Yewdell, J. W., and M. Del Val. 2004. Immunodominance in  $TCD8^+$  responses to viruses; cell biology, cellular immunology, and mathematical models. *Immunity* 21: 149-153.
8. Korngold, R., C. Leighton, L. E. Mobraaten, and M. A. Berger. 1997. Inter-strain graft-vs.-host disease T-cell responses to immunodominant minor histocompatibility antigens. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 3: 57-64.
9. Nikolich-Zugich, J., M. K. Slifka, and I. Messaoudi. 2004. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 123-132.
10. Barouch, D. H., J. Kunstman, M. J. Kuroda, J. E. Schmitz, S. Santra, F. W. Peyerl, G. R. Krivulka, K. Beaudry, M. A. Lifton, D. A. Gorgone, D. C. Montefiori, M. G. Lewis, S. M. Wolinsky, and N. L. Letvin. 2002. Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey



- by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 415: 335-339.
11. Erickson, A. L., Y. Kimura, S. Igarashi, J. Eichelberger, M. Houghton, J. Sidney, D. McKinney, A. Sette, A. L. Hughes, and C. M. Walker. 2001. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 15: 883-895.
  12. Berkhoff, E. G., A. C. Boon, N. J. Nieuwkoop, R. A. Fouchier, K. Sintnicolaas, A. D. Osterhaus, and G. F. Rimmelzwaan. 2004. A mutation in the HLA-B\*2705-restricted NP383-391 epitope affects the human influenza A virus-specific cytotoxic T-lymphocyte response in vitro. *J. Virol.* 78: 5216-5222.
  13. Deng, Y., J. W. Yewdell, L. C. Eisenlohr, and J. R. Bennink. 1997. MHC affinity, peptide liberation, T cell repertoire, and immunodominance all contribute to the paucity of MHC class I-restricted peptides recognized by antiviral CTL. *J. Immunol.* 158: 1507-1515.
  14. Chen, W., L. C. Anton, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell. 2000. Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity* 12: 83-93.
  15. Kedl, R. M., J. W. Kappler, and P. Marrack. 2003. Epitope dominance, competition and T cell affinity maturation. *Curr. Opin. Immunol.* 15: 120-127.
  16. Pion, S., P. Fontaine, M. Desaulniers, J. Jutras, J. G. Filep, and C. Perreault. 1997. On the mechanisms of immunodominance in cytotoxic T lymphocyte responses to minor histocompatibility antigens. *Eur. J. Immunol.* 27: 421-430.
  17. Kedl, R. M., W. A. Rees, D. A. Hildeman, B. Schaefer, T. Mitchell, J. Kappler, and P. Marrack. 2000. T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* 192: 1105-1114.
  18. Grufman, P., E. Z. Wolpert, J. K. Sandberg, and K. Kärre. 1999. T cell competition for the antigen-presenting cell as a model for immunodominance in the cytotoxic T lymphocyte response against minor histocompatibility antigens. *Eur. J. Immunol.* 29: 2197-2204.
  19. Roy-Proulx, G., M. C. Meunier, A. M. Lanteigne, S. Brochu, and C. Perreault. 2001. Immunodomination results from functional differences between competing CTL. *Eur. J. Immunol.* 31: 2284-2292.
  20. Rodriguez, F., S. Harkins, M. K. Slifka, and J. L. Whitton. 2002. Immunodominance in virus-induced CD8<sup>+</sup> T-cell responses is dramatically modified by DNA immunization

- and is regulated by gamma interferon. *J. Virol.* 76: 4251-4259.
21. Willis, R. A., J. W. Kappler, and P. C. Marrack. 2006. CD8 T cell competition for dendritic cells in vivo is an early event in activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103: 12063-12068.
  22. Pion, S., G. J. Christianson, P. Fontaine, D. C. Roopenian, and C. Perreault. 1999. Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocyte responses: explanation for the immunodominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens. *Blood* 93: 952-962.
  23. Roy-Proulx, G., C. Baron, and C. Perreault. 2005. CD8 T-cell ability to exert immunodomination correlates with T-cell receptor:epitope association rate. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 11: 260-271.
  24. Choi, E. Y., Y. Yoshimura, G. J. Christianson, T. J. Sproule, S. Malarkannan, N. Shastri, S. Joyce, and D. C. Roopenian. 2001. Quantitative analysis of the immune response to mouse non-MHC transplantation antigens in vivo: the H60 histocompatibility antigen dominates over all others. *J. Immunol.* 166: 4370-4379.
  25. Casanova, J. L., and L. Abel. 2004. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 55-66.
  26. Greenfield, A., D. Scott, D. Pennisi, I. Ehrmann, P. Ellis, L. Cooper, E. Simpson, and P. Koopman. 1996. An H-YD<sup>b</sup> epitope is encoded by a novel mouse Y chromosome gene. *Nat. Genet.* 14: 474-478.
  27. McBride, K., C. Baron, S. Picard, S. Martin, D. Boismenu, A. Bell, J. Bergeron, and C. Perreault. 2002. The model B6<sup>dom1</sup> minor histocompatibility antigen is encoded by a mouse homolog of the yeast *STT3* gene. *Immunogenetics* 54: 562-569.
  28. Kelleher, D. J., D. Karaoglu, E. C. Mandon, and R. Gilmore. 2003. Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties. *Mol. Cell* 12: 101-111.
  29. Terra, R., I. Louis, R. LeBlanc, S. Ouellet, J. C. Zúñiga-Pflücker, and C. Perreault. 2005. T cell generation by lymph node resident progenitor cells. *Blood* 106: 193-200.
  30. Benoist, C., R. N. Germain, and D. Mathis. 2006. A plaidoyer for 'systems immunology'. *Immunol. Rev.* 210: 229-234.

31. Scott, D., C. Addey, P. Ellis, E. James, M. J. Mitchell, N. Saut, S. Jurcevic, and E. Simpson. 2000. Dendritic cells permit identification of genes encoding MHC class II restricted epitopes of transplantation antigens. *Immunity* 12: 711-720.
32. Gett, A. V., F. Sallusto, A. Lanzavecchia, and J. Geginat. 2003. T cell fitness determined by signal strength. *Nat. Immunol.* 4: 355-360.
33. Kaech, S. M., and R. Ahmed. 2001. Memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat. Immunol* 2: 415-422.
34. Kaech, S. M., C. Hemby, E. Kersh, and R. Ahmed. 2002. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 111: 837-851.
35. Marshall, D. R., E. Olivas, S. Andreansky, N. L. La Gruta, G. A. Neale, A. Gutierrez, D. G. Wichlan, S. Wingo, C. Cheng, P. C. Doherty, and S. J. Turner. 2005. Effector CD8<sup>+</sup> T cells recovered from an influenza pneumonia differentiate to a state of focused gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102: 6074-6079.
36. Goldrath, A. W., C. J. Luckey, R. Park, C. Benoist, and D. Mathis. 2004. The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101: 16885-16890.
37. Kaech, S. M., J. T. Tan, E. J. Wherry, B. T. Konieczny, C. D. Surh, and R. Ahmed. 2003. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat. Immunol.* 4: 1191-1198.
38. Li, J., G. Huston, and S. L. Swain. 2003. IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J. Exp. Med.* 198: 1807-1815.
39. Barry, M., and R. C. Bleackley. 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 401-409.
40. Lieberman, J., and Z. Fan. 2003. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr. Opin. Immunol.* 15: 553-559.
41. Zeng, Q., T. T. Tran, H. X. Tan, and W. Hong. 2003. The cytoplasmic domain of Vamp4 and Vamp5 is responsible for their correct subcellular targeting: the N-terminal extension of VAMP4 contains a dominant autonomous targeting signal for the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.* 278: 23046-23054.
42. Das, V., B. Nal, A. Dujeancourt, M. I. Thoulouze, T. Galli, P. Roux, A. Dautry-Varsat, and

- A. Alcover. 2004. Activation-induced polarized recycling targets T cell antigen receptors to the immunological synapse; involvement of SNARE complexes. *Immunity*. 20: 577-588.
43. Mikulits, W., T. Sauer, A. A. Infante, J. A. Garcia-Sanz, and E. W. Mullner. 1997. Structure and function of the iron-responsive element from human ferritin L chain mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235: 212-216.
44. Jin, Y., E. Knudsen, L. Wang, Y. Bryceson, B. Damaj, S. Gessani, and A. A. Maghazachi. 2003. Sphingosine 1-phosphate is a novel inhibitor of T-cell proliferation. *Blood* 101: 4909-4915.
45. von Andrian, U. H., and C. R. Mackay. 2000. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med.* 343: 1020-1034.
46. Voehringer, D., C. Blaser, P. Brawand, D. H. Raulet, T. Hanke, and H. Pircher. 2001. Viral infections induce abundant numbers of senescent CD8 T cells. *J Immunol* 167: 4838-4843.
47. Beyersdorf, N. B., X. Ding, K. Karp, and T. Hanke. 2001. Expression of inhibitory "killer cell lectin-like receptor G1" identifies unique subpopulations of effector and memory CD8 T cells. *Eur. J. Immunol* 31: 3443-3452.
48. Grundemann, C., M. Bauer, O. Schweier, N. von Oppen, U. Lassing, P. Saudan, K. F. Becker, K. Karp, T. Hanke, M. F. Bachmann, and H. Pircher. 2006. Cutting edge: identification of E-cadherin as a ligand for the murine killer cell lectin-like receptor G1. *J. Immunol.* 176: 1311-1315.
49. Ito, M., T. Maruyama, N. Saito, S. Koganei, K. Yamamoto, and N. Matsumoto. 2006. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 203: 289-295.
50. Nagai, S., S. Hashimoto, T. Yamashita, N. Toyoda, T. Satoh, T. Suzuki, and K. Matsushima. 2001. Comprehensive gene expression profile of human activated T(h)1- and T(h)2-polarized cells. *Int. Immunol* 13: 367-376.
51. Bachmann, M. F., R. R. Beerli, P. Agnellini, P. Wolint, K. Schwarz, and A. Oxenius. 2006. Long-lived memory CD8<sup>+</sup> T cells are programmed by prolonged antigen exposure and low levels of cellular activation. *Eur. J. Immunol* 36: 842-854.
52. Ahn, A. C., M. Tewari, C. S. Poon, and R. S. Phillips. 2006. The limits of reductionism in

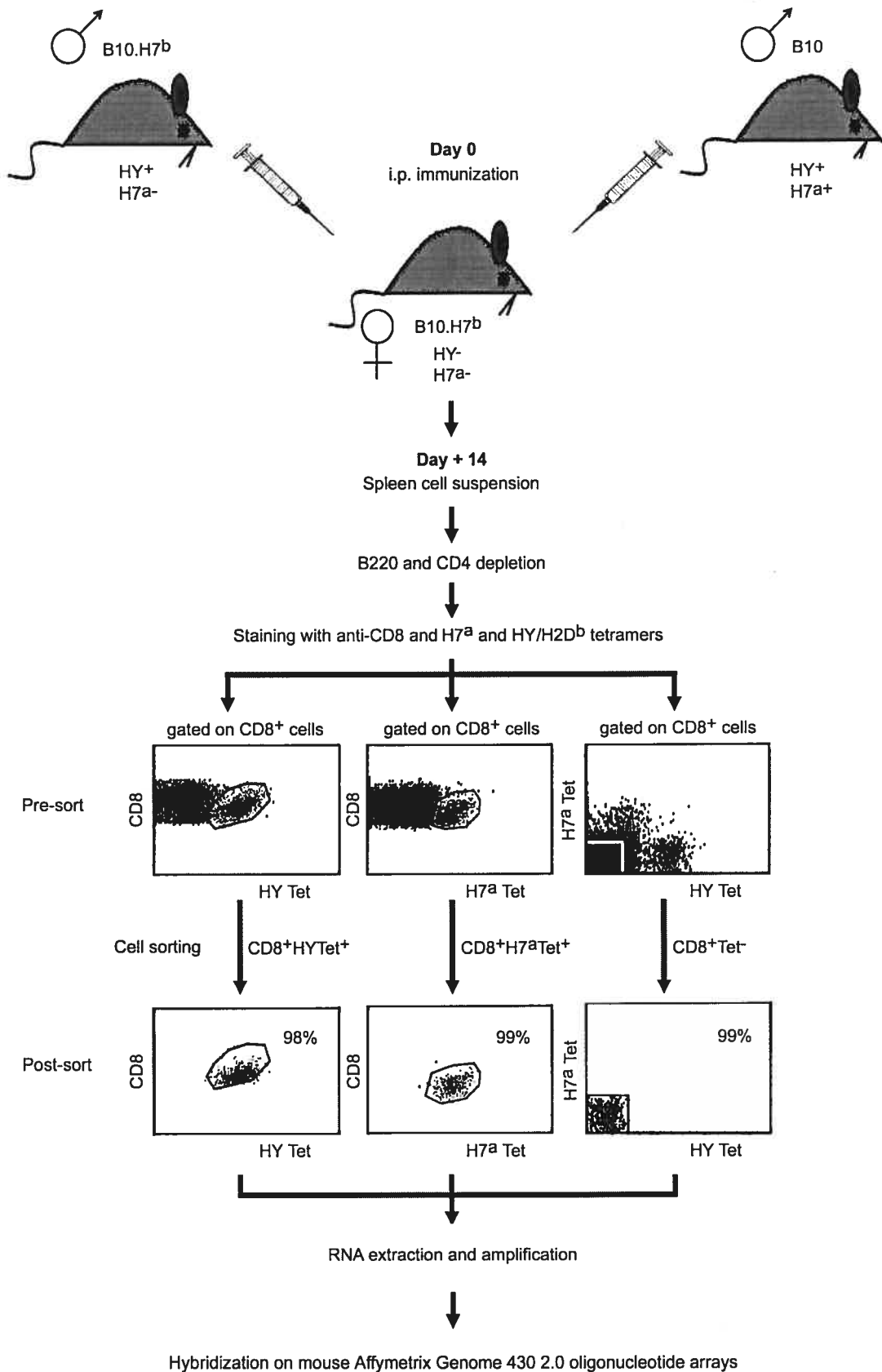
medicine: could systems biology offer an alternative? *PLoS. Med.* 3: e208.

53. Harrington, L. E., M. Galvan, L. G. Baum, J. D. Altman, and R. Ahmed. 2000. Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans. *J. Exp. Med.* 191: 1241-1246.
54. Onami, T. M., L. E. Harrington, M. A. Williams, M. Galvan, C. P. Larsen, T. C. Pearson, N. Manjunath, L. G. Baum, B. D. Pearce, and R. Ahmed. 2002. Dynamic regulation of T cell immunity by CD43. *J. Immunol* 168: 6022-6031.
55. Meunier, M. C., J. S. Delisle, J. Bergeron, V. Rineau, C. Baron, and C. Perreault. 2005. T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors. *Nat. Med.* 11: 1222-1229.
56. Wolpert, E. Z., P. Grufman, J. K. Sandberg, A. Tegnesjö, and K. Kärre. 1998. Immunodominance in the CTL response against minor histocompatibility antigens: interference between responding T cells, rather than with presentation of epitopes. *J. Immunol.* 161: 4499-4505.
57. Badovinac, V. P., B. B. Porter, and J. T. Harty. 2002. Programmed contraction of CD8<sup>+</sup> T cells after infection. *Nat. Immunol.* 3: 619-626.
58. Wong, P., and E. G. Pamer. 2003. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 29-70.
59. Liu, F., J. L. Whitton, and M. K. Slifka. 2004. The rapidity with which virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells initiate IFN- $\gamma$  synthesis increases markedly over the course of infection and correlates with immunodominance. *J. Immunol* 173: 456-41.
60. Badovinac, V. P., A. R. Tvinnereim, and J. T. Harty. 2000. Regulation of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell homeostasis by perforin and interferon- $\gamma$ . *Science* 290: 1354-1357.
61. Brehm, M. A., K. A. Daniels, and R. M. Welsh. 2005. Rapid production of TNF- $\alpha$  following TCR engagement of naive CD8 T cells. *J. Immunol.* 175: 5043-5049.
62. Homann, D., L. Teyton, and M. B. A. Oldstone. 2001. Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8<sup>+</sup> but declining CD4<sup>+</sup> T-cell memory. *Nat. Med.* 7: 913-919.
63. D'Souza, W. N., and S. M. Hedrick. 2006. Cutting Edge: Latecomer CD8 T cells are imprinted with a unique differentiation program. *J. Immunol.* 177: 777-781.

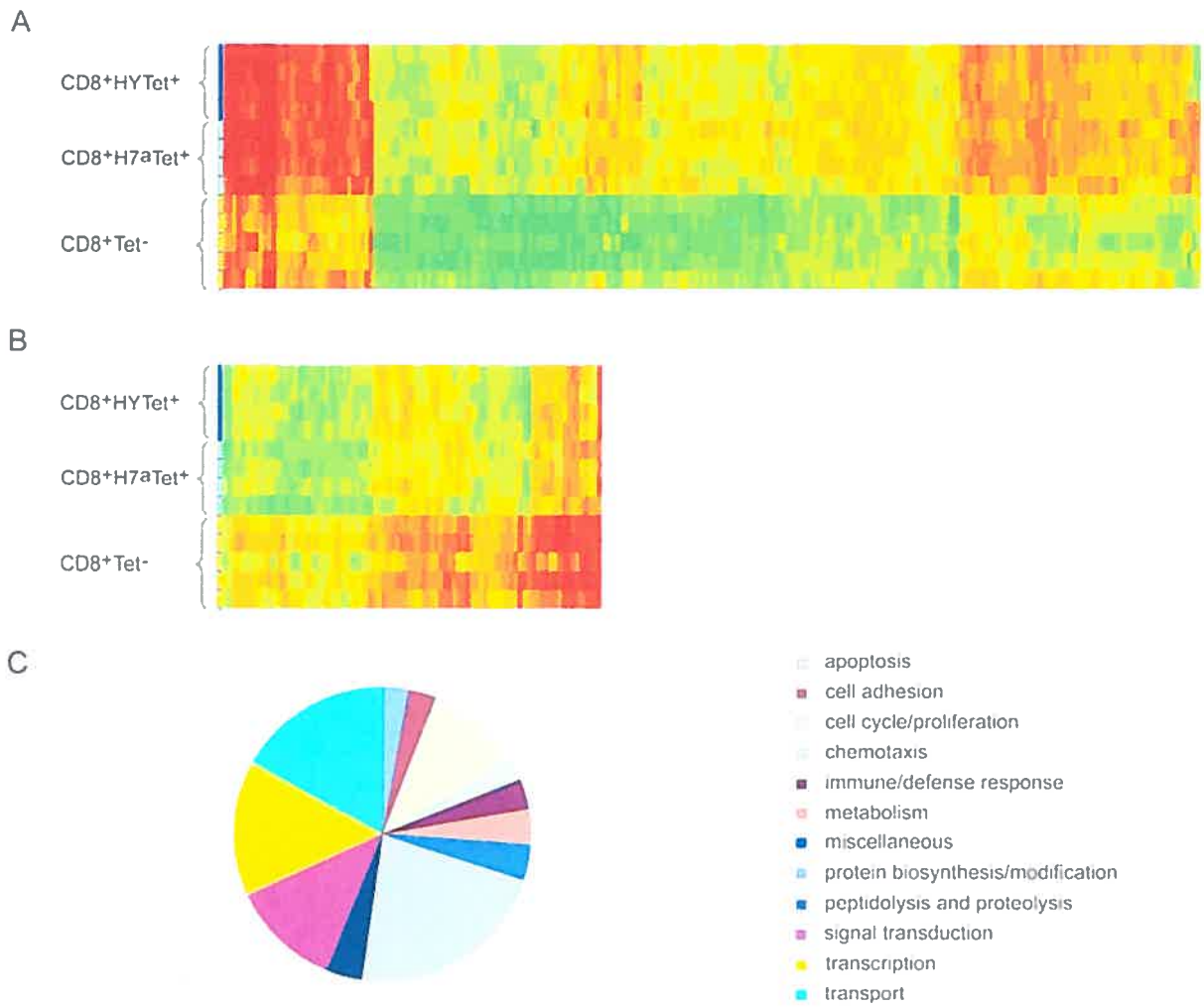
64. Ehl, S., P. Klenerman, P. Aichele, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1997. A functional and kinetic comparison of antiviral effector and memory cytotoxic T lymphocyte populations *in vivo* and *in vitro*. *Eur. J. Immunol.* 27: 3404-3413.
65. Blattman, J. N., J. M. Grayson, E. J. Wherry, S. M. Kaech, K. A. Smith, and R. Ahmed. 2003. Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses *in vivo*. *Nat. Med.* 9: 540-547.
66. Seder, R. A., and R. Ahmed. 2003. Similarities and differences in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effector and memory T cell generation. *Nat. Immunol.* 4: 835-842.
67. Melchionda, F., T. J. Fry, M. J. Milliron, M. A. McKirdy, Y. Tagaya, and C. L. Mackall. 2005. Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8<sup>+</sup> memory cell pool. *J. Clin. Invest* 115: 1177-1187.
68. Blattman, J. N., D. J. Sourdive, K. Murali-Krishna, R. Ahmed, and J. D. Altman. 2000. Evolution of the T cell repertoire during primary, memory, and recall responses to viral infection. *J Immunol* 165: 6081-6090.
69. Crowe, S. R., S. J. Turner, S. C. Miller, A. D. Roberts, R. A. Rappolo, P. C. Doherty, K. H. Ely, and D. L. Woodland. 2003. Differential antigen presentation regulates the changing patterns of CD8<sup>+</sup> T cell immunodominance in primary and secondary influenza virus infections. *J. Exp. Med.* 198: 399-410.
70. Price, D. A., J. M. Brenchley, L. E. Ruff, M. R. Betts, B. J. Hill, M. Roederer, R. A. Koup, S. A. Migueles, E. Gostick, L. Wooldridge, A. K. Sewell, M. Connors, and D. C. Douek. 2005. Avidity for antigen shapes clonal dominance in CD8<sup>+</sup> T cell populations specific for persistent DNA viruses. *J. Exp. Med.* 202: 1349-1361.
71. Bihl, F., N. Frahm, L. Di Giammarino, J. Sidney, M. John, K. Yusim, T. Woodberry, K. Sango, H. S. Hewitt, L. Henry, C. H. Linde, J. Chisholm, V, T. M. Zaman, E. Pae, S. Mallal, B. D. Walker, A. Sette, B. T. Korber, D. Heckerman, and C. Brander. 2006. Impact of HLA-B alleles, epitope binding affinity, functional avidity, and viral coinfection on the immunodominance of virus-specific CTL responses. *J. Immunol.* 176: 4094-4101.
72. Alexander-Miller, M. A., G. R. Leggatt, and J. A. Berzofsky. 1996. Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 4102-4107.

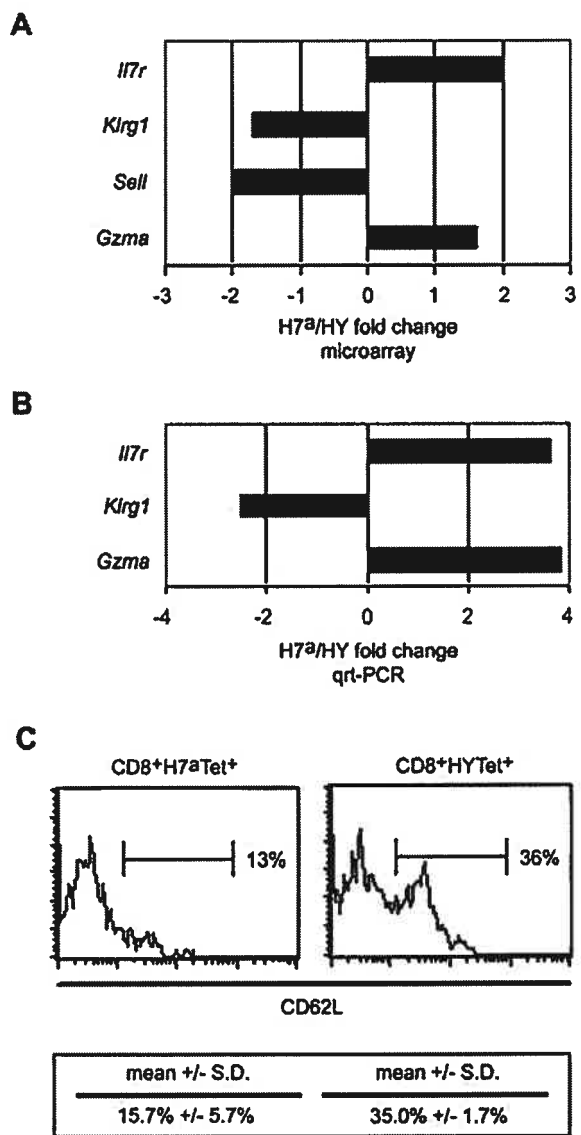
73. Kaul, R., T. Dong, F. A. Plummer, J. Kimani, T. Rostron, P. Kiama, E. Njagi, E. Irungu, B. Farah, J. Oyugi, R. Chakraborty, K. S. MacDonald, J. J. Bwayo, A. McMichael, and S. L. Rowland-Jones. 2001. CD8<sup>+</sup> lymphocytes respond to different HIV epitopes in seronegative and infected subjects. *J Clin. Invest* 107: 1303-1310.
74. Frahm, N., P. Kiepiela, S. Adams, C. H. Linde, H. S. Hewitt, K. Sango, M. E. Feeney, M. M. Addo, M. Lichterfeld, M. P. Lahaie, E. Pae, A. G. Wurcel, T. Roach, M. A. St John, M. Altfeld, F. M. Marincola, C. Moore, S. Mallal, M. Carrington, D. Heckerman, T. M. Allen, J. I. Mullins, B. T. Korber, P. J. Goulder, B. D. Walker, and C. Brander. 2006. Control of human immunodeficiency virus replication by cytotoxic T lymphocytes targeting subdominant epitopes. *Nat. Immunol.* 7: 173-178.
75. Loyer, V., P. Fontaine, S. Pion, F. Héту, D. C. Roy, and C. Perreault. 1999. The *in vivo* fate of APCs displaying minor H antigens and/or MHC differences is regulated by CTLs specific for immunodominant class I-associated epitopes. *J. Immunol.* 163: 6462-6467.
76. Prlic, M., G. Hernandez-Hoyos, and M. J. Bevan. 2006. Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8<sup>+</sup> T cell response. *J. Exp. Med.* *jem*.
77. Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* 1: 311-316.
78. Wong, P., and E. G. Pamer. 2003. Feedback regulation of pathogen-specific T cell priming. *Immunity* 18: 499-511.
79. Mueller, S. N., C. M. Jones, A. T. Stock, M. Suter, W. R. Heath, and F. R. Carbone. 2006. CD4<sup>+</sup> T cells can protect APC from CTL-mediated elimination. *J. Immunol.* 176: 7379-7384.
80. Yang, J., S. P. Huck, R. S. McHugh, I. F. Hermans, and F. Ronchese. 2006. Perforin-dependent elimination of dendritic cells regulates the expansion of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 147-152.
81. Hamilton, S. E., B. B. Porter, K. A. Nordyke Messingham, V. P. Badovinac, and J. T. Harty. 2004. MHC class Ia-restricted memory T cells inhibit expansion of a nonprotective MHC class Ib (H2-M3)-restricted memory response. *Nat. Immunol.* 5: 159-168.

Figure 2-1

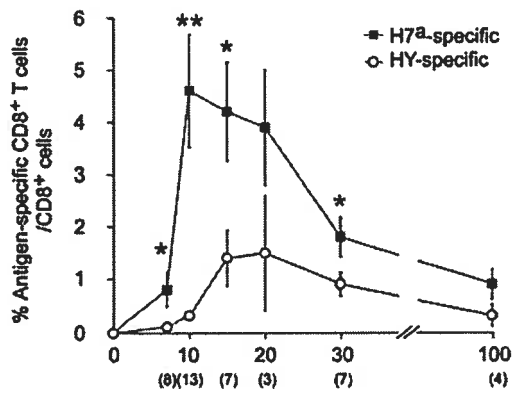








A



B

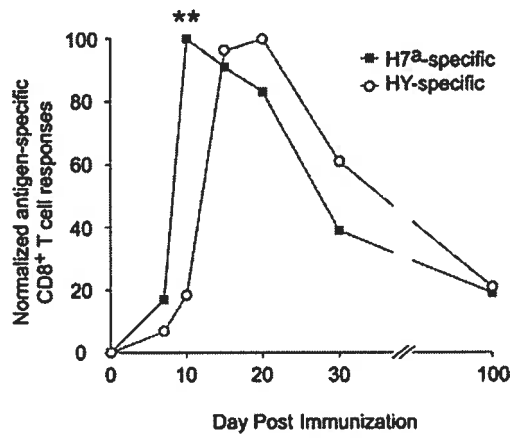


Figure 2-5

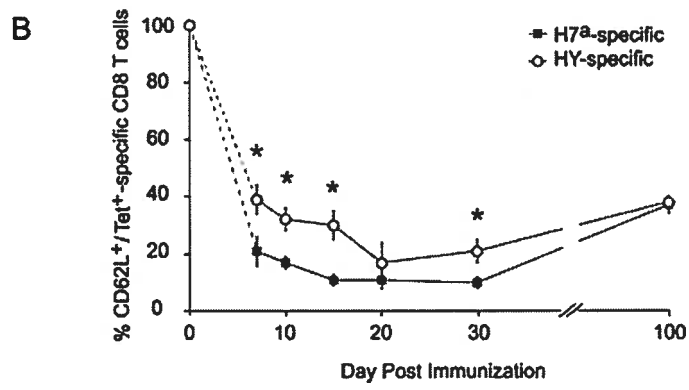
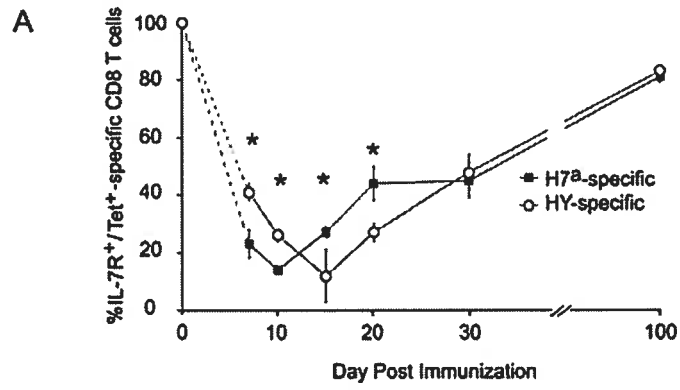
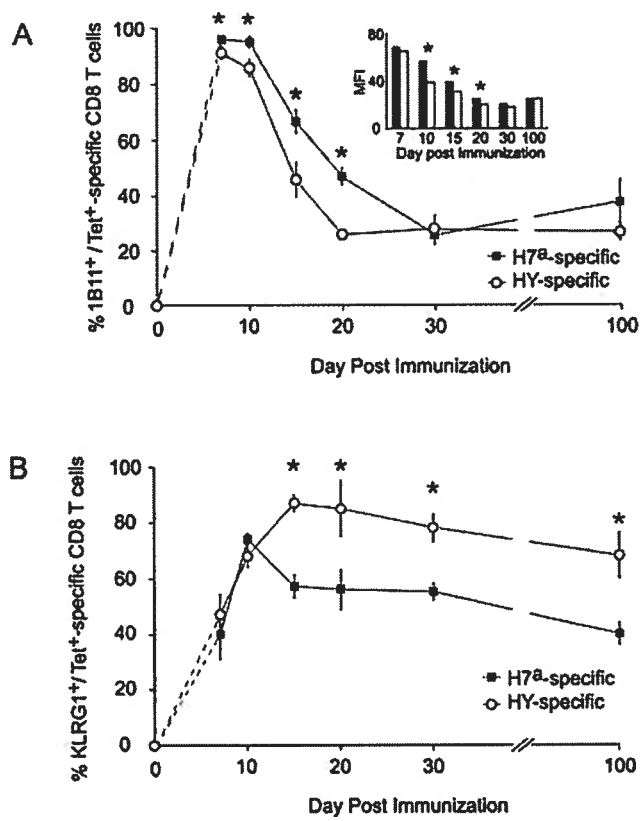
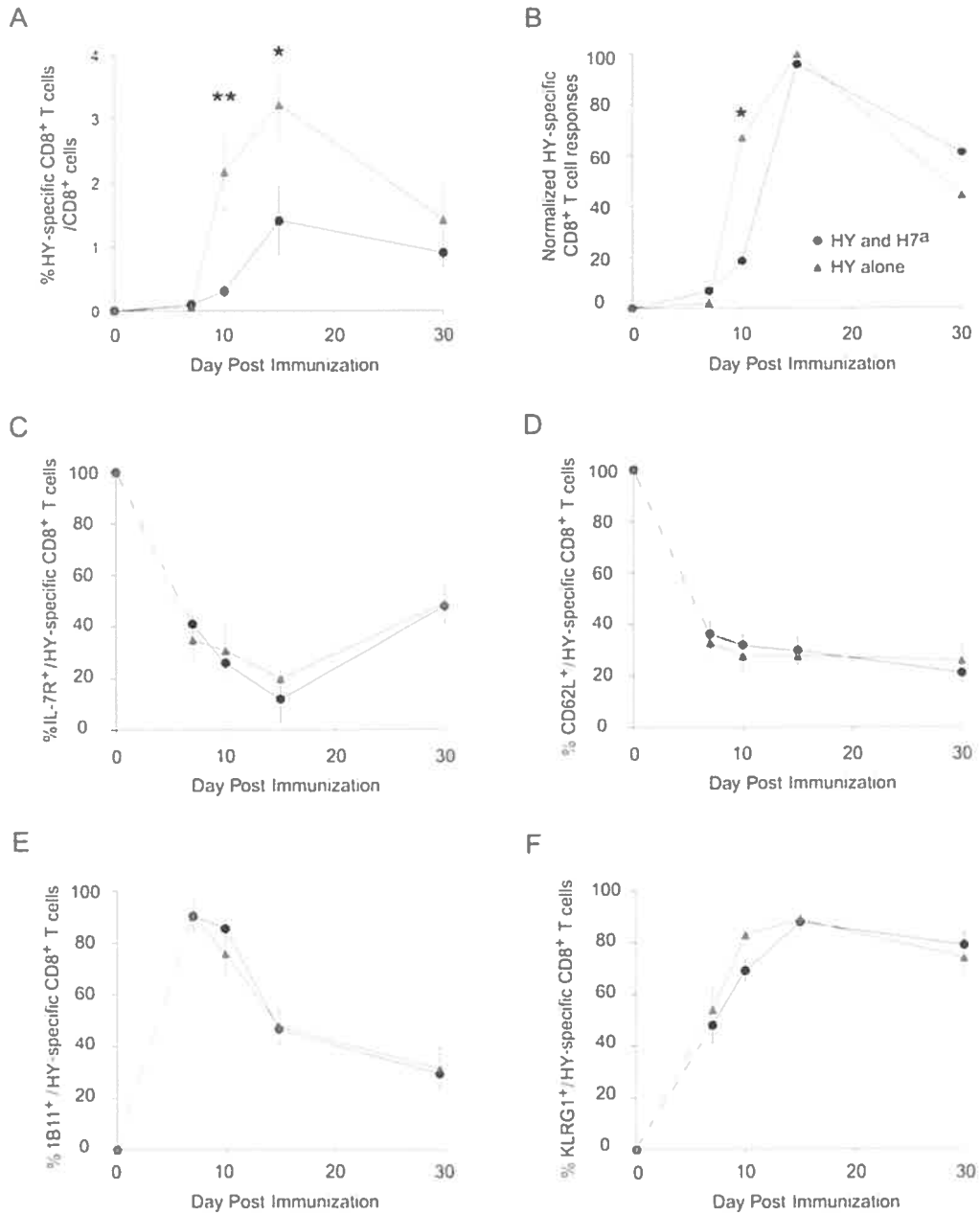


Figure 2-6





**Table 2- I. Partial list of genes differentially expressed in H7<sup>a</sup> Tet<sup>+</sup> vs Tet<sup>-</sup> CD8 T cells**

<b>GenBank acc. no.</b>	<b>Gene name</b>	<b>Gene symbol</b>	<b>Fold difference (H7<sup>a</sup> Tet<sup>+</sup> :Tet<sup>-</sup>)*</b>
<b>Effector function</b>			
NM_008196	granzyme K	<i>Gzmk</i>	13.2
NM_010177	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6	<i>Tnfsf6</i>	12.4
NM_010370	granzyme A	<i>Gzma</i>	11.5
NM_011313	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	<i>S100a6</i>	4.6
NM_013652	chemokine (C-C motif) ligand 4	<i>Ccl4</i>	3.9
NM_008337	interferon gamma	<i>Ifiγ</i>	3.2
<b>Signal transduction</b>			
NM_010945	neutral sphingomyelinaseactivation associated factor	<i>Nsmaf</i>	3.9
NM_007585	annexin A2	<i>Anxa2</i>	3.5
NM_008054	Fyn proto-oncogene	<i>Fyn</i>	3.1
NM_009112	S100 calcium binding protein A10 (calpactin)	<i>S100a10</i>	3.0
NM_025277	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10	<i>Gng10</i>	2.5
NM_008372	interleukin 7 receptor	<i>Il7r</i>	-2.6
<b>Cell proliferation</b>			

NM_011498	basic helix-loop-helix domain containing, class B2	<i>Bhlhb2</i>	5.8
NM_008495	lectin, galactose binding, soluble 1	<i>Lgals1</i>	4.0
NM_010129	epithelial membrane protein 3	<i>Emp3</i>	3.8
NM_011311	S100 calcium binding protein A4	<i>S100a4</i>	3.8

### Membrane proteins, adhesion and migration

NM_008737	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	<i>Nrp</i>	6.9
NM_009910	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	<i>Cxcr3</i>	4.0
NM_009915	chemokine (C-C) receptor 2	<i>Ccr2</i>	3.7
NM_008965	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	<i>Ptger4</i>	3.6
NM_016970	killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1	<i>Klrg1</i>	3.2
NM_010654	killer cell lectin-like receptor, subfamily D, member 1	<i>Klrtd1</i>	2.9
NM_011346	selectin, lymphocyte	<i>Sell</i>	-3.6

### Miscellaneous

NM_009983	cathepsin D	<i>Ctsd</i>	4.9
NM_011454	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 6b	<i>Serpinc6b</i>	4.3
XM_147798	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7	<i>Slc4a7</i>	4.2
NM_008219	hemoglobin, beta adult major chain	<i>Hbb-b1</i>	3.7
NM_016753	latexin	<i>Lxn</i>	3.1
NM_011660	thioredoxin 1	<i>Txn1</i>	2.6

\*Ratios preceded by a (-) sign refer to transcripts that were downregulated in H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup> T cells, while remaining ratios relate to genes that were upregulated in H7<sup>a</sup>Tet<sup>+</sup> T cells.



**Table 2-II. Genes differentially expressed in H7<sup>a</sup> Tet<sup>+</sup> relative to HYTet<sup>+</sup> CD8 T cells**

GenBank acc. no.	Gene name	Gene symbol	Fold difference (H7 <sup>a</sup> Tet <sup>+</sup> : HYTet <sup>+</sup> )*	p- value
NM007779	colony stimulating factor 1 receptor	<i>Csf1r</i>	4.3	0.009
NM_010240	ferritin light chain 1	<i>Ftl1</i>	2.8	0.036
NM_053190	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 8	<i>Edg8</i>	2.1	0.025
NM_008372	interleukin 7 receptor	<i>Il7r</i>	2.0	0.006
NM_011311	S100 calcium binding protein A4	<i>S100a4</i>	1.8	0.028
NM_016872	vesicle-associated membrane protein 5	<i>Vamp5</i>	1.8	0.014
NM_010370	granzyme A	<i>Gzma</i>	1.6	0.044
XM_356068	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1	<i>Mfhas1</i>	-1.6	0.033
NM_009098	ribosomal protein S8	<i>Rps8</i>	-1.6	0.028
NM_016970	killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1	<i>Klrg1</i>	-1.7	0.025
NM_010136	eomesodermin homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )	<i>Eomes</i>	-1.7	0.024
NM_011042	poly(rC) binding protein 2	<i>Pcbp2</i>	-1.7	0.006
NM_011677	Kruppel-like factor 2 (lung)	<i>Ung</i>	-1.7	0.019

NM_011346	selectin, lymphocyte	<i>Sell</i>	-2.0	0.021
NM_139149	fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma (human)	<i>Fus</i>	-2.1	0.030

---

Fifteen genes were differentially expressed in CD8<sup>+</sup> H7<sup>a</sup> Tet<sup>+</sup> compared with CD8<sup>+</sup> HY Tet<sup>+</sup> cells (p < 0.05, fold change > 1.5). \* Ratios preceded by a (-) sign indicate that transcripts were expressed at higher levels in HY-specific T cells; remaining ratios refer to genes expressed at higher levels in H7<sup>a</sup>-specific T cells.

### 3.3. ARTICLE # 3

## **Two host factors regulate persistence of H7<sup>a</sup>-specific T cells injected in tumor-bearing mice<sup>1</sup>**

Marie-Christine Meunier<sup>2,3</sup>, Chantal Baron<sup>2,3</sup> and Claude Perreault<sup>2,3,4,5</sup>

<sup>2</sup>Institute of Research in Immunology and Cancer and <sup>3</sup>Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada H3C 3J7

<sup>4</sup>Division of Hematology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, QC, Canada H1T 2M4

*Manuscrit prêt pour soumission*

## Abstract

Injection of CD8 T cells primed against the H7<sup>a</sup> minor histocompatibility antigen (MiHA) can cure leukemia- and melanoma-bearing mice. We addressed two specific questions to evaluate the *in vivo* behavior of H7<sup>a</sup>-targeted T cells in melanoma-bearing mice. First, what is the proliferative dynamics of H7<sup>a</sup>-specific T cells in adoptive hosts? We observed a selective infiltration of melanomas by anti-H7<sup>a</sup> T cells by day 3 after adoptive transfer. Over the next five days, anti-H7<sup>a</sup> T cells expanded massively in the tumor but not the spleen. By day 8 after adoptive transfer, anti-H7<sup>a</sup> T cells in the tumor had undergone more cell divisions than those in the spleen. These data strongly suggest that anti-H7<sup>a</sup> T cells proliferate preferentially and extensively in the tumors. Thus, although in general the tumor environment is not particularly propitious to T-cell invasion and expansion, the present work illustrates that this limitation may be overcome by adoptive transfer of primed CD8 T cells targeted to an immunodominant MiHA. Second, do functional H7<sup>a</sup>-specific T cells persist long-term following adoptive transfer? We report that two host factors regulate long-term persistence of anti-H7<sup>a</sup> memory T cells: thymic function and expression of H7<sup>a</sup> by host tissues. On day 100, anti-H7<sup>a</sup> memory T cells were found in euthymic H7<sup>a</sup>-negative mice and in thymectomized H7<sup>a</sup>-positive hosts, but not in euthymic H7<sup>a</sup>-positive recipients. Since prolonged persistence of adoptively transferred T cells is probably relevant in preventing late cancer relapses in adoptive hosts, it would therefore be advantageous to target MiHAs with a restricted tissue distribution.

## Introduction

Adoptive transfer of allogeneic T lymphocytes, used primarily for treatment of hematopoietic malignancies, has met with a remarkable success rate (1,2). Accordingly, the so-called graft-versus-leukemia (GVL) effect represents the most conclusive documentation that the immune system can cure cancer in humans (1,3). The GVL effect is due mainly, and perhaps exclusively, to recognition of minor histocompatibility antigens (MiHAs) (1,2,4). Recently, we have shown that injection of CD8 T cells primed against the model immunodominant H7<sup>a</sup> MiHA could eradicate not only leukemia but also melanoma in mouse (5,6). The chain of events leading to melanoma eradication by anti-H7<sup>a</sup> T cells involves the following steps (6). First, primed T cells accumulate at the tumor site. This initial step depends on interaction between V $\alpha$ -4 on T cells and Vcam-1 on tumor blood vessels. Second, local release of IFN- $\gamma$  by anti-H7<sup>a</sup> T cells has two crucial effects: inhibition of tumor angiogenesis and upregulation of MHC I expression on tumor cells. Finally, anti-H7<sup>a</sup> CD8 T cells undergo antigen-specific granule exocytosis in the tumor and thereby kill tumor cells. Of note, T cells specific for a single MiHA, such as H7<sup>a</sup>, never elicit graft-versus-host disease even when their target MiHA is ubiquitously expressed in recipient tissues and organs (5-7).

To understand why MiHA-targeted T cells are so effective we deem it essential to evaluate their *in vivo* behavior. In the present work, we therefore addressed two specific questions. First, what is the proliferative dynamics of H7<sup>a</sup>-specific T cells in the tumor? This is a critical issue since cancer refractoriness to immunotherapy is commonly due to failure of T cells to penetrate and accumulate in the tumors (8-11). Second, do H7<sup>a</sup>-specific T cells persist long-term, and is protracted T-cell reactivity to H7<sup>a</sup> necessary to prevent tumor recurrence? We report that the proliferation dynamics of anti-H7<sup>a</sup> CD8 T cells is dramatically different in the tumor compared with the spleen. We present evidence that the massive accumulation of anti-H7<sup>a</sup> in melanomas is largely due to extensive *in situ* proliferation. Moreover, we found that the long-term fate of H7<sup>a</sup>-specific T cells was dictated by two host factors: thymic function and expression of H7<sup>a</sup> by normal host cells. Notably, mice in which anti-H7<sup>a</sup> T cells did not persist long-term (day

100) nevertheless remained tumor-free. Thus, in this model, cure is probably due to eradication of clonogenic tumor cells rather than to induction of T-cell dependent tumor dormancy.

## Materials and Methods

**Mice, tumor cells and statistics.** We obtained B10.H7<sup>b</sup>(47N)/Sn (B10.H7<sup>b</sup>) and C57BL/10J (B10) mice from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and the B16.F10 melanoma cell line from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Mouse care and experimental procedures were performed under approval from the Animal Care Committees of the University of Montreal and of the Maisonneuve-Rosemont Hospital. Mice were treated according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Differences between group means were tested using Student's *t* test.

**Cell transplantation and thymectomy.** On day 0, H7<sup>a</sup>-positive (B10) and H7<sup>a</sup>-negative (B10.H7<sup>b</sup>) recipients received 12 Gy total-body irradiation,  $10^7$  T cell-depleted bone marrow cells i.v. and  $2 \times 10^5$  tumor cells s.c. in the right flank. On day 7, recipients were treated with  $5 \times 10^7$  splenocytes from B10.H7<sup>b</sup> donors primed against H7<sup>a</sup>. Priming of B10.H7<sup>b</sup> donors against H7<sup>a</sup> was performed by i.p. injection of  $2 \times 10^7$  B10 spleen cells 14 days prior to adoptive transfer. Splenocyte suspensions ( $5 \times 10^7$  cells) from donors primed against H7<sup>a</sup> contained  $2.5 \pm 0.3 \times 10^5$  H7<sup>a</sup> tetramer-positive CD8 T cells. Tumor size was measured every 48 h and we sacrificed mice when the largest tumor diameter reached 17 mm. On day 100, we re-challenged cured mice with  $2 \times 10^5$  B16.F10 melanoma cells s.c. Thymectomy were performed as previously described (12).

**Cell staining with antibodies and tetramers.** We purchased antibodies specific for the following molecules: CD8 (53-6.7), from BD Pharmingen (San Jose, CA) and CD44 (11-0441), from eBioscience (San Diego, CA). We obtained phycoerythrin-labeled H7<sup>a</sup>-H2D<sup>b</sup> tetramers from the tetramer core facility of the Canadian Network for Vaccines and Immunotherapeutics (Montreal, QC, Canada). We analyzed cell suspensions on a FACSCalibur using the CellQuest program (BD Biosciences, San Jose, CA).

**Assessment of T-cell proliferative dynamics from CFSE profiles.** We labeled splenocytes with CFSE (Molecular Probes, Burlington, ON, Canada) as previously described (13,14). Briefly, splenocytes were suspended at a concentration of  $5 \times 10^7$  cells

/ml in Hanks' balanced salt solution. After warming to 37°C, CFSE was added at a concentration of 5  $\mu$ M for 15 minutes, followed by addition of ice-cold RPMI media and cell recovery by centrifugation. Donor cells were subsequently injected i.v. into the tail vein of recipient mice. Before analysis, we stained cell suspensions containing CFSE-labeled cells with anti-CD8 antibody and H7<sup>a</sup>-H2D<sup>b</sup> tetramers. Division peaks (as determined by CFSE-intensity) were labeled from 0 to  $n$ . Since a single T cell dividing  $n$  times will generate  $2^n$  daughter cells, if the total number of T cells which have divided three times ( $n = 3$ ) is eight, then exactly one precursor had to divide three times to generate these eight cells ( $2^3 = 8$ ) (14,15). Making use of this mathematical relationship, the number of T cells that have divided was extrapolated from the number of daughters under each division peak, and the total number of mitotic events was calculated as described (13,16). The proliferative burst size (number of daughter cells generated by a dividing T-cell "precursor") was obtained by dividing the total number of mitoses by the number of precursors that had divided (16). The doubling time is equal to  $t \times \ln 2 / \ln$  burst size (16).



## Results

**Experimental model (Fig. 1).** On day 0, H7<sup>a</sup>-positive (B10) and H7<sup>a</sup>-negative (B10.H7<sup>b</sup>) mice received 12 Gy total-body irradiation, 10<sup>7</sup> T cell-depleted bone marrow cells i.v. and 2 x 10<sup>5</sup> B16.F10 melanoma cells (H7<sup>a</sup>-positive) s.c. On day 7, we treated mice by injection of 5 x 10<sup>7</sup> splenocytes from B10.H7<sup>b</sup> female immunized against H7<sup>a</sup> 14 days prior to adoptive transfer. Splenocyte suspensions (5 x 10<sup>7</sup> cells) from donors primed against H7<sup>a</sup> contained 2.5 ± 0.3 x 10<sup>5</sup> H7<sup>a</sup> tetramer-positive CD8 T cells. CD8 T cells supplied with CD4 help at the time of initial priming generate more efficient effector cells upon secondary challenge (17,18). Thus, as in previous studies (5,6), we used B10.H7<sup>b</sup> female mice primed against B10 male cells as a source of anti-H7<sup>a</sup> CD8 T cells. This immunization scheme leads to the expansion of anti-HY CD4 T cells and of anti-H7<sup>a</sup> CD8 T cells in donor mice (immunodomination prevents expansion of anti-HY CD8 T cells) (19,20). We used only female mice as recipients. Thus, following adoptive transfer only anti-H7<sup>a</sup> CD8 T cells could encounter their cognate Ag in recipients because both recipients and tumor cells are HY-negative. Our model displays two features that make it relevant as a pre-clinical paradigm: i) our protocol involves a therapeutic rather than prophylactic setting (21); ii) alike most spontaneous human tumors, B16.F10 cells do not express MHC II and display only low levels of MHC I molecules (22). We displayed in Fig. 1 the overall study design and the timing of short-term and long-term studies whose results are presented in Fig. 2-3 and Fig. 4-6, respectively.

**Proliferation kinetics of H7<sup>a</sup>-specific CD8 T cells.** The outcome of adoptive immunotherapy is presumably dictated by the proliferative dynamics of both tumor cells and tumor infiltrating T cells. In the first set of experiments, we therefore sought to determine the rate of accumulation and proliferation of H7<sup>a</sup>-specific T cells in the tumor at early time points after adoptive transfer. To this end, anti-H7<sup>a</sup> T cells donor cells were stained with CFSE before injection in recipients on day 7. We sacrificed mice on day 10, 13 and 15 (that is, day 3, 6 and 8 after adoptive transfer) and prepared cells suspensions from tumors and spleens to evaluate T-cell accumulation and mitotic behavior. Non-specific labeling with H7<sup>a</sup> tetramers, as determined by staining naïve B10 or B10.H7<sup>b</sup>

CD8 T cells, was  $\leq 0.04\%$  (data not shown). At each time point, the proportion of CD8 T cells that were H7<sup>a</sup> tetramer-positive was  $\approx 1\text{-}2\%$  in the spleen but  $\approx 80\text{-}90\%$  in the tumor (Fig. 2A). Thus, as early as day 10 (day 3 after adoptive transfer), we observed a selective accumulation of H7<sup>a</sup>-specific T cells in the tumors. Between day 10 and day 15, the absolute number of H7<sup>a</sup>-specific T cells remained relatively stable in the spleen but increased  $\approx 8.5\text{-fold}$  in the tumor (Fig. 2B and 3B).

The expansion in the number of intratumoral H7<sup>a</sup>-specific CD8<sup>+</sup> T cells could be due to their proliferation *in situ* or their recruitment from secondary lymphoid organs. To investigate this issue, we analyzed the CFSE content of H7<sup>a</sup> tetramer-positive T cells present in the spleen and the tumor. The CFSE content decreases by 50% after each cell division. The vast majority of H7<sup>a</sup>-specific T cells harvested on day 10 had undergone 0 or 1 mitosis following adoptive transfer (Fig. 3A). From day 10 to 15, the mean CFSE content of anti-H7<sup>a</sup> T cells decreased more rapidly in the tumor than in the spleen (Fig. 3A). By day 15, all anti-H7<sup>a</sup> T cells harvested from the tumor had divided at least once while a substantial number of anti-H7<sup>a</sup> T cells in the spleen had not (Fig. 3A). Using equations developed by Turka *et al.* (14,16) we calculated the proliferative burst size and the doubling time of H7<sup>a</sup> tetramer-positive T cells (Fig. 3). The proliferative burst size corresponds to the number of daughter cells generated by a dividing T-cell “precursor”, and the doubling time represents the time required for the average T cell to achieve a single cell division. Our calculations are based on the assumption that H7<sup>a</sup>-specific T cells present in one site (spleen or tumor) on day 15 derive from H7<sup>a</sup>-specific T cells that had seeded this particular site by day 10. On day 15, H7<sup>a</sup>-specific T cells in the tumor displayed a greater burst size ( $\approx 3.5\text{-fold}$ ) and shorter doubling time ( $\approx 3\text{-fold}$ ) than H7<sup>a</sup>-specific T cells in the spleen (Fig. 3B).

Our studies on the proliferation kinetics of H7<sup>a</sup>-specific CD8 T cells show that H7<sup>a</sup>-specific T cells found in the tumor and spleen have different mitotic histories: H7<sup>a</sup>-specific T cells in the tumor have undergone more cell divisions than those in the spleen (Fig. 3). These data strongly suggest that the massive expansion of H7<sup>a</sup>-specific T cells found in the tumor, but not the spleen, reflects their intratumoral proliferation.

**Two host factors regulate long-term persistence of H7<sup>a</sup>-specific memory T cells.** In order to determine whether H7<sup>a</sup>-specific T cells persisted long-term following adoptive transfer, we assessed the numbers of H7<sup>a</sup> tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells present on day 100 in the spleen and bone marrow of euthymic mice successfully treated for melanoma (as shown in Fig. 1). Since H7<sup>a</sup> expression by host cells might impinge on long-term persistence of H7<sup>a</sup>-specific T cells, we studied the fate of primed H7<sup>a</sup>-specific T cells transferred in H7<sup>a</sup>-positive (B10) and H7<sup>a</sup>-negative (B10.H7<sup>b</sup>) hosts. The salient finding was that significant numbers of H7<sup>a</sup>-specific T cells were found in B10.H7<sup>b</sup> but not in B10 hosts ( $P < 0.001$ ; Fig. 4). The sole difference between these two strains of mice is that H7<sup>a</sup> MiHA is ubiquitously expressed in B10 mice, but absent in B10.H7<sup>b</sup> mice (5,23). Thus, when confronted with ubiquitous expression of their cognate antigen, H7<sup>a</sup>-targeted T cells underwent apoptosis or replicative exhaustion. As expected for memory T cells, about 98% of anti-H7<sup>a</sup> T cells were CD44<sup>hi</sup>. Consistent with the fact that the bone marrow is a preferential homing site for memory T cells (24,25), the frequency of H7<sup>a</sup>-specific T cells was higher in the bone marrow than the spleen of B10.H7<sup>b</sup> mice ( $P < 0.01$ ).

Naïve and memory CD8 T cells may compete for cytokines that regulate lymphocyte survival and proliferation (26). We therefore asked whether in the absence of thymic output, anti-H7<sup>a</sup> memory T cells would persist long-term in B10 hosts. To test this, we evaluated the persistence of H7<sup>a</sup>-specific memory T cells in euthymic vs. thymectomized H7<sup>a</sup>-positive (B10) hosts. Significant numbers of H7<sup>a</sup>-specific memory T cells were present on day 100 in thymectomized B10 hosts ( $P < 0.01$  relative to euthymic B10 hosts; Fig. 4). Thus, anti-H7<sup>a</sup> T cells can persist long-term in B10 hosts in the absence of naïve T cell production by the thymus. We conclude that two host factors regulated persistence of anti-H7<sup>a</sup> memory T cells: thymic function and expression of H7<sup>a</sup> by normal host cells. H7<sup>a</sup>-specific memory T cells were abundant in euthymic B10.H7<sup>b</sup> hosts, present in low numbers in thymectomized B10 hosts, and undetectable in euthymic B10 hosts.

**Challenge of hematopoietic chimeras with tumor cells.** No melanoma recurrence was seen in B10 mice ( $n = 30$ ) observed for 6 months after induction of complete remission by adoptive transfer of anti-H7<sup>a</sup> T cells [(6) and data not shown]. To test whether lack of tumor relapse might be due to persistence of H7<sup>a</sup>-specific T cells at levels below the detection limit of tetramer-staining assays, cured B10 recipients were challenged on day 100, with  $2 \times 10^5$  melanoma cells (as on day 0). In euthymic cured B10 recipients, tumors grew rapidly (Fig. 5) and no accumulation of H7<sup>a</sup>-specific T cells was detected in the spleen, bone marrow or tumor (Fig. 6). Thus, cured euthymic B10 mice did not show any functional evidence of immune reactivity to H7<sup>a</sup> or to any tumor-associated epitopes. In thymectomized B10 hosts, a minimal accumulation of H7<sup>a</sup>-specific T cells was found (Fig. 6) that entailed only a small delay in tumor growth (Fig. 5). Hence, H7<sup>a</sup>-specific memory T cells present in thymectomized B10 hosts were unable to provide a protective antitumor response. In contrast, H7<sup>a</sup>-specific memory T cells present in B10.H7<sup>b</sup> hosts generated a strong anamnestic response following tumor rechallenge (Fig. 6). In the latter mice, the tumor grew for a few days and then disappeared (Fig. 5). Thus, H7<sup>a</sup>-specific memory T cells found in B10.H7<sup>b</sup> hosts perfectly functional.

## Discussion

**Intratumoral accumulation of H7<sup>a</sup>-specific T cells.** A major obstacle encountered in cancer immunotherapy trials, including those targeting MiHAs, is the failure of antigen-reactive T cells to invade tumors and persist long-term (11,27-29). Few studies have addressed the *in vivo* fate of MiHA-specific T cells using MHC-peptide tetramers (30,31). Moreover, to the best of our knowledge, no study has evaluated the *in vivo* fate of antigen-primed MiHA-specific T cells, nor their behavior in the tumor environment. We previously reported that adoptively transferred anti-H7<sup>a</sup> T cells were found in large numbers in regressing melanomas (day 19) (6). Here, by looking at earlier time points, we found that selective tumor infiltration by anti-H7<sup>a</sup> T cells is established by day 3 after adoptive transfer. Preferential localization of adoptively transferred CD8 T cells to tumor sites has been reported in one clinical trial (32). Homing to the tumor is probably due to interaction between activated T cells and antigen-independent inflammatory ligands such as Vcam-1 (6,33). We found that following initial seeding, numbers of H7<sup>a</sup>-specific T cells increased dramatically in the tumor but not the spleen. Furthermore, based on CFSE profiles, we found that H7<sup>a</sup>-specific T cells in the tumor had divided much more extensively than those in the spleen. These data strongly suggest that the massive accumulation of H7<sup>a</sup>-specific T cells in the tumor between day 10 and day 15 is due to *in situ* proliferation. They are also consistent with the fact that differentiation and survival of primed CD8 (but not CD4) effector T cells are independent of secondary lymphoid organs in adoptive hosts (34). Further studies are needed to understand the nature of signals that drive intratumoral expansion of MiHA-specific T cells. We speculate that IFN- $\gamma$  may be an important player in this process. Indeed, the local release of IFN- $\gamma$  by anti-H7<sup>a</sup> T cells upregulates expression of MHC I and H7<sup>a</sup> in the tumor (6), and may thereby stimulate proliferation of anti-H7<sup>a</sup> T cells. Nonetheless, though the tumor environment may not be particularly propitious to T-cell invasion and expansion (8-11), the present work illustrates that this limitation may be overcome by adoptive transfer of primed CD8 T cells targeted to an immunodominant MiHA. In line with this, new promising methods have been recently developed to generate high avidity MiHA-specific CD8 T cells for adoptive immunotherapy in human (35-37).

**Relapse-free survival did not necessitate persistence of H7<sup>a</sup>-reactive memory T cells.** Whether long-term cancer remission induced by MiHA-targeted T cells is associated with total eradication of cancer cells or with persistence of low numbers of resting or slow growing tumor cells (tumor dormancy) is unknown. The distinction between these two outcomes is important since tumor persistence always entails the risk of relapse. Genuine cancer cure requires elimination of cancer stem cells which have a mostly quiescent cell cycle profile and are capable of self-renewal. The quiescent status of cancer stem cells renders them difficult to eradicate with chemotherapy that typically target proliferating cells. Nonetheless, T cells can eliminate quiescent cells as well as cycling cells. Thus, when cultured with acute myeloid leukemia cells, MiHA-specific T cells can wipe out leukemia stem cells (38). Nevertheless, a substantial body of evidence suggests that remissions induced by various types of immunotherapy targeted to tumor specific antigens (but not to MiHAs) are usually associated with tumor dormancy (39) We found that recipients in which anti-H7<sup>a</sup> T cells disappeared (euthymic B10 mice) nevertheless remained tumor-free. The latter mice behave as naive mice when rechallenged with melanoma cells. Thus, in this model, cure is probably due to eradication of clonogenic tumor cells rather than to induction of T-cell dependent tumor dormancy. Notably, we have observed no late relapses in mice with EL4 leukemia treated with anti-H7<sup>a</sup> T cells [(5) and unpublished observations]. This suggests that the findings reported herein may not be unique to melanoma and may be relevant to some rapidly growing tumors like B16.F10 and EL4. By no means, however, do we infer that persistence of memory T cells is generally irrelevant in adoptive cancer immunotherapy. The occurrence of late leukemia relapses following allogeneic hematopoietic cell transplantation argues against this view. Nevertheless, the lack of cancer relapse in mice devoid of anti-H7<sup>a</sup> memory T cells illustrates the potency of the acute anti-tumor effect that can be generated by anti-MiHA T cells.

**Antigen distribution and thymus function regulate long-term persistence of H7<sup>a</sup>-specific memory T cells.** Functional anti-H7<sup>a</sup> T cells persisted long-term in B10.H7<sup>b</sup> but not B10 mice. The ubiquitous expression of H7<sup>a</sup> on B10 host cells led to physical

demise or functional impairment of anti-H7<sup>a</sup> T cells. The exhaustion of H7<sup>a</sup>-specific T cells in B10 recipients was similar to that of anti-viral T cells confronted with viruses that disseminate widely (40). Thus, at least in euthymic subjects, adoptively transferred host-reactive T cells should have a longer life span when targeted to tissue-restricted (e.g., tumor-specific) as opposed to ubiquitous epitopes. Assuming that prolonged persistence of adoptively transferred T cells is probably relevant in preventing late cancer relapses, it would therefore be advantageous to target MiHAs with a restricted tissue distribution. Fortunately, several non ubiquitous MiHAs have been discovered in humans (41-43). Accordingly, MiHAs derived from oncoproteins, such as HA-1, represent particularly attractive targets for adoptive immunotherapy of hematopoietic malignancies and solid tumors (44,45). Finally, we found that thymic output had a negative impact on persistence of H7<sup>a</sup>-specific memory T cells. Many cancer patients, particularly those in older age groups, present thymic insufficiency (46). MiHA-specific T cells may have a more protracted survival in these subjects. From a different perspective, the concept that thymic output mitigates the persistence of MiHA-reactive T cells could explain why graft-versus-host disease becomes more frequent with increasing recipient age following conventional allogeneic hematopoietic cell transplantation (47,48).

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Marie-Ève Blais for technical assistance.



## REFERENCES

- (1) Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer* 2004;4:371-80.
- (2) Perreault C, Brochu S. Adoptive cancer immunotherapy: discovering the best targets. *J Mol Med* 2002;80:212-8.
- (3) Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 2001;411:385-9.
- (4) Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, Felio K, Kantarjian HM, Champlin RE, et al. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med* 2000;6:1018-23.
- (5) Fontaine P, Roy-Proulx G, Knafo L, Baron C, Roy DC, Perreault C. Adoptive transfer of T lymphocytes targeted to a single immunodominant minor histocompatibility antigen eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat Med* 2001;7:789-94.
- (6) Meunier MC, Delisle JS, Bergeron J, Rineau V, Baron C, Perreault C. T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors. *Nat Med* 2005;11:1222-9.
- (7) Korngold R, Leighton C, Mobraaten LE, Berger MA. Inter-strain graft-vs.-host disease T-cell responses to immunodominant minor histocompatibility antigens. *Biol Blood Marrow Transplant* 1997;3:57-64.
- (8) Ochsenbein AF, Sierro S, Odermatt B, Pericin M, Karrer U, Hermans I, et al. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 2001;411:1058-64.
- (9) Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005;5:263-74.
- (10) Yu P, Rowley DA, Fu YX, Schreiber H. The role of stroma in immune recognition and destruction of well-established solid tumors. *Curr Opin Immunol* 2006;18:226-31.

- (11) Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:175-208..
- (12) Boileau C, Houde M, Dulude G, Clegg CH, Perreault C. Regulation of extrathymic T cell development and turnover by Oncostatin M. *J Immunol* 2000;164:5713-20.
- (13) Blais ME, Gérard G, Martinic MM, Roy-Proulx G, Zinkernagel RM, Perreault C. Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar immune responses? *Blood* 2004;103:3102-10.
- (14) Wells AD, Gudmundsdottir H, Turka LA. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J Clin Invest* 1997;100:3173-83.
- (15) Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994;171:131-7.
- (16) Gudmundsdottir H, Wells AD, Turka LA. Dynamics and requirements of T cell clonal expansion *in vivo* at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J Immunol* 1999;162:5212-23.
- (17) Rocha B, Tanchot C. Towards a cellular definition of CD8<sup>+</sup> T-cell memory: the role of CD4<sup>+</sup> T-cell help in CD8<sup>+</sup> T-cell responses. *Curr Opin Immunol* 2004;16:259-63.
- (18) Bevan MJ. Helping the CD8<sup>+</sup> T-cell response. *Nat Rev Immunol* 2004;4:595-602.
- (19) Pion S, Fontaine P, Desaulniers M, Jutras J, Filep JG, Perreault C. On the mechanisms of immunodominance in cytotoxic T lymphocyte responses to minor histocompatibility antigens. *Eur J Immunol* 1997;27:421-30.
- (20) Roy-Proulx G, Meunier MC, Lanteigne AM, Brochu S, Perreault C. Immunodomination results from functional differences between competing CTL. *Eur J Immunol* 2001;31:2284-92.
- (21) van Elsas A, Suttmuller RPM, Hurwitz AA, Ziskin J, Villasenor J, Medema J-P, et al. Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment

- based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy. *J Exp Med* 2001;194:481-90.
- (22) Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000;74:181-273.
- (23) Eden PA, Christianson GJ, Fontaine P, Wettstein PJ, Perreault C, Roopenian DC. Biochemical and immunogenetic analysis of an immunodominant peptide (B6<sup>dom1</sup>) encoded by the classical *H7* minor histocompatibility locus. *J Immunol* 1999;162:4502-10.
- (24) Mazo IB, Honczarenko M, Leung H, Cavanagh LL, Bonasio R, Weninger W, et al. Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity* 2005;22:259-70.
- (25) Di Rosa F, Pabst R. The bone marrow: a nest for migratory memory T cells. *Trends Immunol* 2005;26:360-6.
- (26) Ge Q, Bai A, Jones B, Eisen HN, Chen J. Competition for self-peptide-MHC complexes and cytokines between naive and memory CD8<sup>+</sup> T cells expressing the same or different T cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3041-6.
- (27) Ho WY, Blattman JN, Dossett ML, Yee C, Greenberg PD. Adoptive immunotherapy: engineering T cell responses as biologic weapons for tumor mass destruction. *Cancer Cell* 2003;3:431-7.
- (28) Nijmeijer BA, van Schie ML, Verzaal P, Willemze R, Falkenburg JH. Responses to donor lymphocyte infusion for acute lymphoblastic leukemia may be determined by both qualitative and quantitative limitations of antileukemic T-cell responses as observed in an animal model for human leukemia. *Exp Hematol* 2005;33:1172-81.
- (29) Riddell SR, Bleakley M, Nishida T, Berger C, Warren EH. Adoptive transfer of allogeneic antigen-specific T cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;9-12.
- (30) Mutis T, Gillespie G, Schrama E, Falkenburg JHF, Moss P, Goulmy E. Tetrameric HLA class I-minor histocompatibility antigen peptide complexes

demonstrate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with graft-versus-host disease. *Nat Med* 1999;5:839-42.

- (31) Choi EY, Christianson GJ, Yoshimura Y, Jung N, Sproule TJ, Malarkannan S, et al. Real-time T-cell profiling identifies H60 as a major minor histocompatibility antigen in murine graft-versus-host disease. *Blood* 2002;100:4259-64.
- (32) Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: *In vivo* persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16168-73.
- (33) Lane C, Leitch J, Tan X, Hadjati J, Bramson JL, Wan Y. Vaccination-induced autoimmune vitiligo is a consequence of secondary trauma to the skin. *Cancer Res* 2004;64:1509-14.
- (34) Obhrai JS, Oberbarnscheidt MH, Hand TW, Diggs L, Chalasani G, Lakkis FG. Effector T cell differentiation and memory T cell maintenance outside secondary lymphoid organs. *J Immunol* 2006;176:4051-8.
- (35) Oosten LE, Blokland E, Van Halteren AG, Curtsinger J, Mescher MF, Falkenburg JH, et al. Artificial antigen-presenting constructs efficiently stimulate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 2004;104:224-6.
- (36) Heemskerk MHM, Hoogeboom M, Hagedoorn R, Kester MGD, Willemze R, Falkenburg JHF. Reprogramming of virus-specific T cells into leukemia-reactive T cells using T cell receptor gene transfer. *J Exp Med* 2004;199:885-94.
- (37) Rice J, Dunn S, Piper K, Buchan SL, Moss PA, Stevenson FK. DNA fusion vaccines induce epitope-specific cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells against human leukemia-associated minor histocompatibility antigens. *Cancer Res* 2006;66:5436-42.
- (38) Bonnet D, Warren EH, Greenberg PD, Dick JE, Riddell SR. CD8<sup>+</sup> minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones eliminate human acute myeloid leukemia stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8639-44.

- (39) Uhr JW, Scheuermann RH, Street NE, Vitetta ES. Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches. *Nat Med* 1997;3:505-9.
- (40) Zinkernagel RM, Planz O, Ehl S, Battegay M, Odermatt B, Klenerman P, et al. General and specific immunosuppression caused by antiviral T-cell responses. *Immunol Rev* 1999;168:305-15.
- (41) Hambach L, Goulmy E. Immunotherapy of cancer through targeting of minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol* 2005;17:202-10.
- (42) Rijke BD, Horssen-Zoetbrood A, Beekman JM, Otterud B, Maas F, Woestenenk R, et al. A frameshift polymorphism in P2X5 elicits an allogeneic cytotoxic T lymphocyte response associated with remission of chronic myeloid leukemia. *J Clin Invest* 2005;115:3506-16.
- (43) Brickner AG, Evans AM, Mito JK, Xuereb SM, Feng X, Nishida T, et al. The PANE1 gene encodes a novel human minor histocompatibility antigen that is selectively expressed in B-lymphoid cells and B-CLL. *Blood* 2006;107:3779-86.
- (44) Klein CA, Wilke M, Pool J, Vermeulen C, Blokland E, Burghart E, et al. The hematopoietic system-specific minor histocompatibility antigen HA-1 shows aberrant expression in epithelial cancer cells. *J Exp Med* 2002;196:359-68.
- (45) Spierings E, Wieles B, Goulmy E. Minor histocompatibility antigens - big in tumour therapy. *Trends Immunol* 2004;25:56-60.
- (46) Hakim FT, Memon SA, Cepeda R, Jones EC, Chow CK, Kasten-Sportes C, et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J Clin Invest* 2005;115:930-9.
- (47) Storb R, Prentice RL, Sullivan KM, Shulman HM, Deeg HJ, Doney KC, et al. Predictive factors in chronic graft-versus-host disease in patients with aplastic anemia treated by marrow transplantation from HLA-identical siblings. *Ann Intern Med* 1983;98:461-6.
- (48) Zecca M, Prete A, Rondelli R, Lanino E, Balduzzi A, Messina C, et al. Chronic graft-versus-host disease in children: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Blood* 2002;100:1192-200.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Experimental model and study design. Melanoma-bearing mice received splenocytes primed against H7<sup>a</sup> on day 7. Short-term studies on T-cell proliferation kinetics were performed from day 10 to day 15 and long-term studies on memory T cells were initiated on day 100.

**Figure 2.** Anti-H7<sup>a</sup> T cells accumulate in the tumor. We treated B10 recipient mice as described in Fig. 1. Cell suspensions from their spleen and tumor were obtained on day 10, 13 and 15, and stained with H7<sup>a</sup> tetramers and CD8 antibody. Proportion (*A*) and absolute numbers (*B*) of H7<sup>a</sup> tetramer-positive CD8 T cells in 3-5 mice studied at each time point. \*  $P < 0.01$ ; §  $P < 0.001$ .

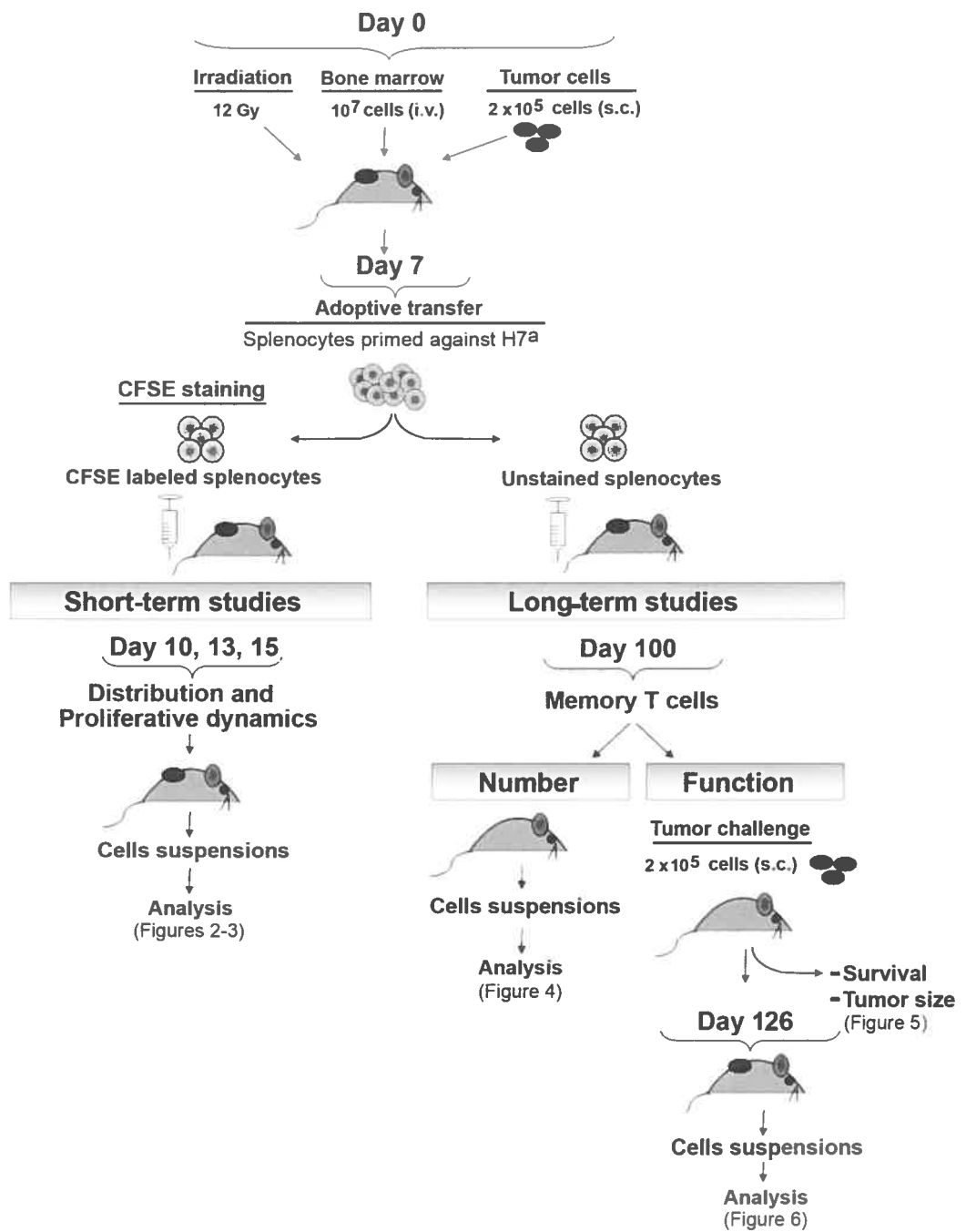
**Figure 3.** Evaluation of T-cell proliferative dynamics from CFSE profiles. B10 recipient were treated as in Fig. 1. *A*, one representative example of the CFSE profiles observed at each time point (gated on CD8<sup>+</sup> H7<sup>a</sup> tetramer<sup>+</sup> T cells) in the spleen and tumor. Numbers in the upper right corner of each panel represent the percentage of undivided cells (that is, cells showing the highest levels of CFSE). *B*, mean ( $\pm$  SD) burst size, doubling time and expansion of H7<sup>a</sup>-specific T cells between day 10 and day 15 in the spleen and tumor. The proliferative burst size and doubling time of anti-H7<sup>a</sup> T cells were calculated as described in materials and methods. Expansion is the mean number of cells on day 15/mean number of cells on day 10. Each group contained 3-5 mice. \*  $P < 0.001$  (spleen vs tumor).

**Figure 4.** Persistence of H7<sup>a</sup>-specific CD8<sup>+</sup> memory T cells. We studied four experimental groups: i) B10.H7<sup>b</sup> and B10 mice successfully treated for melanoma as described in Fig. 1 (+B16.F10); ii) euthymic and thymectomized (Tx) B10 mice that underwent the same protocol excepting injection of melanoma cells on day 0. On day 100, we sacrificed 3 mice per group and stained cell suspensions from spleen and bone marrow with H7<sup>a</sup> tetramers and antibodies against CD8 and CD44. *A*, dot plots of one representative experiment out of three (gated on CD8 cells). *B*, proportion and absolute

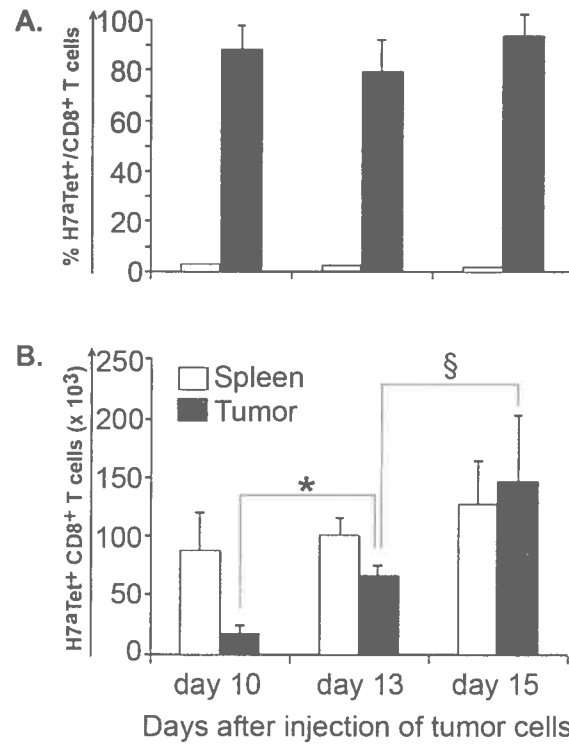
number of H7<sup>a</sup>-specific T cells in recipients' spleen and bone marrow (2 tibiae and femurs). Histograms represent the mean  $\pm$  SD of 3 mice per group. Inserts depict CD44 expression on tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells found in euthymic B10.H7<sup>b</sup> and thymectomized B10 hosts. MFI: mean fluorescence intensity.

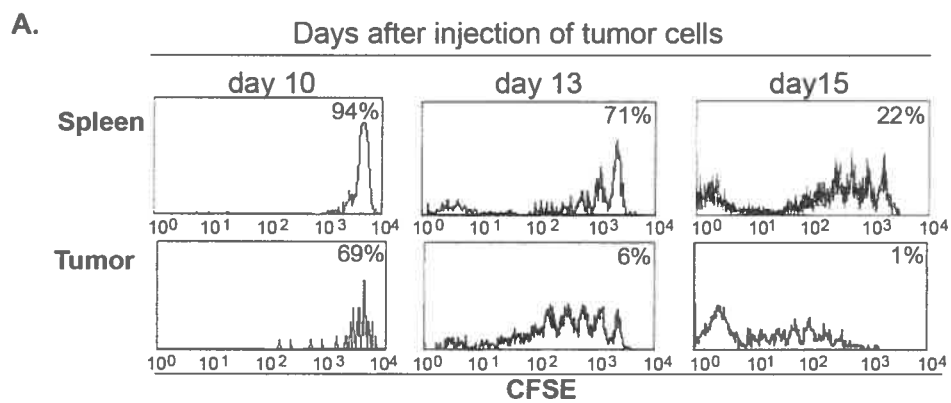
**Figure 5.** Challenge of long-term chimeras with melanoma cells. We studied mice from the four experimental groups described in Fig. 4. On day 100, mice were challenged with  $2 \times 10^5$  B16.F10 melanoma cells s.c. *A*, tumor surface area and *B*, survival of experimental groups ( $n \geq 10$  mice per group). The mean survival times for the following groups were significantly different: white vs. black, white vs. red, and blue vs. black,  $P < 0.0001$ ; red vs. black,  $P < 0.001$ . *C*, examination of excised tumor injection site shows large tumor nodules (black) in B10 mice but only an inconspicuous micro-nodule in the B10.H7<sup>b</sup> mouse (one representative experiment out of 10). Tx, thymectomized.

**Figure 6.** Anti-H7<sup>a</sup> T-cell response following tumor challenge. We studied mice from the four experimental groups described in Fig. 4. On day 100, we challenged mice with  $2 \times 10^5$  B16.F10 melanoma cells s.c. Mice were sacrificed mice on day 126 and cell suspensions from their spleen, bone marrow and tumor were stained with H7<sup>a</sup> tetramers and anti-CD8 antibody. *A*, dot plots of one representative experiment out of three (gated on CD8 cells). *B*, proportion and absolute number of H7<sup>a</sup>-specific T cells in recipients' spleen, bone marrow (2 tibiae and femurs) and tumor on day 126. Results are depicted as the mean  $\pm$  SD of 3 mice per group. Absolute numbers of H7<sup>a</sup>-specific T cells in the three sites were higher in thymectomized relative to euthymic B10 hosts ( $0.02 < P < 0.002$ ), and were higher in B10.H7<sup>b</sup> than in euthymic ( $P < 0.0005$ ) or thymectomized ( $P < 0.01$ ) B10 hosts. Tx, thymectomized.



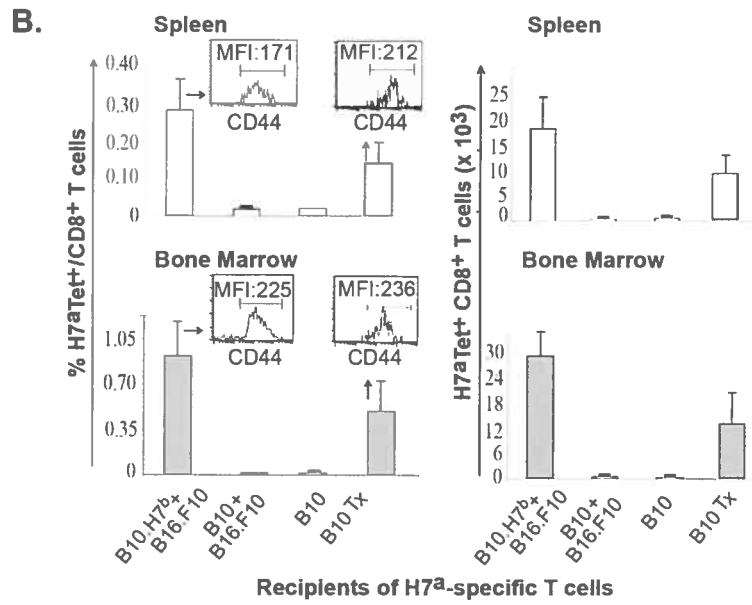
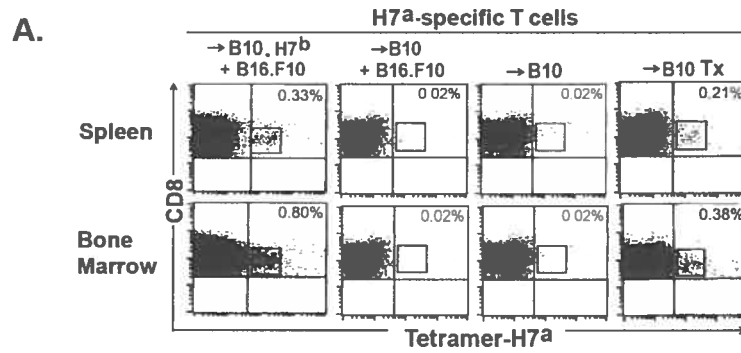


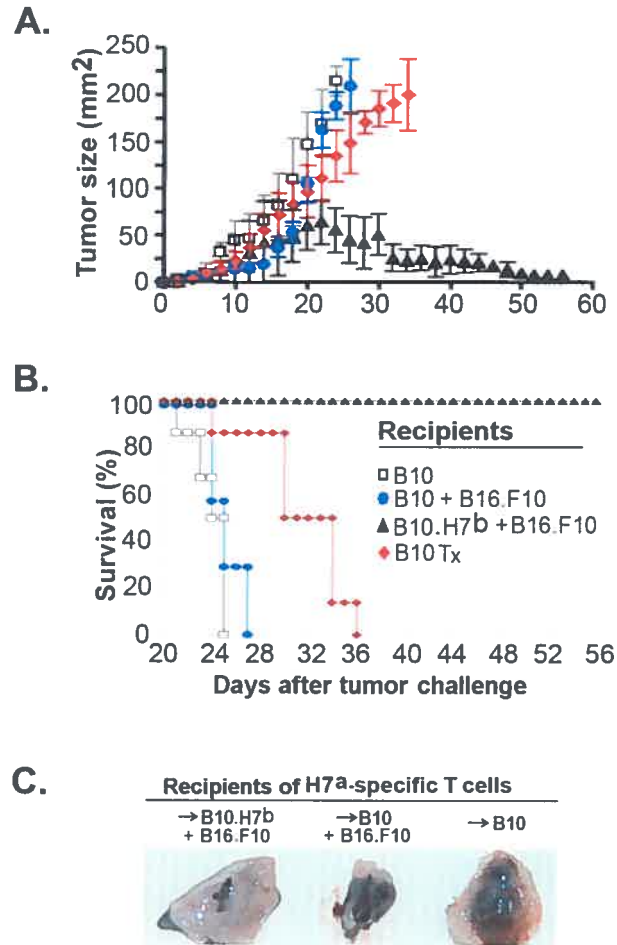


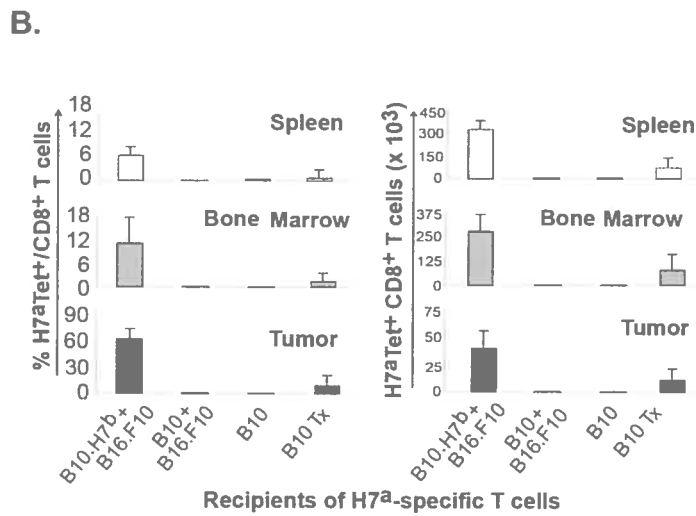
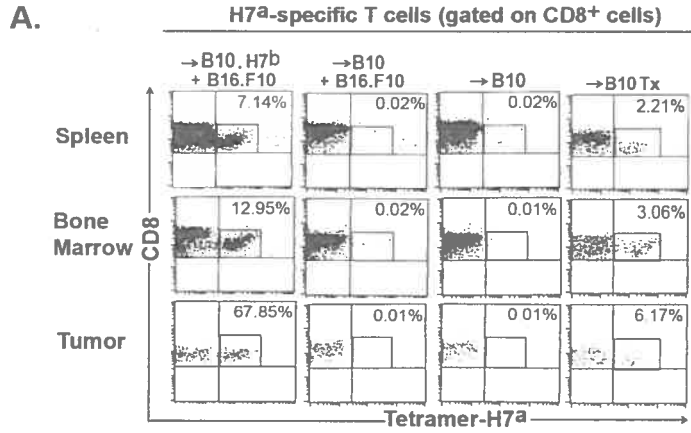


**B.**

	H7 <sup>a</sup> -specific T cells	
	spleen	tumor
Burst size, n	3.0 +/- 1.2	10.6 +/- 3.5 *
Doubling time, h	144 +/- 29	49 +/- 10 *
Expansion, x-fold	1.2 +/- 1.1	8.5 +/- 2.2 *







## **4. DISCUSSION**

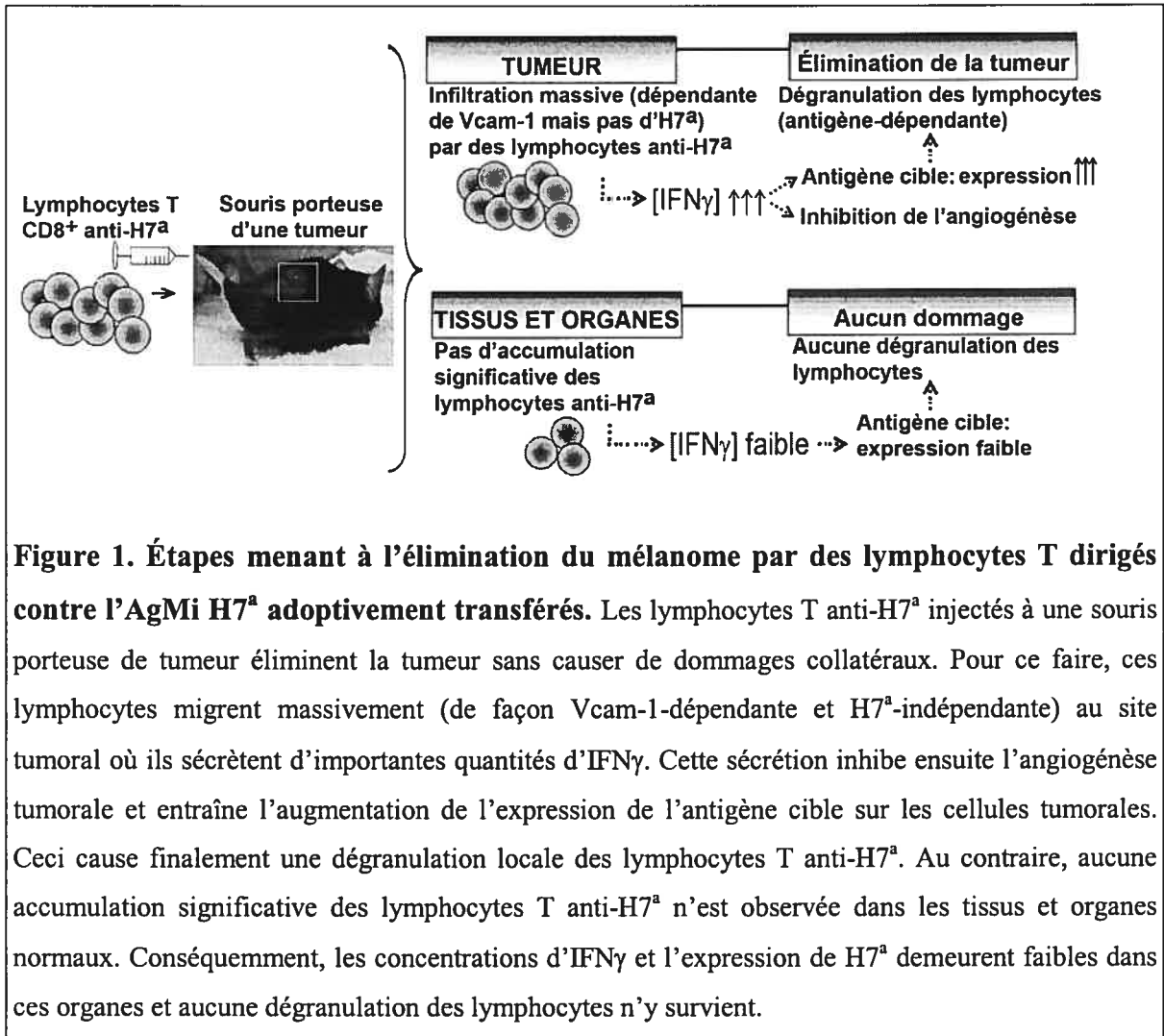
## 4. DISCUSSION

### 4.1. Bref rappel des résultats

Tel que mentionné antérieurement, le premier objectif des travaux réalisés dans le cadre de ce doctorat était de déterminer si des lymphocytes T CD8 adoptivement transférés et dirigés contre un AgMi dominant pouvaient générer une réponse curative contre une tumeur solide déjà bien établie. Pour ce faire nous avons utilisé H7<sup>a</sup> comme modèle d'AgMi ainsi que le mélanome B16.F10 comme tumeur solide à traiter. Nous voulions donc ici établir la capacité de lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> à éliminer des cellules de mélanome déjà bien établies. Nos études nous permettent donc maintenant d'affirmer qu'après transfert adoptif chez des hôtes atteints de mélanome, les lymphocytes T dirigés contre l'AgMi immunodominant H7<sup>a</sup> arrivent à induire des taux de rémission notables. En effet, nous avons pu observer une régression et une élimination totale des tumeurs chez plus de 45% des souris B10 traitées.

Cette partie de nos études nous a également permis de déterminer la séquence d'événements menant à l'élimination de cellules de mélanome par des lymphocytes T dirigés contre un AgMi immunodominant, H7<sup>a</sup>. Selon nos travaux, l'élimination de la tumeur se déroule de la façon suivante: d'abord, suite à leur injection chez la souris receveuse, les lymphocytes anti-H7<sup>a</sup> pré-activés s'accumulent préférentiellement au site tumoral de façon antigène-indépendante. Ces lymphocytes sécrètent ensuite localement de l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ) inhibant l'angiogénèse tumorale et entraînant l'augmentation de l'expression des molécules du CMH I sur les cellules néoplasiques. Finalement, les lymphocytes reconnaissant leur Ag sécrètent des molécules cytotoxiques qui s'attaqueront à la tumeur. Nos études nous ont également permis d'établir que l'entrée des lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> est facilitée par

l'expression augmentée des molécules d'adhésion cellulaire VLA-4, sur les lymphocytes T, et VCAM-1, sur les vaisseaux formant la tumeur. Les étapes permettant d'éradiquer un mélanome suite à un transfert adoptif de lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> décrites dans les paragraphes antérieurs sont ici présentées de façon schématisée dans la figure ci-dessous.



Le second objectif de cette thèse était d'étudier les différences relatives au programme de différenciation entre des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dirigés contre un AgMi immunodominant et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dirigés contre un AgMi non-immunodominant. Pour ce faire, nous avons donc utilisé des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques à l'AgMi immunodominant H7<sup>a</sup> et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques à l'AgMi non-immunodominant HY. Le choix s'est posé sur ces deux épitopes pour trois raisons. Tout d'abord ces deux AgMis sont présentés



par la même molécule du CMH de classe : H2D<sup>b</sup>. En second lieu, leur séquence biochimique étant connue <sup>(63, 142)</sup>, il devenait possible d'utiliser des outils tels les tétramères pour suivre l'évolution des lymphocytes T spécifiques à chaque épitope dans nos études. Finalement, il s'agit de deux épitopes situés à des extrémités opposées sur l'échelle de la dominance. En effet, HY est toujours nondominant lorsque présenté conjointement avec un ou plusieurs autres AgMis ; alors que H7<sup>a</sup> est, dans plusieurs combinaisons, dominant lorsque présenté en même temps que d'autres AgMis <sup>(148, 209)</sup>. De plus, étant donné que H7<sup>a</sup> est l'Ag au cœur de nos essais d'immunothérapie adoptive, il devenait très utile et important pour nous d'obtenir de l'information relative aux réponses T dirigées contre cet AgMi et de comprendre les caractéristiques qui en font une excellente cible.

Afin de réaliser cet objectif, les travaux ont été effectués en deux temps. Tout d'abord, des études portant sur le patron de gènes exprimés par des lymphocytes T CD8 dirigés contre l'Ag immunodominant H7<sup>a</sup> et des lymphocytes T dirigés contre l'Ag immunodominé HY ont été effectuées au jour 14 post-immunisations. Dans cette partie de l'étude, le transcriptome des cellules T effectrices CD8 anti-H7<sup>a</sup> a donc pu être comparé à celui des cellules T effectrices CD8 anti-HY grâce à la technologie des microarrays. Cette partie des travaux, principalement réalisée par madame Chantal Baron, nous a permis de découvrir que le patron d'expression génique retrouvé chez des lymphocytes T CD8 anti-H7<sup>a</sup> était très similaire au patron exprimé par des lymphocytes T anti-HY. En effet, seulement 15 gènes différaient au niveau de leur expression entre les deux populations de lymphocytes T CD8 effecteurs. De ceux-ci, sept gènes se trouvaient à être exprimés à de plus forts niveaux chez les lymphocytes T anti-H7<sup>a</sup> par rapport aux lymphocytes T anti-HY : L'*IL7r*, le granzyme A (*Gzma*), *Vamp5*, *S100a4*, *Csflr*, *Ftl1* ainsi que *Edg8*. L'*IL7r* est un gène codant pour le récepteur de l'IL-7 (CD127) dont l'expression permet de fournir aux lymphocytes T les signaux de survie permettant aux cellules T de passer au stade de lymphocytes T mémoires

(91, 92). Le Granzyme A (*Gzma*) est une sérine protéase retrouvée dans les granules cytotoxiques des lymphocytes T, induisant la mort cellulaire <sup>(14)</sup>. *Vamp5* est impliquée au niveau de l'ancrage et de la fusion retrouvée dans les processus intercellulaires et intracellulaire, tel que la synapse immunologique impliquant le TCR <sup>(41, 224)</sup>. *S100a4* régule la progression à travers le cycle cellulaire. Finalement, les gènes *Csflr*, *Flt1* et *Edge8* se trouvent augmentés chez des lymphocytes T activés par opposition aux lymphocytes T naïfs. Toutefois, leur rôle reste encore inconnu. Contrairement à ces sept gènes, huit gènes étaient plutôt surexprimés chez les lymphocytes T anti-HY par rapport aux lymphocytes T anti-H7<sup>a</sup> : Les gènes *Sell*, *Klrg1*, *Fus*, *Eomes*, *Mfhas*, *Pcbp2*, *Rps8* ainsi que *Ung*. Le gène *Sell* code pour la molécule CD62L, responsable de l'entrée des lymphocytes T à l'intérieur des ganglions lymphatiques. Une diminution de l'expression de CD62L diminuerait donc l'entrée des lymphocytes T dans les ganglions, les poussant vers les tissus non lymphoïdes <sup>(198)</sup>. Pour sa part, *Klrg1* est associé à une sénescence au niveau de la réplication cellulaire et pourrait potentiellement participer à la diminution des réponses T CD8 <sup>(91, 197)</sup>. *Fus*, lorsqu'augmenté, serait associé à la polarisation TH2 des cellules T CD4. *Eomes*, lorsqu'augmenté, pourrait compromettre la survie des cellules T CD8 <sup>(7)</sup>. Finalement, les gènes *Mfhas*, *Pcbp2*, *Rps8* et *Ung* sont des gènes dont les rôles restent encore à définir. Suite à ces observations, des études de PCR en temps réel quantitatif (real time PCR) ont ensuite été entreprises afin de confirmer les résultats obtenus grâce aux microarrays. Ceci nous a permis de découvrir que quatre gènes étaient toujours exprimés de façon différente entre les lymphocytes T CD8 anti-H7<sup>a</sup> et anti-HY : *Il7r*, *Klrg1*, *sell* et *Gzma*.

Les données décrites précédemment ont été obtenues au jour 14 suite à l'immunisation. Il devenait donc important de vérifier si les résultats obtenus pouvaient aussi être observés à différents temps de la réponse immune. Dans un second temps nous avons donc procédé à l'analyse temporelle (du jour 7 au jour 100 post immunisation), par flux cytométrie, de

l'expansion des lymphocytes T anti-H7<sup>a</sup> et anti-HY ainsi que de certains marqueurs de différenciation. Grâce à nos études antérieures, nous nous sommes ici attardés aux marqueurs CD62L, CD43 (reconnu par l'Ac 1B11), CD127 et KLRG1. Étant donné l'absence d'Ac dirigé contre le granzyme A de souris, l'Ac 1B11 fût utilisé comme marqueur de cytotoxicité. Cette partie des travaux nous a permis de découvrir plusieurs phénomènes importants. Tout d'abord, il existe d'importantes différences entre des lymphocytes T dirigés contre un Ag immunodominants et des lymphocytes T dirigés contre un épitope immunodominé. En effet, l'analyse temporelle des marqueurs de différenciation exprimés par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> lorsqu'ils répondent à l'épitope auquel ils sont spécifiques nous a permis de découvrir que, malgré le fait que le programme de différenciation des lymphocytes T spécifiques à H7<sup>a</sup> et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques à HY soient très similaires, ils ne progressent pas de façon simultanée. Les lymphocytes T dirigés contre l'AgMi immunodominant H7<sup>a</sup> atteignent leur pic de différenciation très rapidement comparativement aux lymphocytes T dirigés contre l'AgMi non dominant HY. De plus, l'analyse des marqueurs CD62L, CD127 ainsi que CD43 (1B11) exprimés à la surface des deux populations de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> nous ont également permis de découvrir que la phase d'expansion et le développement des fonctions effectrices se produisaient de façon synchrone chez les lymphocytes T anti- H7<sup>a</sup>, mais pas chez les lymphocytes T anti-HY. En résumé, nos données nous ont permis de démontrer que l'expansion rapide des lymphocytes T dirigés contre un Ag immunodominant tel H7<sup>a</sup> ainsi que la modulation bien synchronisée de l'expression de CD62L, CD43 et de CD127 en font de meilleurs effecteurs comparativement aux lymphocytes T dirigés contre un Ag non-dominant tel HY. Ceci nous a ainsi amené à proposer que le phénomène d'immunodominance, qu'on croyait à prime abord néfaste pour l'hôte, soit plutôt bénéfique à l'hôte en assurant et en favorisant l'expansion des meilleurs lymphocytes T. Cette observation a également soulevée de nouvelles questions. En effet, tel que mentionné précédemment, le phénomène d'immunodominance est un

phénomène très répandu en immunologie, observable autant lors de réponses aux virus, qu'aux réponses aux Ag tumoraux ou à des auto-Ag. Il serait donc très intéressant de vérifier si les découvertes réalisées grâce à nos travaux pourraient être généralisables et applicables aux réponses à différents épitopes.

Le troisième objectif de cette thèse était d'évaluer, en termes de capacité proliférative, de migration et de persistance à long terme, le comportement de lymphocytes T dirigés contre un AgMi adoptivement transférés chez des hôtes porteurs de tumeurs solides. Pour répondre à ce troisième et dernier objectif nous avons encore une fois utilisé H7<sup>a</sup> comme modèle d'AgMi ciblé par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ainsi que le mélanome B16.F10 comme tumeur solide à traiter. Nos travaux réalisés nous ont amené à découvrir que les lymphocytes T anti-H7<sup>a</sup> adoptivement transférés sont capables de proliférer massivement au site tumoral dans des temps précoces suite à leur transfert chez un hôte affligé d'un mélanome. De plus, nos travaux portant sur la persistance des lymphocytes T spécifiques à l'AgMi immunodominant H7<sup>a</sup> ont également permis de découvrir qu'une mémoire immunologique peut être générée dans notre modèle. En effet, des lymphocytes T spécifiques à H7<sup>a</sup> ont pu être observés chez des receveurs B10.H7<sup>b</sup>, plus de cent jours suite à leur transfert. Toutefois, cette persistance à long terme des lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> s'est avérée dépendante de deux facteurs chez l'hôte: 1) l'expression de l'antigène cible ainsi que 2) la fonction thymique de l'hôte.

## 4.2. Avantages reliés à notre modèle

Les résultats obtenus (exposés dans l'article 1 et 3 présentés dans cette thèse) face à une tumeur non-hématopoïétique telle que le mélanome grâce à l'injection de lymphocytes T dirigés contre l'AgMi immunodominant H7<sup>a</sup> sont remarquables. Plusieurs raisons peuvent

être proposées pour expliquer la qualité des réponses obtenues contre le mélanome dans ces travaux.

Tout d'abord, nos études nous ont permis d'établir que l'effet anti-tumoral observé dans notre modèle était imputable à deux effets : 1) la lyse directe des cellules tumorales ainsi qu'à 2) l'inhibition et à la destruction des vaisseaux néoplasiques. Rares sont les stratégies permettant de cibler ces deux constituants tumoraux en même temps (cellules tumorales et vaisseaux tumoraux). Notre modèle présente donc l'avantage de cibler la tumeur sur plus d'un plan à la fois, les cellules tumorales ainsi que la néoangiogénèse.

Deuxièmement, la radiation utilisée avant la transplantation de moelle osseuse et le transfert de lymphocytes T pourrait également avoir un effet très bénéfique sur la réponse anti-mélanome générée dans notre modèle. Des études ont démontré que chez un hôte ayant subi une irradiation partielle (5 Grey, irradiation non-myéloablative), des lymphocytes T de la moelle pouvant entrer en compétition avec les lymphocytes T transférés sont grandement diminués (éliminés en grands nombres par l'irradiation, mais certains persistent) chez le receveur. Dans ces conditions, les cytokines homéostatiques (telles l'IL-7 et l'IL-15) disponibles pour les lymphocytes T transférés sont en plus grande quantité que chez des hôtes non irradiés. Ces conditions aident grandement la réactivité des cellules T face aux Ag. Cet effet dû à l'irradiation peut être d'avantage augmenté par une ablation complète de la moelle osseuse par de fortes doses d'irradiation (9 Grey, irradiation myéloablative), telle l'irradiation utilisée dans notre modèle. Ceci cause une lymphopénie et une élimination totale des lymphocytes T de la moelle pouvant entrer en compétition avec les lymphocytes T transférés. Ceci augmente encore d'avantage la quantité de cytokines homéostatiques devenant disponibles pour les lymphocytes T injectés et libère les niches pouvant être occupées par les lymphocytes T. Ainsi, chez un hôte ayant subi une irradiation totale, la

lymphopénie engendrée permet aux lymphocytes T transférés de consommer les cytokines et de proliférer massivement de façon homéostatique et d'acquérir les caractéristiques des lymphocytes T mémoires très efficaces. Par conséquent, ceci entraîne une amélioration de l'efficacité anti-tumorale des lymphocytes T transférés <sup>(213)</sup>.

Troisièmement, un modèle de transfert adoptif, tel celui présenté ici, présente également l'avantage de pouvoir contrôler le nombre de cellules T dirigées contre l'Ag obtenues et utilisées contre la tumeur. En effet, les cellules tumorales sont caractérisées par une croissance incontrôlée et souvent très rapide, ce qui rend très difficile leur élimination par un nombre limité de lymphocytes T cytotoxiques. Toutefois, grâce à un transfert adoptif il devient possible de palier ce problème en injectant d'avantage de lymphocytes T capables de répondre au cancer.

Quatrièmement, notre modèle présente également l'avantage de pouvoir contrôler l'état dans lequel les lymphocytes T se trouvent au moment de leur injection. Les cellules T dirigées contre H7<sup>a</sup> sont déjà pré-activées au moment du transfert. En effet, les lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> sont issus d'une immunisation contre H7<sup>a</sup> et sont au jour 14 post immunisation. Il s'agit donc de lymphocytes T déjà effecteurs ayant eu un premier contact avec l'Ag. Ces lymphocytes possèdent donc l'arsenal cytotoxique nécessaire pour éliminer rapidement des cellules tumorales présentant ce même Ag ainsi que toutes les molécules d'adhésion cellulaire caractéristiques de lymphocytes T effecteurs leur permettant de circuler dans les organes périphériques et d'entrer dans une tumeur extra lymphoïde telle le mélanome. Ceci permet ainsi de fournir aux souris à traiter des lymphocytes T déjà aptes à répondre très rapidement à leur Ag et à circuler dans les tissus extra-lymphoïdes. Ceci permet de sauver énormément de temps étant donné leur capacité à circuler et à répondre rapidement à leur

Ag. Cette sauvegarde du temps est capitale étant donné que plusieurs tumeurs prolifèrent très rapidement et enclenchent rapidement les mécanismes inhibant les réponses immunes.

L'injection de lymphocytes T effecteurs est donc cruciale. Toutefois, une étude a récemment démontré que les lymphocytes T effecteurs ne sont pas tous égaux et que certains sont plus adéquats pour faire face à des cellules néoplasiques. Cette étude récente, réalisée par le groupe du Dr Restifo, a permis d'établir l'importance de la qualité des lymphocytes T transférés sur l'effet anti-tumoral obtenu suite au transfert <sup>(55)</sup>. Sachant que la différenciation des lymphocytes T était un processus progressif caractérisé par des changements phénotypiques et fonctionnels, cette équipe a donc entrepris d'évaluer la capacité de lymphocytes T, à différents temps de leur différenciation, à éliminer une tumeur solide <sup>(55)</sup>. En transférant des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> à différents temps de leur différenciation chez des souris porteuses de tumeurs, ils ont donc évalué l'efficacité anti-tumorale de ces lymphocytes. Cette procédure leur a permis de découvrir que l'injection de cellules effectrices à une étape précoce de leur différenciation permettait d'éliminer de grosses tumeurs déjà établies. Par contre, malgré la présence de propriétés anti-tumorales *in vitro*, les cellules T effectrices à des temps plus tardifs de leur différenciation étaient moins efficaces *in vivo*. Les auteurs suggèrent que cette baisse d'efficacité serait imputable à une diminution des molécules de co-stimulation à la surface des lymphocytes et à leur entrée dans un état pro-apoptotique et de sénescence répllicative.

Finalement, notre modèle présente également l'avantage d'utiliser des lymphocytes T dirigés contre un Ag très immunogène qui n'a pas tendance à subir de mutation. L'Ag H7<sup>a</sup> n'a donc pas tendance à disparaître en cours de traitement. La situation n'est toutefois pas identique pour d'autres Ag. Plusieurs Ag reconnus par les lymphocytes T autologues ont été identifiés sur des mélanomes humains <sup>(19)</sup>. Les patients atteints de mélanome développent souvent de

façon spontanée des réponses T dirigées contre ces AATs. Il serait donc logique d'espérer que des mélanomes puissent être éliminés par de tels lymphocytes T. Malheureusement, cette réponse se traduit rarement par un bénéfice à long terme. Parmi les raisons pouvant expliquer ces résultats décevants, l'équipe du Dr Riddell a récemment observé que certains des Ag ciblés par les lymphocytes T viennent à disparaître à cause de mutations. Ceci entraîne par la suite une perte de reconnaissance par les lymphocytes T et ainsi une perte de l'effet anti-tumoral <sup>(154)</sup>.

### 4.3. Transposition des données murines à l'humain

Les souris de laboratoire représentent depuis longtemps des outils extraordinaires pour élucider et comprendre la pathogénèse du cancer. La quantité de données générées grâce aux études chez la souris et le rat sont donc vraiment considérables. Toutefois il n'en demeure pas moins que leur application au développement de stratégies de traitement de l'homme reste très complexe. Ainsi, de nombreuses différences métaboliques, génétiques, ontogénétiques ainsi qu'au niveau du spectre de tumeurs retrouvées chez les deux espèces ou des agents carcinogènes chez chaque espèce varient considérablement <sup>(3, 152)</sup>. Ces différences doivent donc être prises en considération. Il est donc crucial de demeurer prudent lorsqu'il s'agit d'utiliser des données obtenues dans des modèles murins et de les transposer au développement de stratégies de traitement chez l'humain. Tel que mentionné, les similarités relatives au spectre de tumeurs spontanées retrouvées chez la souris comparativement au spectre de tumeurs affligeant l'humain, sont limitées. Les souris ont d'avantage tendance à développer spontanément des tumeurs d'origine mésodermiques de type sarcomes; alors que les humains développent d'avantage de tumeurs épithéliales de type carcinomes <sup>(3, 68, 152)</sup>. De plus, les cinq principaux cancers chez l'humain sont ceux du sein, de la prostate, des poumons, du colon et de l'estomac. Les tumeurs mammaires sont également fréquentes chez



la souris. Toutefois, il n'existe pas de lignée de souris ayant un taux élevé de carcinomes spontanés du colon, de l'estomac, du poumon ou de la prostate <sup>(3)</sup>. En troisième lieu, la régression spontanée de tumeurs constitue un phénomène rarement observé chez l'humain adulte; alors que ceci se retrouve communément chez les rongeurs de laboratoires adultes <sup>(192)</sup>. En général, il est plus facile d'induire une tumeur chez la souris comparativement à l'induction d'une tumeur chez l'humain <sup>(68)</sup> et en même temps, il est plus facile de renverser le processus chez les rongeurs. Il existe également des différences au niveau des carcinogènes retrouvés chez la souris par rapport à ceux chez l'humain. En effet, très peu d'agents carcinogènes chez la souris sont également carcinogènes pour l'humain <sup>(3)</sup>. Inversement, très peu d'agents reconnus comme étant carcinogènes pour l'humain le sont pour la souris. Ceci complexifie de façon importante l'interprétation des résultats obtenus dans des modèles murins faisant appel à des substances non carcinogènes pour l'humain.

Outre les différences entre les cancers murins et les cancers humains, le choix de la cible peut également complexifier la transposition des données murines à l'humain. Nos données ont été obtenues à partir de l'AgMi modèle H7<sup>a</sup>. Toutefois, quoique polymorphique chez la souris, H7<sup>a</sup> ne présente pas de polymorphisme chez l'humain et ne peut ainsi pas générer de réponse allogénique. Il est donc nécessaire d'identifier un autre AgMi pouvant potentiellement être utilisé ayant les mêmes caractéristiques que H7<sup>a</sup> soit : être un AgMi, être immunodominant et pouvant être sur-exprimé dans une tumeur. Parmi les AgMis pouvant potentiellement être utilisés dans un transfert adoptif chez l'humain on retrouve l'AgMi immunodominant HA-1. Il s'agit d'un AgMi surexprimé sur les cellules et cancers hématopoïétiques ainsi que sur plusieurs types de tumeurs solides <sup>(100)</sup>. Des études réalisées par le groupe du Dr Goulmy ont également démontré que des lymphocytes T dirigés contre HA-1 arrivent à lyser des cellules de lignées de tumeurs solides *in vitro* <sup>(100)</sup>. De plus, des évidences supplémentaires supportant l'idée que des lymphocytes T dirigés contre l'AgMi

HA-1 puissent éliminer des tumeurs solides ont récemment été obtenues grâce à des études réalisées par le groupe du Dr Tykodi. Dans cette étude, des lymphocytes T dirigés contre les AgMis HA-1, HA-3 et HA-8 ont été isolés chez des patients atteints de cancer du rein présentant une réponse clinique suite au traitement par transplantation allogénique. Il s'agit de la première étude décrivant la relation entre les lymphocytes T dirigés contre des AgMis et des réponses cliniques obtenues lors du traitement de patients atteints de tumeurs solides traités par transplantation allogéniques de cellules souches hématopoïétiques <sup>(186)</sup>. Les résultats obtenus jusqu'à présent grâce à l'AgMi HA-1 sont plutôt prometteurs. Espérons que des recherches intensives permettront d'élargir le spectre d'AgMi pouvant être utilisés en immunothérapie.

#### **4.4. Perspectives futures et nouvelles questions soulevées**

##### **4.4.1. Généralités**

Les études réalisées dans le cadre de cette thèse nous ont permis d'établir les bases de la réponse anti-tumorale suite à un transfert adoptif de lymphocytes T dirigés contre un AgMi chez des receveurs porteurs de tumeurs solides. Évidemment ceci ne représente qu'un pas et, comme il arrive souvent en recherche, une découverte génère habituellement de nouvelles questions. Ainsi trois questions ont été soulevées suite à nos études et persistent toujours, ouvrant la porte à de nouveaux projets. Tout d'abord, nous avons réussi à obtenir un taux de survie et de rémission chez près de 45% des souris traitées avec des lymphocytes T pré-activés contre H7<sup>a</sup>. Ceci est très intéressant et remarquable. Toutefois, il serait vraiment fantastique de pouvoir atteindre des niveaux de survie encore supérieurs. Des stratégies visant à améliorer le traitement afin d'obtenir ces meilleurs taux de survie sont donc suggérés

dans les paragraphes suivant. De plus nous avons établi que l'élimination tumorale dans notre modèle dépendait d'une accumulation préférentielle de lymphocytes T au niveau de la tumeur. Ceci soulève donc la question suivante : pourquoi les lymphocytes T migrent-ils préférentiellement au site tumoral. Des spéculations relatives à ceci sont également proposées dans les sections à venir.

En second lieu, les travaux réalisés dans le cadre de ce doctorat nous ont également permis de faire la lumière sur plusieurs caractéristiques propres aux réponses T dirigées contre un Ag dominant (H7<sup>a</sup>) et aux réponses T dirigées contre un Ag non dominant (HY). Ces travaux ont fait avancer nos connaissances relativement au processus d'immunodominance mais ont aussi soulevé de nouvelles questions qui vaudraient la peine d'être investiguées. Parmi ces questions ont retrouve celles concernant la possibilité d'extrapoler les résultats relatifs à nos études à d'autres épitopes ou encore à l'utilisation de données obtenues concernant l'Ag H7<sup>a</sup> dans l'amélioration de l'effet anticancéreux dans notre modèle. Ces quelques points seront également discutés dans quelques pages.

En troisième lieu, nous avons observé au cours de nos travaux que les lymphocytes T anti-H7<sup>a</sup> proliféraient massivement à l'intérieur du mélanome, mais pas dans la rate. Ceci ouvre donc la porte à des études portant sur les facteurs responsables de cette prolifération sélective. Il serait ici intéressant de faire des études d'imagerie afin de déterminer avec quelles cellules les lymphocytes T interagissent-ils suite à leur entrée dans la tumeur. Les cellules présentatrices d'Ag telles les cellules dendritiques auraient-elles un rôle à jouer dans cette prolifération? Finalement, les travaux réalisés au cours de ce doctorat ont permis d'établir que des lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> peuvent, dans certaines conditions, persister jusqu'à plus de cent jours suite à leur injection chez le receveur. Il serait ici intéressant de caractériser phénotypiquement et fonctionnellement d'avantage la réponse

mémoire engendrée dans notre modèle. Ce dernier point est également discuté dans quelques pages.

#### 4.4.2. Amélioration du traitement

Les résultats obtenus relatifs à l'élimination du mélanome grâce à l'injection de lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> étaient plutôt satisfaisants. Toutefois il serait souhaitable d'améliorer la survie des souris suite à l'injection des lymphocytes de façon à se rapprocher de 100% de survie. Pour ce faire, quatre aspects du traitement pourraient être améliorés 1) la survie des lymphocytes T, 2) la fonction des lymphocytes T, 3) la capacité lymphocytaire à infiltrer la tumeur et, 4) la résistance face aux facteurs inhibiteurs.

Tout d'abord, nos études nous ont permis de déterminer que la survie des lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> était dictée par deux facteurs principaux : 1) l'expression de l'Ag à la surface des cellules de l'hôte et 2) par la fonction thymique de l'hôte. Chez un hôte exprimant de façon ubiquitaire l'Ag, les lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> ne persistaient pas. Il serait donc utile de modifier la durée de vie limitée des lymphocytes T anti-H7<sup>a</sup> dans ces conditions. Pour ce faire, des stratégies utilisées par d'autres équipes pourraient être envisagées. Parmi celles-ci on retrouve des stratégies génétiques limitant l'apoptose précoce des lymphocytes T. Des études ont démontré qu'il était possible de prolonger la survie des lymphocytes T en ciblant la machinerie apoptotique des cellules T. On peut y arriver en surexprimant les molécules anti-apoptotique BCL-2 (B-cell-lymphoma 2) <sup>(31, 113)</sup> ou Bcl-XL <sup>(46)</sup>. Il pourrait également être utile d'étudier la possibilité de modifier la sensibilité des lymphocytes T aux mécanismes impliquant le TGFβ ou encore Fas de façon à contrer leur apoptose. Ceci pourrait être réalisé grâce à des anticorps bloquant CD95 ou le TGF.

L'amélioration de la survie des lymphocytes T suite à leur transfert pourrait également être obtenue grâce à l'utilisation d'ARN interférence. Il serait ainsi possible de bloquer l'ARNm codant pour des protéines régulant de façon négative la survie des T. Il serait ainsi possible de réduire l'expression de molécules pro-apoptotiques telle CD95 et empêcher ainsi le déclin prématuré du nombre de lymphocytes T capables de faire face au cancer <sup>(43)</sup>. Outre la production de molécules apoptotiques, la survie des lymphocytes T est également modulée par leur capacité à répondre aux facteurs de survie telles les cytokines IL-7 et IL-15. Il serait donc possible de jouer sur la capacité des T à répondre à ces cytokines afin de prolonger leur persistance. Des cytokines recombinantes pourraient donc être administrées ou des cellules T capables d'y répondre pourraient être générées par modification génétique. La persistance des cellules T peut également être modulée par les interactions entre CTLA-4 sur les lymphocytes T et ses ligands, CD80, CD86, exprimé sur les cellules dendritiques. Une étude a démontré que le blocage de cette interaction, grâce à des Ac bloquant CTLA-4, permet d'augmenter le rejet tumoral dans un modèle murin <sup>(140)</sup>.

Le contrôle tumoral peut également être amélioré par l'optimisation des fonctions effectrices des cellules T capables de générer une réponse anti-tumorale. L'optimisation peut se faire sur deux points principalement : tout d'abord en améliorant le récepteur des lymphocytes T capables de répondre à l'Ag ou 2) encore en améliorant la capacité cytotoxique des lymphocytes T.

Plusieurs études ont ainsi modifié génétiquement les lymphocytes T de façon à promouvoir leur activation. Ils ont ainsi produits des récepteurs T chimériques incorporant des domaines d'activation des molécules CD3 et CD28 dans leur régions cytoplasmiques. Ceci a permis de générer des récepteurs T déclenchant une plus grande sécrétion de cytokines que les récepteurs T n'ayant qu'une des deux molécules <sup>(51, 71, 77, 115)</sup>. Outre CD28, l'incorporation de

domaines provenant d'autres molécules de co-stimulation telles 4-1BB , ICOS et OX-40, à l'intérieur de récepteurs chimériques a également permis d'augmenter les réponses T *in vitro* (51, 86). De plus, ces modifications génétiques permettant de stimuler à la fois le TCR et de procurer les molécules de co-stimulation afin de déclencher une réponse ont permis d'obtenir des réponses anti-tumorales notables et d'améliorer les taux de guérison dans des modèles murins (22, 71). Ces manipulations des domaines de signalisation permettent ainsi d'optimiser les récepteurs des lymphocytes T afin de déclencher une réponse adéquate. Toutefois, notre stratégie implique une activation des lymphocytes T préalablement à leur injection. De plus, tel que mentionné précédemment, H7<sup>a</sup> est un Ag très immunogène capable de déclencher une forte réponse des lymphocytes T. La manipulation des domaines de signalisation ne serait donc peut-être pas la meilleure option pour augmenter le rendement des lymphocytes dans notre modèle. Resterait donc la possibilité d'augmenter les fonctions cytotoxiques de ces lymphocytes. Nos études nous ont démontré que les lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> sécrètent déjà de grandes quantités d'IFN $\gamma$  à l'intérieur du mélanome. Par contre, les lymphocytes T utilisent plusieurs autres mécanismes pour venir à bout de la croissance tumorale. Parmi ceux-ci on retrouve en outre la perforine et les granzymes, les molécules de la famille du TNF, CD95-L ainsi que le ligand induisant l'apoptose TRAIL. Plusieurs études ont démontré une amélioration de l'effet anti-tumoral par une surexpression de ces molécules (83, 87). Il serait donc possible de modifier les lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> injectés de façon à ce qu'ils expriment d'avantage et plus longuement ces molécules. La toxicité serait toutefois à vérifier étant donné que H7<sup>a</sup> ne se retrouve pas uniquement au niveau de la tumeur.

Afin d'exercer leur effet anti-tumoral, les lymphocytes T doivent être capables de rejoindre et d'infiltrer la tumeur. L'expression de chimiokines ainsi que de molécules d'adhésion vasculaire sont augmentées dans les tissus envahis par les cellules tumorales en réponse aux

signaux pro-inflammatoires. Ceci est souvent médié à travers des récepteurs reconnaissant des patrons (PPRs) à la surface des cellules dendritiques ou des cellules NK. Ces signaux entraînent la migration des lymphocytes T exprimant les récepteurs de chimiokines et molécules d'adhésion correspondants aux molécules surexprimées au site d'inflammation. Nos études nous ont déjà permis de déterminer que le couple de molécules V $\alpha$ -4 et Icam-1 est primordiale à l'effet anti-tumoral dans notre modèle. Toutefois, comme beaucoup de molécules en immunologie, les molécules d'adhésion ainsi que les chimiokines peuvent être remplacées par d'autres. Il serait donc possible de croire que d'autres molécules soient impliquées dans notre modèle et leur expression pourrait être modifiée afin d'augmenter l'infiltration T au site tumoral. Parmi les molécules candidates on retrouve la lymphotactine ainsi que CXCR-2. Une étude a démontré que l'injection intra-tumorale de la chémokine lymphotactine permettait d'augmenter l'infiltration des lymphocytes T dans des tumeurs murines et d'augmenter les réponses anti-néoplasiques <sup>(82)</sup>. De plus, il a été noté que plusieurs tumeurs, tel le mélanome, produisent la chémokine CXCL-1 <sup>(66)</sup>. Toutefois, son récepteur CXCR-2 est exprimé par très peu de lymphocytes T <sup>(34)</sup>. Il serait donc possible d'augmenter l'infiltration des T dirigés contre H7<sup>a</sup> en les modifiant pour qu'ils expriment ces récepteurs.

Les cellules tumorales peuvent générer un environnement inhibiteur pour les lymphocytes T. Parmi les facteurs inhibiteurs potentiels on retrouve en particulier le TGF $\beta$ , ainsi que l'IL-10 qui favorise les réponses de type TH2 qui sont probablement moins efficaces que les TH1 pour éliminer une tumeur <sup>(140)</sup>. De plus, des chimiokines telle CCL17 attirant les cellules de type TH2 et les cellules T régulatrices peuvent être présentes dans la tumeur et semblent corrélés avec un mauvais pronostic <sup>(85)</sup>. Les stratégies visant à bloquer ces mécanismes inhibiteurs pourraient favoriser l'élimination tumorale. Une étude à cet effet a démontré que des lymphocytes T modifiés pour exprimer une forme dominante négative du récepteur du

TGF $\beta$  étaient beaucoup plus résistants à l'inhibition par le TGF $\beta$  <sup>(15)</sup>. En effet, ces lymphocytes T demeuraient capables de proliférer et de sécréter d'importantes quantités de cytokines en réponse à l'Ag malgré la présence de TGF $\beta$  dans le milieu. Dans nos études nous avons démontré que les lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> pré-activés au moment de leur injection demeuraient capables de proliférer massivement et de sécréter d'importantes quantités d'IFN $\gamma$  au site tumoral jusqu'à 19 jours suite à leur injection. Toutefois, l'environnement inhibiteur met parfois un certain temps à se développer et il demeure possible que ceci survienne également dans notre modèle. Il serait donc capital de vérifier jusqu'à quand les lymphocytes T demeurent fonctionnels et en état de prolifération. Si de tels mécanismes se mettent en place, il serait possible de modifier les lymphocytes T de façon à ce qu'ils deviennent résistants aux facteurs inhibiteurs et soient capables d'éliminer complètement le mélanome et d'augmenter le taux de survie obtenu.

#### **4.4.3. Mise à profit des résultats portant sur l'immunodominance**

Tel que mentionné dans la section portant sur les objectifs de cette thèse, les travaux concernant le phénomène d'immunodominance étaient justifiés par deux raisons principales. Tout d'abord car ils permettaient de faire la lumière sur les caractéristiques des réponses dirigées contre différents types d'Ag : dominants versus non-dominants. En second lieu car ils permettaient d'obtenir de l'information potentiellement utilisable dans le développement de stratégies thérapeutiques faisant appel aux lymphocytes T dirigés contre des AgMIS dominants, tel les lymphocytes T utilisés dans nos essais anticancéreux. Le premier point a déjà été discuté dans la section faisant un bref rappel des résultats et ne sera donc pas abordé à nouveau dans cette section. Par contre le second n'a pas encore fait l'objet d'une très grande discussion mais est d'une grande importance pour nos travaux. C'est pourquoi il sera



maintenant abordé. Tel que proposé précédemment, un des principaux aspects de nos travaux sur lequel nous aimerions maintenant nous pencher concerne l'amélioration du traitement. Plusieurs stratégies ont déjà été proposées dans les paragraphes antérieurs mais il serait également possible de leur greffer nos résultats sur l'immunodominance. En effet, nos travaux sur l'immunodominance pourraient en partie nous aider à optimiser l'effet anti-tumoral que nous arrivons à générer avec les lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup>. Jusqu'à présent, les lymphocytes T utilisés dans nos essais étaient au jour 14 post immunisation au moment de leur injection chez les souris receveuses porteuses de tumeurs solides <sup>(122)</sup> ou leucémiques <sup>(52, 121)</sup>. Nos travaux sur l'immunodominance nous ont permis de découvrir que les lymphocytes T dirigés contre un Ag dominant tel H7<sup>a</sup> atteignaient un pic d'expansion au jour 10 post immunisation. De plus, ce pic était accompagné de fonctions effectrices maximales chez les lymphocytes T anti-dominants. Le potentiel maximal des lymphocytes T anti-H7<sup>a</sup> semble donc se situer au jour 10 post immunisation et non au jour 14 post immunisation. Il serait donc important de vérifier si, dans notre modèle, nous pouvons atteindre de meilleurs taux de survie chez nos souris atteintes de cancer en leur transférant des lymphocytes T au jour 10 de leur immunisation et non 14. Il s'agit d'une légère différence en termes de temps mais qui pourrait générer des différences notables sachant à quel point la qualité des effecteurs transférés est importante.

De plus, le but ultime des travaux de recherches en immunothérapie est de développer des stratégies applicables à l'humain. Nos études portant sur l'immunodominance ont utilisé deux AgMi : H7<sup>a</sup> et HY chez la souris. Il serait donc maintenant important de vérifier si les résultats sont également applicables à des AgMis retrouvés chez l'humain. Il a été proposé à plusieurs reprises dans cette thèse que l'AgMi HA-1 retrouvé chez l'humain serait un candidat potentiel pour le traitement de tumeurs chez l'homme. Il serait donc ici primordial d'étudier la cinétique d'apparition des marqueurs de différenciation exprimés par les

lymphocytes dirigés contre cet Ag, dans un contexte d'immunodomination. De plus, nos données apportent des explications supplémentaires permettant de mieux comprendre pourquoi les réponses dirigées contre des épitopes non-dominants ne sont pas très efficaces. Ceci renforce l'idée de générer des stratégies thérapeutiques favorisant les réponses dirigées contre des Ag dominants.

#### 4.4.4. Étude de la migration préférentielle des lymphocytes T

Nos travaux ont également soulevé plusieurs points relatifs à la migration des lymphocytes T adoptivement transférés. Contrairement aux lymphocytes T CD8 naïfs, les lymphocytes T CD8 effecteurs/mémoires activés possèdent les molécules d'adhésion (Lfa-1, Vla-4) nécessaires leur permettant d'entrer et de circuler dans tous les tissus<sup>(88)</sup>. Toutefois, leur migration et leur accumulation dans certains tissus sont en grande partie dictées par les concentrations et la conformation des ligands de ces molécules d'adhésion exprimés sur les cellules endothéliales des vaisseaux, ainsi que par les chimiokines sécrétées dans certains sites. Ainsi, les signaux que les lymphocytes T CD8 activés reçoivent de leur environnement influencent fortement leur patron de migration. Dans nos études nous avons déterminé que les molécules Vcam-1 étaient plus exprimées sur les vaisseaux tumoraux contrairement aux vaisseaux des organes normaux. Ceci facilitait l'accessibilité des lymphocytes T anti-H7<sup>a</sup> Vla-4<sup>+</sup> à la tumeur. Toutefois ces observations ont également soulevé deux importantes questions. 1) La molécule Vcam-1 est nécessaire à la migration préférentielle des lymphocytes T au site tumoral mais est-elle suffisante ? En d'autres termes, existent-ils d'autres molécules impliquées dans la migration préférentielle des lymphocytes T au site tumoral ? 2) Pourquoi la molécule Vcam-1 est-elle surexprimée à la surface des vaisseaux

tumoraux ? Parmi les suspects potentiellement responsables de cette surexpression on retrouve les macrophages. En effet, parmi les cellules immunes, les macrophages sont reconnus pour générer un environnement inflammatoire engendrant l'augmentation de certaines molécules d'adhésion (telle Vcam-1) à la surface des vaisseaux.

Les macrophages sont des composantes cellulaires essentielles au système inné. Ils sont relâchés de la moelle osseuse sous forme de monocytes immatures et circulent dans le sang avant de transmigrer dans les tissus, où ils se différencient en macrophages résidents. Ces cellules peuvent se retrouver dans la plupart des tissus et, selon le microenvironnement, acquièrent certaines caractéristiques spécialisées pouvant grandement influencer la réponse immunitaire adaptative. Les macrophages présentent donc diverses fonctions incluant la phagocytose, la présentation antigénique, le remodelage du tissu ainsi que la sécrétion de plusieurs facteurs de croissance, cytokines et enzymes.<sup>(13, 98, 106, 149)</sup> Plusieurs études ont démontré que les macrophages ont une très forte tendance à migrer au sein des tumeurs, où ils peuvent représenter jusqu'à 50% de la masse tumorale<sup>(98, 106)</sup>. Ces cellules sont ainsi souvent appelées macrophages associés à la tumeur. Ces macrophages dérivent presque entièrement des monocytes du sang périphérique recrutés dans les tumeurs de la circulation plutôt que des macrophages résidents dans les tissus sains avant le développement tumoral<sup>(214)</sup>. Plusieurs rôles possibles ont été associés à ces macrophages au niveau de la progression et de l'angiogénèse tumorale<sup>(116)</sup>. Les macrophages peuvent également exercer une cytotoxicité directe envers les cellules tumorales *in vitro* en produisant du TNF $\alpha$ , de l'oxide nitrique et en stimulant la réponse des lymphocytes via la présentation d'Ag associés à la tumeur et par la production d'IL-12<sup>(12, 13, 116)</sup>.

Plusieurs études ont donc démontré que la majorité des tumeurs attirent très efficacement les macrophages. Plusieurs chimiokines sont impliquées dans ce recrutement préférentiel des

macrophages dans les tumeurs, particulièrement RANTES (CCL5), MCP-1 (CCL2) et Mip-1 $\beta$  sécrétées en grandes quantités par plusieurs tumeurs <sup>(21, 130)</sup>, notamment le mélanome. Certaines cytokines sont également impliquées dans le recrutement des monocytes/macrophages au sein des tumeurs. Parmi celles-ci figure le VEGF <sup>(49)</sup>. Ce facteur de croissance est reconnu pour jouer un rôle prédominant au niveau de la néovascularisation. Le VEGF est donc une composante clé du processus d'angiogénèse et des niveaux élevés de cette cytokine sont caractéristiques de la majorité des tumeurs et de tissus endommagés <sup>(49)</sup>. Le rôle chémotactique du VEGF face aux macrophages a été démontré *in vitro* via l'activation du récepteur 1 du VEGF (VEGF-R1) <sup>(9, 163)</sup>. De plus, les macrophages provenant de souris VEGF-R1 KO démontrent une migration réduite en réponse au VEGF dans un modèle murin d'angiogénèse embryonnaire <sup>(75)</sup>. Également, dans une étude récente, des chercheurs ont démontré une corrélation positive entre l'expression élevée de VEGF et le nombre de macrophages infiltrant des tumeurs du sein <sup>(107)</sup>. Ceci suggère que les hauts niveaux de VEGF produits par les tumeurs peuvent attirer une grande quantité de monocytes au sein des tumeurs. De plus, sous la pression de l'environnement hypoxique généré dans la majorité des tumeurs, les macrophages ayant infiltré la tumeur vont également être amenés à produire à leur tour du VEGF. Cette production de VEGF par les macrophages va ainsi amplifier le recrutement de nouveaux macrophages, créant donc une boucle de recrutement de macrophages au site tumoral <sup>(25, 112)</sup>. Ainsi, les tumeurs ont une forte propension à attirer de grandes quantités de macrophages. De plus, plusieurs études récentes ont démontré que les macrophages sont préférentiellement attirés au niveau des zones hypoxiques au sein des tumeurs. Ces macrophages s'accumulent principalement dans les zones hypoxiques et nécrotiques sont reconnus pour être requis pour enlever les débris cellulaires nécrotiques de ces sites <sup>(108, 112, 129, 137)</sup>. Cette phagocytose des cellules nécrotiques amène ensuite l'activation des macrophages au sein des tumeurs. Ces macrophages activés vont ensuite sécréter plusieurs cytokines et chimiokines incluant : IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ , MCP-1, Mip-1 $\beta$ ,

Mip-1 $\alpha$  et CXCL8<sup>(88)</sup>. Ces dernières peuvent ensuite influencer le recrutement des lymphocytes T CD8 activés de deux façons :

La sécrétion de chimiokines : Les chimiokines relâchées par les macrophages phagocytaires activés recrutent des cellules T CD8 activées au site tumoral. Le rôle des chimiokines telles MCP-1, Mip-1 $\beta$ , Mip-1 $\alpha$  et CXCL-8 dans le recrutement cellulaire se divise en deux temps : Tout d'abord, elles agissent sur les lymphocytes pendant qu'ils roulent sur les cellules endothéliales vasculaires au site d'inflammation. Ceci convertit le roulement en une liaison stable, déclenchant un changement de conformation dans les molécules d'adhésion (sélectines et intégrines). Ceci permet aux lymphocytes de rouler sur les cellules endothéliales et de traverser la paroi des vaisseaux. En second lieu, les chimiokines dirigent la migration des lymphocytes T CD8 activés le long d'un gradient de molécules de chimiokines liées à la matrice extracellulaire et à la surface des cellules endothéliales. Ce gradient augmente la concentration en allant vers le site d'inflammation. À ce niveau, il est important de mentionner que certaines chimiokines relâchées par les cellules tumorales elles-mêmes peuvent également attirer les lymphocytes T CD8 activés au lit tumoral. Parmi celles-ci on retrouve RANTES et Mip-1 $\beta$ . Ainsi, les macrophages viennent amplifier le recrutement de lymphocytes T CD8 activés au lit tumoral<sup>(102, 114, 222)</sup>.

A) Sécrétion de cytokines : le TNF $\alpha$ . Les chimiokines ont donc été démontrées comme étant très efficaces pour recruter les lymphocytes T au lit vasculaire tumoral. Toutefois, l'entrée au site tumoral est grandement favorisée et aidée par la perméabilisation et l'activation de l'endothélium par certaines cytokines. En ce sens, plusieurs équipes ont démontré que le TNF $\alpha$  sécrété par les macrophages activés est une molécule clé capable de perméabiliser et d'activer l'endothélium vasculaire. Cette activation de l'endothélium par le

TNF $\alpha$  se manifeste par l'augmentation de molécules d'adhésion (Icam-1 et Vcam-1) à la surface des cellules endothéliales, facilitant ainsi l'adhérence des lymphocytes T CD8 activés circulant qui possèdent les ligands (Vla-4 et Lfa-1) capables d'interagir avec ces molécules d'adhésion sur l'endothélium. De plus, le TNF $\alpha$  modifie également la conformation des intégrines à la surface des cellules endothéliales. Ce changement de conformation favorise et permet une adhérence ferme des lymphocytes T CD8 activés. Finalement, ceci facilite l'extravasation des cellules T CD8 activées au sein de la tumeur<sup>(145)</sup>.

Ces études démontrent donc clairement que les tumeurs favorisent le recrutement massif de macrophages. In situ, l'environnement tumoral favorise l'activation des macrophages infiltrant par la phagocytose des cellules nécrotiques par ces derniers. Une fois activés, les macrophages sont reconnus pour sécréter des chimiokines et cytokines attirant les cellules T CD8 activées et facilitant leur transmigration au sein de la tumeur. Ceci soulève donc l'hypothèse que les macrophages sont probablement recrutés en grands nombres au niveau du mélanome dans nos travaux, particulièrement au sein des tumeurs nécrotiques. Localement, la nécrose des cellules de mélanome favorise leur activation. En effet, la grande quantité de cellules tumorales nécrotiques engendre la phagocytose par les macrophages. Cette activation mène à la sécrétion de quantités importante de TNF $\alpha$  et de chimiokines. Ceci va donc favoriser le recrutement et l'entrée de nombreux lymphocytes T CD8 activés au sein de la tumeur. Par contre, les organes normaux ne sont pas reconnus pour sécréter de grandes quantités de chimiokines inflammatoires ou de VEGF (sauf en cas de blessure). Ces derniers ne recrutent donc pas massivement de macrophages. De plus, les organes sains ne comportent habituellement pas de cellules nécrotiques. Ainsi, localement, les macrophages ne sont pas activés et ne sécrètent ainsi pas les chimiokines et cytokines nécessaires pour activer l'endothélium vasculaire et ne favorisent pas le recrutement et l'entrée massive de cellules T CD8 activées. Il serait vraiment intéressant de vérifier cette hypothèse. Ceci

permettrait peut-être de moduler et même d'amplifier l'infiltration des lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> au niveau du mélanome.

#### 4.4.5. Étude de la mémoire immunologique générée

La génération d'une mémoire immunologique dans le cadre du traitement du cancer peut s'avérer très importante afin de minimiser les possibilités de rechutes. En effet, les lymphocytes T mémoires présentent plusieurs caractéristiques leur permettant de répondre plus rapidement et plus efficacement à un Ag. Tout d'abord, lorsque des lymphocytes T naïfs se différencient en cellules T mémoires, leur profil d'expression génique se modifie par des changements au niveau de la structure de la chromatine et le programme de facteurs de transcription actifs <sup>(2)</sup>. Par exemple, les gènes codant pour l'IFN $\gamma$  ainsi que les molécules cytotoxiques telle la perforine et les granzymes deviennent constitutivement exprimés chez des lymphocytes T mémoires <sup>(7, 62, 183, 195, 215)</sup>. Malgré le fait que la synthèse de ces protéines survienne suite au contact antigénique, les niveaux élevés de l'ARNm permet aux lymphocytes T mémoires de produire d'importantes quantités de ces protéines très rapidement <sup>(7, 90, 127, 195)</sup>. En second lieu, les lymphocytes T mémoires expriment un patron de protéines de surface impliquées dans la chimiotaxie et l'adhésion cellulaire leur permettant de s'introduire dans les tissus et organes non-lymphoïdes et les muqueuses <sup>(126)</sup>. Ceci permet aux lymphocytes T mémoires de patrouiller les tissus périphériques potentiellement à risque d'être infectés et où peut survenir une récurrence tumorale. Il y a quelques années, les populations de lymphocytes T mémoires ont été subdivisées en deux catégories : 1) les lymphocytes T mémoires centrales (TCM) et 2) les lymphocytes T mémoires effecteurs (TEM). Ces deux catégories ont été proposées à partir de différences phénotypiques, de différences au niveau de la localisation physiologique ainsi que de

différences fonctionnelles relatives à chaque groupe. Ainsi, il est maintenant reconnu que les lymphocytes TCM se retrouvent principalement dans les organes lymphoïdes; alors que les lymphocytes TEM se retrouvent dans les tissus périphériques<sup>(119, 162, 208)</sup>. Phénotypiquement, ces deux groupes de lymphocytes T mémoires se distinguent par l'expression des molécules CD62L et CCR7<sup>(162)</sup>. CD62L est reconnu comme étant une L-sélectine interagissant avec l'addressine exprimée sur les veinules endothéliales des ganglions responsable de l'attachement et du roulement<sup>(5, 205)</sup>. Pour sa part, CCR7 se lie aux chimiokines CCL19 et CCL21 présentes sur la face luminale des cellules endothéliales des ganglions lymphatiques, causant une adhésion ferme et l'initiation de l'extravasation<sup>(28)</sup>. Ainsi, les cellules TCM ont le phénotype CD62L<sup>hi</sup>CCR7<sup>+</sup>, alors que les lymphocytes TEM ont le phénotype CD62L<sup>lo</sup>CCR7<sup>-</sup>. De plus, lors d'études fonctionnelles portant sur les deux sous-populations de lymphocytes T mémoires réalisées par le groupe du Dr Lanzavecchia, une dichotomie intéressante a été notée<sup>(162)</sup>. En effet, grâce à des études *in vitro*, les chercheurs ont observé que les lymphocytes T effecteurs mémoires avaient une capacité de prolifération importante et présentaient une activité cytotoxique directe *ex vivo* caractérisée par une sécrétion rapide et importante d'IFN $\gamma$  et un contenu élevé en perforine. Par contre, les lymphocytes TCM proliféraient de façon importante suite à une stimulation antigénique mais n'exerçaient pas de fonctions effectrices directes *ex vivo*. De plus, le groupe du Dr LeFrancois a également mis en évidence les différences fonctionnelles relatives à ces deux sous-populations dans des modèles murins d'infections virales. Ainsi, à la suite d'une infection au virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et à *Listeria monocytogenes* (LM), ce groupe a montré que les lymphocytes T CD8 retrouvés dans les organes non lymphoïdes (TEM) avaient une activité cytolytique et une production d'IFN $\gamma$  importante, alors que les lymphocytes T CD8 mémoires centrales se trouvant dans les organes lymphoïdes produisaient un peu d'IFN $\gamma$  mais n'étaient pas cytotoxiques<sup>(119)</sup>.



Il existe donc deux sous-populations de cellules T mémoires mises en évidence par plusieurs études *in vitro* et modèles d'infections virales. Ces populations réalisent différentes fonctions immunitaires, se retrouvant à différents endroits du corps et ont différents phénotypes. La caractérisation de la mémoire générée dans le cadre du traitement du cancer est donc très importante. Nous avons abordé cette question dans le cadre de nos travaux. Ceci nous a permis d'établir que deux facteurs régissent la persistance de cellules mémoires dans notre modèle : 1) L'expression de l'Ag cible ainsi que 2) la production de nouveaux lymphocytes T par le thymus. Toutefois, nous n'avons pas procédé à la caractérisation phénotypique et à l'étude fonctionnelle des lymphocytes T mémoires générés. Sachant que différentes populations de lymphocytes T mémoires remplissent différentes fonctions, il serait important de déterminer de quel type de mémoire il est possible de bénéficier dans notre modèle. Une étude approfondie des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires serait donc très profitable.

## **5. CONCLUSION**

## 5. CONCLUSION

Parmi les stratégies à l'étude en immunothérapie du cancer, le transfert adoptif de lymphocytes T dirigés contre des AgMIs figure encore dans les premiers rangs en termes d'efficacité anti-tumorale. Les travaux antérieurs réalisés par notre équipe ont permis d'établir que le transfert adoptif de cellules T CD8 spécifiques à l'AgMi H7<sup>a</sup> permet d'éliminer extrêmement efficacement des cellules leucémiques EL4, H7<sup>a</sup>-positives, chez 60% des receveurs exprimant H7<sup>a</sup> de façon ubiquitaire. Ces résultats obtenus avec cette tumeur hématopoïétique ont suscité énormément d'enthousiasme au sein de notre groupe et nous ont amené à pousser d'avantage nos recherches portant sur l'efficacité anti-tumorale de ces lymphocytes T anti-H7<sup>a</sup>. Nous avons donc entrepris, dans le cadre des projets décrits à l'intérieur de cette thèse, de répondre à trois questions fondamentalement importantes en immunothérapie du cancer. Premièrement, les lymphocytes T dirigés contre l'AgMi immunodominant H7<sup>a</sup>, si efficaces dans un contexte de leucémie, sont-ils également aptes à enrayer une tumeur solide déjà bien établie ? Relativement à cette question, nos études nous ont permis de répondre par l'affirmative. En effet, lorsqu'ils sont transférés chez un hôte porteur d'un mélanome, les lymphocytes T anti-H7<sup>a</sup> éradiquent entièrement la tumeur solide chez proportion importante des receveurs traités. Nos études nous ont également permis d'établir la succession événements permettant d'en arriver à une élimination du mélanome. Ainsi, suite à leur injection, les cellules T envahissent rapidement et massivement le site tumoral. Ces lymphocytes vont ensuite sécréter, au niveau de la tumeur, de grandes quantités d'IFN $\gamma$  de façon à augmenter de significativement les concentrations locales de cette cytokine. L'augmentation locale de la concentration d'IFN $\gamma$  a ensuite permis d'induire une augmentation de l'expression des molécules du CMHI à la surface des cellules de mélanome qui, en absence d'attaque, en expriment habituellement très peu. Finalement, l'augmentation

des molécules du CMH I entrainera la sécrétion de molécules cytotoxiques au niveau de la tumeur. Ceci aura donc pour effet d'éliminer la tumeur par cytotoxicité directe et par destruction de l'angiogénèse tumorale. Cette première partie du travail nous a donc permis d'établir que des lymphocytes T dirigés contre un AgMi immunodominant tel H7<sup>a</sup> arrivent à éliminer une tumeur solide très maligne. Ces travaux nous ont également permis de caractériser les étapes menant à cette élimination.

Malgré le fait que ce n'était pas le but de la présente étude, l'absence de toxicité envers les cellules normales de souris receveuses B10 a suscité beaucoup d'intérêt et a ouvert la porte à une question de la plus haute importance en immunothérapie du cancer utilisant comme traitement un transfert adoptif de lymphocytes T : pourquoi les lymphocytes T dirigés contre un Ag exprimé à la fois sur les cellules normales de l'hôte et sur les cellules néoplasiques n'éliminent que les cellules tumorales sans pour autant causer de dommages aux tissus normaux? Sans répondre de façon complète à cette question, nos travaux nous ont néanmoins permis d'établir une ébauche de réponse ouvrant la porte à de nombreux nouveaux projets. Ainsi, tel que mentionné précédemment, l'élimination tumorale était caractérisée par une infiltration massive et sélective des lymphocytes au site tumoral, laquelle était accompagnée d'une relâche importante d'IFN $\gamma$  locale. Par contre lorsque nous avons vérifié ce qui se passait dans les organes normaux, nous avons observé une situation toute autre qui pourrait en partie expliquer l'absence de dommages aux tissus sains dans notre modèle. Donc, contrairement à la tumeur, aucune accumulation marquée n'est survenue dans les organes normaux. Les concentrations locales d'IFN $\gamma$  sont donc demeurées faibles à ces endroits. Ceci fut accompagné d'un maintien de l'expression faible des molécules de CMHI sur les cellules saine et d'une absence de dégranulation locale de molécules cytotoxiques par les quelques lymphocytes T présents. L'IFN $\gamma$  semble donc capable de déclencher toute une

cascade d'événements menant ultimement à l'élimination des cellules se trouvant dans son entourage. Ainsi, l'absence d'IFN $\gamma$  dans les organes normaux semble donc les protéger. Cette observation soulève donc une seconde énigme : quels signaux pourraient être à l'origine de cette migration et accumulation préférentielle des lymphocytes au site tumoral plutôt que dans les organes normaux. Nos travaux nous ont permis de déterminer que l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion sur les vaisseaux néoplasiques (VCAM-1) et sur les lymphocytes T (VLA-4) jouait un rôle clé dans cette accumulation préférentielle. Reste à savoir pourquoi ces molécules d'adhésion sont-elles plus exprimées à cet endroit. Tel que suggéré précédemment, les signaux inflammatoires liés à l'établissement de la tumeur seraient ici de bons suspects.

La seconde question abordée dans le cadre de ce doctorat concernait le phénomène d'immunodominance caractéristique de nombreuses réponses immunitaires orchestrées par les lymphocytes T. Nous avons en effet voulu savoir quelles étaient les caractéristiques d'une réponse dirigée contre un Ag dominant (tel H7<sup>a</sup>), comparativement à une réponse contre un Ag non dominant (tel HY). Dans cette optique, l'analyse du transcriptome entier au jour 14 post immunisation ainsi que l'analyse temporelle de l'expansion et des marqueurs de différenciation exprimés par les lymphocytes T nous ont permis de faire plusieurs découvertes très intéressantes. Tout d'abord, l'étude du patron de gènes exprimés par les deux populations de lymphocytes T nous a permis de découvrir que les différences étaient extrêmement restreintes entre les lymphocytes T dirigés contre un Ag dominant et les lymphocytes T dirigés contre un Ag non-dominant. Seulement quelques gènes présentaient des divergences au niveau de leur expression entre les deux populations de lymphocytes T CD8. De plus, l'analyse temporelle de l'expansion et des marqueurs de différenciation nous a permis de découvrir que, malgré le fait que le programme de différenciation des lymphocytes T

spécifiques à H7<sup>a</sup> et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques à HY soient très similaires, ils ne progressent pas de façon simultanée. Les lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> atteignent leur pic de différenciation très rapidement comparativement aux lymphocytes T dirigés contre HY. Également, la phase d'expansion et le développement des fonctions effectrices se produit de façon synchrone chez les lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> contrairement aux lymphocytes T anti-HY. Ces résultats suggèrent que les lymphocytes dirigés contre un Ag dominant tel H7<sup>a</sup> seraient de meilleurs effecteurs comparativement aux lymphocytes T dirigés contre un Ag non-dominant tel HY. C'est pourquoi il est grandement favorable de développer des stratégies anticancéreuses faisant appel à des lymphocytes T spécifiques à des épitopes dominants.

Ces études nous également permis de faire ressortir l'importance de faire des analyses temporelles complètes et non juste ponctuelles. En effet, si nous avons seulement effectué les études au jour 14 post immunisation, nous serions passé à côté de différences importantes permettant aujourd'hui d'apporter une certaine lumière sur le phénomène d'immunodominance. Des différences qui on été observables seulement lors de l'étude complète des jours 7 à 100 post immunisation. Cette tendance à étudier les phénomènes dans leur ensemble et non seulement de façon ponctuelle semble devenir de plus en plus une tendance en recherche. Ceci est possible grâce à l'émergence de nouvelles technologies telle les tétramères ou encore à l'imagerie *in vivo*.

La troisième question à laquelle nous avons entrepris de répondre dans cette thèse concernait la persistance à long terme ainsi que la capacité proliférative des lymphocytes T spécifiques à H7<sup>a</sup> capables d'éliminer le mélanome. En effet, nous avons voulu savoir si des lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> étaient capables de proliférer suite à leur transfert et si ces mêmes lymphocytes pouvaient générer une mémoire immunologique protectrice. Nos

travaux nous ont ici permis de découvrir que l'accumulation préférentielle au site tumoral des lymphocytes T dans notre modèle était accompagnée d'une prolifération rapide et importante au site tumoral. Les lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> sont donc capables de proliférer suite à leur transfert. Ceci soulève encore une fois une question importante ayant le potentiel de générer de nouveaux projets : quels signaux gouvernent cette prolifération intensive des lymphocytes T dirigés contre H7<sup>a</sup> au site tumoral? Finalement, nos études portant sur la mémoire immunologique nous ont permis de découvrir que les lymphocytes T spécifiques à H7<sup>a</sup> pouvaient persister à long terme suite à l'élimination tumorale. Toutefois, cette persistance à long terme était dictée par la fonction thymique et l'expression de l'Ag.

**CONTRIBUTION AUX ARTICLES**



## 6. Contribution aux articles

### Article 1 :

Marie-Christine Meunier, Jean-Sébastien Delisle, Julie Bergeron, Vincent Rineau, Chantal Baron, Claude Perreault. **T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors.** Nature Medecine, volume 11 (number 11), 2005.

Contribution à cette publication: Pour cette première publication, Je (Marie-Christine Meunier) suis le premier auteur et ma contribution est majeure. J'ai effectué chacune des expériences et participé à l'ensemble des travaux d'élaboration du projet ayant mené à cet article. Jean-Sébastien Delisle m'a aidé à réaliser chacune des greffes de moelle osseuse présentées dans cet article. Julie Bergeron m'a aidé à réaliser les expériences préliminaires nécessaires à l'élaboration du projet sous-jacent à cet article. Vincent Rineau m'a fourni un support technique lors des essais de cytotoxicité. En collaboration avec mon directeur de recherche, j'ai également largement participé à l'analyse de l'ensemble des résultats générés et à la rédaction du manuscrit. Finalement, madame Chantal Baron m'a aussi soutenue et aidé dans la rédaction du manuscrit et dans la réalisation des essais de cytotoxicité.

### Article 2 :

Chantal Baron, Marie-Christine Meunier, Étienne Caron, Caroline Côté, Mark J. Cameron, David J. Kelvin, Richard LeBlanc, Vincent Rineau and Claude Perreault. **Asynchronous differentiation of CD8 T cells that recognize dominant and cryptic antigens.** The Journal of Immunology, volume 177, 2006

Contribution à cette publication : Pour cette seconde publication, où je suis second auteur, j'ai (Marie-Christine Meunier) réalisé les études séquentielles de flux cytométrie (marquages CD43, CD127, CD62L et KLRG1) sur des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques à l'AgMi dominant H7<sup>a</sup> et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques à l'AgMi HY. Ce travail représente environ 50% des travaux réalisés dans cette publication (3 figures). J'ai également fourni un apport intellectuel en ce qui a trait à l'analyse et à l'interprétation des résultats relatifs aux études que j'ai réalisées dans cette publication.

Article 3 :

Marie-Christine Meunier, Chantal Baron, Claude Perreault. **Two host factors regulate persistence of H7<sup>a</sup>-specific T cells injected in tumor-bearing mice.** Prêt pour soumission, septembre 2006.

Contribution à cette publication : Je (Marie-Christine Meunier) suis le premier auteur de cet article pour lequel ma contribution est majeure. J'ai effectué seule chacune des expériences et participé à l'ensemble des travaux d'élaboration du projet ayant mené à cet article. En collaboration avec mon directeur de recherche, j'ai également largement participé à l'analyse des résultats et à la rédaction de cet article. Finalement, madame Chantal Baron m'a aussi soutenue et aidé dans la rédaction du manuscrit.

Ces trois articles ont été le fruit des travaux réalisés dans le cadre de mon doctorat

## **7. RÉFÉRENCES**

1. Adams, G.P., Weiner, L.M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotech.* 2005; 23: 1147-1157.
2. Agarwal, S., Rao, A. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity* 1998; 9: 765-775.
3. Anisimov, V.N., Ukraintseva, S.V., Yashin, A.I. Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans. *Nature Reviews Cancer* 2005; 5: 807-818.
4. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 2001; 411:385-9.
5. Arbones, M.L. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* 1994; 1: 247-260.
6. Bachmann, M.F., Barner, M., Viola, A., Kopf, M. Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 291-299.
7. Bachmann, M. F., Beerli, R.R., Agnellini, P. Wolint, P., Schwarz, K., Oxenius, A. Long-lived memory CD8<sup>+</sup> T cells are programmed by prolonged antigen exposure and low levels of cellular activation. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36: 842-854.
8. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392: 245-252.
9. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA. Migration of human monocytes in response to VEGF is mediated via the VEGF receptor flt1. *Blood.* 1996; 87: 3336-3343.
10. Barouch, D. H., J. Kunstman, M. J. Kuroda, J. E. Schmitz, S. Santra, F. W. Peyerl, G. R. Krivulka, K. Beaudry, M. A. Lifton, D. A. Gorgone, D. C. Montefiori, M. G. Lewis, S. M. Wolinsky, and N. L. Letvin. Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 2002; 415: 335-339.
11. Berkhoff, E. G., A. C. Boon, N. J. Nieuwkoop, R. A. Fouchier, K. Sintnicolaas, A. D. Osterhaus, and G. F. Rimmelzwaan. A mutation in the HLA-B\*2705-restricted NP383-391 epitope affects the human influenza A virus-specific cytotoxic T-lymphocyte response in vitro. *J. Virol.* 2004; 78: 5216-5222.
12. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* 2002; 196: 254-265.
13. Blankestijn T, Quin ZH, Uberta K. Tumor suppression after tumor cell-targeted tumor necrosis factor alpha gene transfer. *J. Exp. Med.* 1991; 173: 1047-1052.

14. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:371-80.
15. Bollard, C.M., Rossig, C., Huls, M.H., Massague J., Brenner, M.K., Heslop, H.E., Rooney, C.M. Using a TGF-beta-related tumor immune evasion strategy to enhance anti-tumor immunity. *Blood* 2002; 99: 3179-3187.
16. Bonnet, D., Warren, E.H., Greenberg, P.D., Riddell, S.R. CD8 minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones eliminates human acute myeloid leukemia stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 8639-8644.
17. Bookman, M.A., Darcy, K.M., Pearson, D., Boothby, R.A., Horowitz, I.R. Evaluation of monoclonal humanized anti-her2 antibody, Trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of her2: a phase II trial of the gynaecologic oncology group. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 283-290.
18. Boon, T., Cerottini, J.C., Van-der-Eynde, B., Van-der-Bruggen, P., Van-Pel, A. Tumour antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12: 337-365.
19. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:175-208.
20. Borrow, P. CD40L-deficient mice show deficits in antiviral immunity and have an impaired memory CD8 CTL response, *J. Exp. Med.* 1996; 183: 2129-2142.
21. Bottazzi B, Walter S, Govoni D, Colotta F. Monocyte chemotactic cytokine gene transfer modulates macrophage infiltration, growth, and susceptibility to IL-2 therapy of a murine melanoma. *J. Immunol.* 1992; 148: 1280-1285.
22. Brentjens, R.J. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukine-15. *Nature Med.* 2003; 9: 279-286.
23. Brochu, S., Rioux-Massé, B., Roy, J., Perreault, C. Massive activation-induced cell death of alloreactive T cells with apoptosis of bystander postthymic T cells prevents immune reconstitution in mice with graft-versus-host disease. *Blood* 1999; 94: 390-400.
24. Burke B, Giannoudis A, Corke KP. Hypoxia induced gene expression in human macrophages: implication for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am. J. Pathol.* 2003; 163: 1233-1243.
25. Burke B, Tang N, Corke KP. Expression of HIF-1alpha by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. *J. Pathol.* 2002; 196: 204-212.

26. Caigan DU, Ninping F, Hongnan J. Macrophages play a critical role in the anti-tumor activity of Virulizin. *Int. J. Oncol.* 2003; 23: 1341-1346.
27. Campbell, D.J., Kim, C.H., Butcher, E.C. Separable effector T cell populations specialized for B cell help or tissue inflammation. *Nat. Immunol.* 2001; 2: 876-881.
28. Campbell, J.J. SLC, a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3b receptor CCR7. *J. Cell Biol.* 1998; 141: 1053-1059.
29. Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* 2001; 1: 118-129.
30. Chao, N.F. Minors come of age: minor histocompatibility antigens and graft-versus-host disease. *Biol. Blood and Marrow Transpl.* 2004; 10: 215-223.
31. Charo, J. Bcl-2 overexpression enhances tumor-specific T cell survival. *Cancer Res.* 2005; 65: 2001-2008.
32. Chen, A.I. OX40-ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell:T-cell interactions., *Immunity* 1999; 11: 689-698.
33. Chen, L., Linsey, P.S., Hellstrom, K.E. Costimulation of T cells for tumour immunity., *Immunol. Today* 1993; 14: 483-486.
34. Chuntharapai, A., Lee, J., Hebert, C.A., Kim, K.J. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes. *J. Immunol.* 1994; 153: 5682-5688.
35. Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L., Raveth, J.V. Inhibitory Fc receptors modulated in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Medicine* 2000; 6: 443-446.
36. Cohen, E.P., Kim, T.S. Neoplastic cells that express low levels of MHC class I determinants escape host immunity. *Semin. Cancer Biol.* 1994; 5: 419-428.
37. Collins, R.H., Spilberg, O., Nemunatis, J. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapse malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Onc.* 1997; 15: 433-444.
38. Colucci, F., Caligiuri, M.A., Di Santo, J.P. What does it take to make a natural killer? *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 413-423.
39. Cromme, F.V., Airey, J., Heemels, M.T., Ploegh, H.L., Keating, P.J., Stern, P.L., Meijer, C.J.L.M., Walboomers, J.M.M. Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas., *J. Exp. Med.* 1994; 179: 335-340.

40. Darmon, A.J., Nicholson, D.W., Bleackley, R.C. Activation of the apoptotic protease cyp32 by cytotoxic T cell derived granzyme B. *Nature* 1995; 377: 446-448.
41. Das, V., Nal, B., Dujeancourt, A., Thoulouze, M.I., Galli, T., Roux, P., Dautry-Varsat, A., Alcover, A. Activation-induced polarized recycling targets T cell antigen receptors to the immunological synapse; involvement of SNARE complexes. *Immunity*. 2004; 20: 577-588.
42. Debatin, KM, Krammer, PH. Resistance to APO-1 (CD95) induced apoptosis in T-ALL is determined by a bcl-2 independent anti-apoptotic program. *Leukemia*. 1995; 9: 815-120.
43. Dotti, G. Human cytotoxic T lymphocytes with reduced sensitivity to Fas-induced apoptosis. *Blood* 2005; 105: 4677-4684. Leukocyte infusions as a strategy to treat chronic myelogenous leukemia patients undergoing HLA-identical sibling marrow transplantation. *Blood* 1999, 94: 434-441.
44. Drobyski, W.R., Hessner, M.J., Klein, J.P., Taylor, C.A. T-cell depletion plus salvage immunotherapy with donor leukocyte infusions as a strategy to treat chronic phase myelogenous leukemia patients undergoing HLA-identical sibling marrow transplantation. *Blood*, 1999; 94: 434-441.
45. Duan, H., Orth, K., Chinnaiyan, A.M., Dixit, V.M. ICE-LAP6, a novel member of the ice gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 16720-16724.
46. Eaton, D., Gilham, D.E., O'Neil, A., Hawkins, R.E. Retroviral transduction of human peripheral blood lymphocytes with Bcl-Xl promotes in vitro lymphocyte survival in proapoptotic conditions. *Gene Ther.* 2002; 9: 527-535.
47. Eden, P.A., Christianson, G.J., Fontaine, P., Wettstein, P.J., Perreault, C., Roopenian, D.C. Biochemical and immunogenetic analysis of an immunodominant peptide (B6dom1) encoded by the classical H7 minor histocompatibility locus. *J. Immunol.* 1999; 162: 4502-4510.
48. Erickson, A. L., Y. Kimura, S. Igarashi, J. Eichelberger, M. Houghton, J. Sidney, D. McKinney, A. Sette, A. L. Hughes, and C. M. Walker. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 2001; 15: 883-895.
49. Ferrara N, Davis T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endoc. Rev.* 1997; 18: 4-25.

50. Finney, H.M., Lawson, A.D., Bebbington, C.R., Weir, A.N. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J.Immunol.* 1998; 161: 2791-2797.
51. Finney, H.M., Akbar, A. N., Lawson, A.D. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD 137 in series with signals from TCR zeta chain. *J. Immunol.* 2004; 172: 104-113.
52. Fontaine P, Roy-Proulx G, Knafo L, Baron C, Roy DC, Perreault C. Adoptive transfer of T lymphocytes targeted to a single immunodominant minor histocompatibility antigen eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat Med* 2001; 7:789-94.
53. Fu, T.M., Donnelly, J.J. Protective cellular immunity:cytotoxic T lymphocyte responses against dominant and recessive epitope of influenza virus nucleoprotein induced by DNA immunization. *J. Virol.* 1997; 71: 2715-2721.
54. Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Perez-Villar, J.J., Lopez-Botet, M., Duggan-Keen, M., Stern, P.L. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours., *Immunol. Today.* 1997; 18: 89-95.
55. Gattinoni, L., Klebanoff, C.A., Palmer, D.C., Wrzesinski, C., Ferstann, K., Yu, Z., Finkelstein, S. E., Theoret, M.R., Rosenberg, S.A., Restifo, N.P. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J. Clin. Invest.* 2005; 115 (6): 1616-1626.
56. Gilboa, E., The promise of cancer vaccines. *Nat. Rev. Cancer.* 2004; 4: 401-411.
57. Girardi, M., Oppenheim, D.E., Steele, C.R., Lewis, J.M. Regulation of cutaneous malignancy by T cells. *Science* 2001; 294: 605-609.
58. Godfrey, D.I., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., Smyth, M.J., Van Kaer, L. NKT cells: what's in a name. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4: 231-241.
59. Gorelik, L., Flavell, RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor- $\beta$  signaling in T cells., *Nat. Med.* 2001; 7: 1118-1122.
60. Goulmy, E. Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol. Reviews* 1997; 157: 125-140.
61. Gramaglia, I., Weinberg, A.D., Lemon, M., Croft, M. OX40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J. Immunol.* 1998; 161: 6510-6517.



62. Grayson, J.M., Murali-Krishna, K., Altman, J.D., Ahmed, R. Gene expression in antigen-specific CD8 T cells during viral infection. *J. Immunol.* 2001; 166: 795-799.
63. Greenfield, A., Scott, D., Pennisi, D. An HY-Db epitope is encoded by a novel mouse Y chromosome gene. *Nat. Genet.* 1996; 14: 474-478.
64. Griffith, T. S., Brunner, T., Fletcher, DR., Ferguson, TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Sciences.* 1995; 270: 1189-1192.
65. Groh, V., Wu, J., Yee, C., Spies, T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature.* 2002; 419: 734-738.
66. Haghnegahdar, H. The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA-GRO proteins in melanoma. *J. Leukoc. Biol.* 2000; 67: 53-62.
67. Hahn, W.C., Weingerg, R.A., Modeling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2: 331-341.
68. Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreiber, M., French, L.E., Schreiber, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J.C. Tschopp, J. Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*, 1996; 274: 1363-1366.
69. Hambach, L., Goulmy, E. Immunotherapy of cancer through targeting of minor histocompatibility antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 2005; 17: 202-210.
70. Hanson, H.L., Donermeyer, D.L., Ikeda, H., Shankaran, V., Schreiber, R.D. Eradication of establish tumors by CD8 T cell adoptive immunotherapy. *Immunity* 2000; 13: 265-276.
71. Haynes, N.M. Single-chain antigen recognition receptors that co-stimulate potent rejection of establish experimental tumors. *Blood* 2002; 100: 3155-3163.
72. Hellstrom, I., Ledbetter, J.A., Scholler, N., Ye, Z., Goodman G., Pullman, J., Hellstrom, K.E. CD3-mediated activation of tumor-reactive lymphocytes from patients with advanced cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2001; 98: 6783-6788.
73. Heinzerling, L., Dummer R., Pavlovic, J., Schultz, J., Burg, G., Moelling, K. Tumor regression of human and murine melanoma after intratumoral injection of IL-12-encoding plasmid DNA in mice. *Exp. Dermatol.* 2002; 11: 232-240.
74. Heslop, H.E., Li, C., Smith, C.A., Rooney, CéM. Long-term restoration of immunity against EBV infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat. Medicine* 1996; 2: 551-555.

75. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 9349-9354.
76. Hodi, F.S., Mihm, M., Soiffer, R., Haluska, F., Butler, M., Seiden, M., Dranoff, G. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100: 4712-4717.
77. Hombach, A. Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28-CD3 signaling receptor molecule. *J. Immunol.* 2001; 167: 6123-6131.
78. Homey, B., Muller, A., Zlotnik, A. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2: 175-184.
79. Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., Goldman, J.M., Speck, B. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75: 555-562.
80. Huang, A.Y.C., Bruce, A.T., Pardoll, D.M., Levitsky, H.I. Does B7-1 expression confer antigen-presenting cell capacity to tumors in vivo?, *J. Exp. Med.* 1996; 183: 769-776.
81. Huang, A.Y., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D., Levitsky, H. Role of bone marrow derived cells in presenting MHC class-I restricted tumor antigens. *Science* 1994; 264: 961-965.
82. Huang, H., Li, F., Gordon, J.R., Xiang, J. Synergistic enhancement of antitumor immunity with adoptively transferred tumor-specific CD8 T cells and intratumoral lymphotactin transgene expression. *Cancer Res.* 2002; 62: 2043-2051.
83. Hwu, P. Functional and molecular characterization necrosis factor-alpha cDNA for the gene therapy of cancer in humans. *J. Immunol.* 1993; 150: 4104-4115.
84. Ibe, S., Quin, Z., Schuler, T., Preiss, S., Blankenstein, T. Tumor rejection by disturbing stroma cell interactions. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 1549-1559.
85. Iellem, A. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 847-853.
86. Imai, C. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004; 18: 676-684.
87. Itoh, Y. Characterization of tumor-necrosis-factor-gene-transduced tumor-infiltrating lymphocytes from ascetic fluid of cancer patients: analysis of cytolytic activity, growth rate,

- adhesion molecule expression and cytokine production. *Cancer Immunol. Immunother.* 1995; 40: 95-102.
88. Janeway, Travers, Walport, Shlomchik. *Immunobiology*, 6<sup>th</sup> edition. 2003; pp.60-95.
89. Jiang, J., Xu, N., Deng, H., Li, M., Nilsson-Ehle, P. Treatment of advanced gastric cancer by chemotherapy combined with autologous cytokine-induced killer cells. *Anticancer Res.* 2006; 26: 2237-2242.
90. Kaech, S.M., Ahmed, R. Memory CD8 T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. *Nature Immunol.* 2001; 2: 415-422.
91. Kaech, S. M., Tan, J.T., Wherry, E.J., Konieczny, B.T., Surh, C.D., Ahmed, R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat. Immunol.* 2003; 4: 1191-1198.
92. Kaech, M., Wherry, E.J., Ahmed, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature Reviews* 2002; 2: 251-260.
93. Kageyama, S., Eisen, H.N. Variations in the number of peptide mhc class I complexes required to activate cytotoxic T cell responses. *J. Immunol.* 1995; 154: 567-576.
94. Kao J, Ryan J, Brett G. Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tuor derived polypeptide that activates host-response mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 20239-20247.
95. Kaplan, DH., Shankaran, V., Stockert, E., Aguet, M., Old, LJ., Schreiber, RD. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 7556-7561.
96. Karanikas, V., Lurquin, C., Colau, D., Van Baren, N., De Smet, C., Lethé, B., Connerotte, T., Corbière, V., Demoitié, M., Liénard, D., Coulie, P.G. Monoclonal anti-MAGE-3 CTL responses in melanoma patients displaying tumor regression after vaccination with a recombinant canarypox virus. *J. Immunol.* 2003; 171: 4898-4904.
97. Kedl, R. M., Kappler, J.W., Marrack, P. Epitope dominance, competition and T cell affinity maturation. *Curr. Opin. Immunol.* 2003; 15: 120-127.
98. Kelly, PM, Davisom, RS, Bliss E, McGee JO. Macrophages in human breast disease: a qualitative immunohistochemical study. *Br. J. Cancer.* 1988; 57: 174-177.
99. Kjer-Nielsen, L., Clements, A.W., Purcell, A.G., Brooks, J.C., Whisstock, S. R., Rossjohn, J. A structural basis for the selection of dominant  $\alpha\beta$  T cell receptors in antiviral immunity. *Immunity*, 2003; 18: 53-64.

100. Klein, C., Wilke, M., Pool, J., Vermeulen, C., Blockland, E., Burghart, E., Krostina, S., Wendler, N., Passlick, B., Riethmueller G., Goulmy, E. The hematopoietic system-specific minor histocompatibility antigen HA-1 shows aberrant expression in epithelial cancer cells. *J. Exp. Med.* 2002; 196: 359-368.
101. Krieg, A.M. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug Disco.* 2006; 5: 471-484.
102. Kunkel E.J, Butcher E.C. Chemokines and the tissues-specific migration of lymphocytes. *Immunity.* 2002; 16: 1-4.
103. Lauritzsen G, Hofgaard PO, Schenck K, Bogen B. Clonal deletion of thymocytes as tumor escape mechanism. *Int. J. Cancer.* 1998; 78: 216-222.
104. Lee, P.P., Yee, C., Savage, P.A., Fong, L., Davis, M.M. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat. Med.* 1999; 5: 677-685.
105. Leek RD, Harris AL, Lewis CE. Cytokine networks in solid human tumors: regulation of angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 1994; 56: 423-435.
106. Leek R.D, Hunt N.C, Landers R.J, Lewis C.E. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J. Pathol.* 2000; 190: 430-436.
107. Leek R.D, Landers R.J, Harris A.L, Lewis C.E. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *BR. J. Cancer.* 1999; 79: 991-995.
108. Leek R.D, Lewis C.E, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris A.L. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 1996; 56: 4625-4629.
109. Lehmann, C., Zeis, M., Schmitz, N., Uharek, L. Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells. *Blood* 2000; 96: 594-600.
110. Letterio J.J, Roberts A.B. Regulation of immune responses by TGF-b. *Annul. Rev. Immunol.* 1998; 16: 137-161.
111. Lewicki, H.A., Von Herrath, G., Oldstone, M.B. CTL escape viral variants. *Virology.* 1995; 211: 443-450.
112. Lewis J.S, Landers R.J, Underwood J.C, Harris A.L, Lewis C.E. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J. Pathol.* 2000; 192: 150-158.

113. Lin, C., Wang, F.H. Selective modification of antigen-specific CD4T cells by retroviral-mediated gene transfer and in vitro sensitization with dendritic cells. *Clin. Immunol.* 2002; 104: 58-66.
114. Luster A.D. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2002; 14: 129-135.
115. Maher, J., Brentjens, R.J., Gunset, G., Riviere, I., Sadelain, M. Human T lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by single chimeric TCR-CD28 receptor. *Nature Biotech.* 2002; 20: 70-75.
116. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002; 23: 549-555.
117. Marks, D.I., Hughes, T.P., Kelly, S., Goldman, J.M., HLA-identical sibling donor bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia in first chronic phase: influence of GVHD prophylaxis on outcome. *Br. J. Haematol.* 1992; 81: 383-387.
118. Martin, S.J., Amarante-Mendes, G. P., Greenberg, A.H., Green, D.R. The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE family protease, cyp32, via a novel two-step mechanism. *EMBO J.* 1996; 15: 2407-2416.
119. Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L., LeFrançois, L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 2001; 291: 2413-2417.
120. McBride, K., Baron, C., Picard, S., Martin, S., Boismenu, D., Bell, A., Perreault, C. The model B6dom1 minor histocompatibility antigen is encoded by a mouse homolog of the yeast STT3 gene. *Immunogenetics* 2002; 54: 562-569.
121. Meunier, M.C., Roy-Proulx, G., Perreault, C. Tissue distribution of target antigen has a decisive influence on the outcome of adoptive cancer immunotherapy. *Blood* 2003; 101: 766-770.
122. Meunier M.C., Delisle J.S., Bergeron J., Rineau V., Baron C., Perreault C. T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors. *Nat. Med.* 2005; 11:1222-9.
123. Mocikat, R., Braumuller, H., Gumy, A., Egeter, O., Rocken, M. Natural killer cells activated by MHC class I low targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity*, 2003; 19: 561-569.
124. Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, Felio K, Kantarjian HM, Champlin RE, et al. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nature Med.* 2000; 6:1018-23.

125. Moretta, A. Natural killer cells and dendritic cells: rendez-vous in abused tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 12: 957-964.
126. Moser, B., Loetscher, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature Immunol.* 2001; 2: 123-128.
127. Murali-Krishna, K. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 1998; 8: 177-187.
128. Mylin, L.M., Bonneua, R.H. Hierarchy among multiple H-2b-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes within simian virus 40 T antigen. *J. Virol.* 1995; 69: 6665-6677.
129. Negus R.P, Stamp G.W, Hadley J, Balzwill F.R. Quantitative assessment of the leukocytes infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of cc chemokines. *Am. J. Pathol.* 1997; 150: 1723-1734.
130. Nesbit M, Schaidler H, Miller TH, Herlyn M. Low level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells. *J. Immunol.* 2001; 166: 6483-6490.
131. Nestle, F.O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., Schadendorf, D. *Nature Medicine* 1998; 4: 328-332.
132. Nieda, M., Okai, M., Tazbirkova, A., Lin, H., Nicol, A. Therapeutic activation of V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood* 2004; 103: 383-389.
133. Nikolich-Zugich, J., M. K. Slifka, and I. Messaoudi. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4: 123-132.
134. Ochsenbein, A.F., Sierro, S., Odermatt, B., Pericin, M., Karrer, U., Hemmi, S., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction., *Nature* 2001; 411:1058-1064.
135. O'Connel, J., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K., Shanahan, F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell Killing by colon cancer cells expressing Fas ligand., *J. Exp. Med.* 1996; 184: 1075-1082.
136. Old, J. Tumour immunology: the first century. *Curr. Opin. Immunol.* 1992; 4: 603-607.
137. Onita T, Ji PG, Xuan JW. Hypoxia-induced, perinecrotic expression Hif correlates with tumor progression, vascularization, and focal macrophage infiltration in bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 471-480.

138. Onrust, S.V., Harti, P.M., Rosen, S.D., Hanahan, D. Modulation of L-selectin ligand expression during an immune response accompanying tumorigenesis in transgenic mice., *J. Clin. Invest.* 1996; 97: 54-64.
139. Pardoll, D.M. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nature Rev. Immunol.* 2002; 2: 227-238.
140. Paul, W.E. *Fundamental immunology*. Fourth edition, 1999.
141. Perreault C, Brochu S. Adoptive cancer immunotherapy: discovering the best targets. *J Mol Med.*, 2002; 80:212-8.
142. Perreault, C., Jutras, J., Roy, D.C. Identification of an immunodominant mouse minor histocompatibility antigen. *J. Clin. Invest.* 1996; 98: 622-628.
143. Perreault, C., Roy, D.C., Fortin, C. Immunodominant minor histocompatibility antigens: the major ones. *Immunol. Reviews.* 1998; 19: 69-75.
144. Petersson, M., Charo, J., Salazar-Onfray, F., Noffz, G., Mohaupt, M., Klein, G., Blankenstein, T., Kiessling, R. Constitutive IL-10 production accounts for the high NK sensitivity, low MHC class I expression, and poor transporter associated with antigen processing (TAP)-1/2 function in the prototype NK target YAC-1., *J. Immunol.* 1998; 161: 2099-2105.
145. Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokines Growth Factor Rev.* 2003, 14: 185-191.
146. Phan, G., Yang, J.C., Rosenberg, A. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100: 8372-8377.
147. Pion, S., Christianson, G., Fontaine, P., Roopenian, D.C., Perreault, C. Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocyte responses: explanation for the immunodominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens. *Blood* 1999; 93: 952-962.
148. Pion, S., Fontaine, P., Desautniers, M., Jutras, J., Filep, J.G., Perreault, C. On the mechanisms of immunodominance in cytotoxic T lymphocyte response to minor histocompatibility antigens. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27: 421-430.
149. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer.* 2004; 4:71-78.

150. Pope, C., Kim, S.K., Marzo, A., Williams, K., Jiang, J., Shen, H., LeFrançois, L. Organ-specific regulation of the CD8 T cell response to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* 2001; 166: 3402-3409.
151. Rammensee, H.G. Friede, T., Stevanović, S. MHC ligands and peptide motifs: First listing. *Immunogenetics* 1995; 41: 178-228.
152. Rangarajan, A., Weinberg, R.A. Comparative biology of mouse versus human cells: modeling human cancer in mice. *Nature Rev. Cancer* 2003; 3: 952-959.
153. Raulet, D.H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. 3: 781-790, 2003.
154. Yee, C. Riddell, S. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell clones for the treatment of melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 16168-16173.
155. Rodriguez, F., S. Harkins, M. K. Slifka, and J. L. Whitton. Immunodominance in virus-induced CD8<sup>+</sup> T-cell responses is dramatically modified by DNA immunization and is regulated by gamma interferon. *J. Virol.* 2002; 76: 4251-4259.
156. Rosenberg, S.A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001; 441: 380-384.
157. Rosenberg, S.A., Lotze M., Yang, J., Topolian, S., Steinberg, S.M. Prospective randomized trial of high-dose IL-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1993; 8: 622-632.
158. Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Schwartzentruber, D., Hwu, P., White, D.E. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nature Medicine* 1998; 4: 321-327.
159. Roy-Proulx, G., Baron, C., Perreault, C. CD8 T-cell ability to exert immunodomination correlates with T-cell receptor:epitope association rate. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2005; 11: 260-271.
160. Roy-Proulx, G., Meunier, M.C., Lanteigne, A.M., Brochu, S., Perreault, C. Immunodomination results from competition for APC resources between CTLs with different effector function. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31: 2284-2292.
161. Rush, J.S., Hodgkin, P.D. B cells activated via CD40 and IL-4 undergo a division burst but require continued stimulation to maintain division, survival and differentiation. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31: 1150-1159.
162. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401: 708-712.



163. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y. Flt-1, vascular endothelial growth factor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocytes-macrophages in humans. *Blood*. 2001; 97: 785-791.
164. Schirrmann, T., Pecher, G. Human natural killer cell line modified with a chimeric immunoglobuline T cell receptor gene leads to tumor growth inhibition in vivo. *Cancer Gene Ther*. 2006; 9: 390-398.
165. Schwartz, R.H. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukine-2 production and immunotherapy, *Cell* 1992; 71: 10655-1068.
166. Shahinian, A. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 1993; 261: 609-612.
167. Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, AT., White, JM., Old, LJ., Schreiber, RD. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001; 410: 1107-1111.
168. Shi, L., Chen, G., Macdonald, G., Bergeron, L., Greenberg, A.H. Activaton of an IL-1 converting enzyme dependent apoptosis pathway by granzyme B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93: 11002-11007.
169. Shima, Y., Nishimoto, N., Ogata, Y., Kishimoto, T. Myeloma cells express Fas antigen-APO-1 but only some are sensitive to anti Fas antibody resulting in apoptosis. *Blood*. 1995; 85: 757-764.
170. Shvemberger, I.N. Conversion of malignant cells into normal ones. *Int. Rev. Cytl*. 1986; 103: 341-386.
171. Slifka, M.K., Rodriguez, F., Whitton, J.L. Rapid on-off cycling of cytokine production by virus specific CD8 T cells. *Nature* 1999; 401: 76-79.
172. Smyth, M.J., Thia, Y.T., Street, E.A., Godfrey, D.I. Differential tumor surveillance by natural killer and NKT cells. *J. Exp. Med*. 2000; 191: 661-668.
173. Speiser, D.E., Miranda, R., Zakarian, A., Bachmann, M.F., McKall-Faienza, K., Odermatt, B., Hanahan, D., Zinkernagel, R.M., Ohashi, P.S. Self antigens expressed by solid tumors do not efficiently stimulate naïve or activated T cells: implications for immunotherapy, *J. Exp. Med*. 1997; 186 (5): 645-653.
174. Spierings, E., Wieles, B., Goulmy, E. Minor histocompatibility antigens – Big in tumor therapy. *Trends in immunol*. 2003; 167: 1-5.
175. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99: 351-358.

176. Strand, S., Hofmann, W.J., Hug, H., Muller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S.M., Stremmel, M., Krammer, P.H., Galle, P.R., Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells – a mechanism of immune evasion?, *Nature Med.* 1996; 2: 1361-1370.
177. Street, S.E.A., Hayakawa, Y., Zhan, Y., Smyth, M.J. Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and  $\gamma\delta$  T cells. *J. Exp. Med.* 2004; 199: 879-884.
178. Suttmuller, R.P., Duivenvoorde, L.M., Van Elsas, A., Schumacher, T.N., Wildenberg, M.E., Melief, C.J. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25+ regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte response. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 823-832.
179. Sykulev, Y., Eisen, H.N. The law of mass action governs antigen stimulated cytolytic activity of CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 11990-11992.
180. Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. Toll-like receptors. *Annual Rev. Immunol.* 2003; 21: 335-376.
181. Talanian, R.V., Yang, X., Turbov, J., Froelich, C.J. Granule-mediated killing: pathways for granzyme B initiated apoptosis. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 1323-1331.
182. Tan, J.T., Whitmire, J.K., Ahmed, R., Pearson, T.C., Larsen, C.P.  $\beta$ -1VV ligand a member of the TNF family is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J. Immunol.* 1999; 163: 4859-4868.
183. Teague, T.K. Activation changes the spectrum but not the diversity of genes expressed by T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96: 12691-12696.
184. Timmerman, J.M., Czerwinski, D., Davis, T., Benike, C., Engleman, E., Levy, R. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 2002; 99: 1517-1526.
185. Tuosto, L., Acuto, O. CD28 affects the earliest signaling events generated by TCR engagement. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 2131-2142.
186. Tykodi, S., Warren, E., Thompson, J., Riddell, S., Childs, R., Otterud, B., Leppert, M., Storb, R., Sandmaier, B. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for metastatic renal cell carcinoma after nonmyeloablative conditioning: toxicity, clinical response, and immunological response to minor histocompatibility antigens. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 7799-7811.

187. Townsend, S.E., Allison, J.P. Tumour rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 1993; 259: 368-370.
188. Van den Broek, M.F., Kagi, D., Osendorpp, F., Toes, R., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 1781-1790.
189. Van, W.C., Schreiber, H. Immunodominance deters the response to other tumor antigens thereby favoring escape: prevention by vaccination with tumor variants selected with cloned cytolytic T cells in vitro. *Tissue Antigens.* 1996; 47: 399-407.
190. Van der most, R.G., Ahmed, R., Sette, A. Uncovering subdominant cytotoxic T lymphocyte responses in LCMV infected balb-c mice. *J. Virol.* 1997; 71: 5110-5114.
191. Van Elsas, A., Suttmuller, R.P., Hurwitz, A., Ziskin, J., Villasenor, J., Allison, J.P. Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocytes antigen-4 blockade in combination with B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 481-489.
192. Vanio, H., Magee, P.N., McGregor, D., McMichael, A.J. Mechanisms of carcinogenesis in risk identification. *IARC Sci. Publ.* 1992; 116: 9-56.
193. Van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and application. *J. Immunol. Methods.* 1994; 174: 83-93.
194. Van Stipdonk, M.J., Lemmens, E.E., Schoenberger, S.P. Naïve CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat. Immunol.* 2001; 2: 223-229.
195. Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A., Rocha, B. Response of naive and memory CD8 T cells to antigen stimulation in vivo. *Nature Immunol.* 2000; 1: 47-53.
196. Veugelers, K., Motyka, B., Goping, I. S., Shostak, I., Sawchuk, T., Bleakley, C. Granule-mediated killing by granzyme B and perforin requires a mannose 6-phosphate receptor and is augmented by cell surface heparin sulfate. *Mol. Biol. Of the cell* 2006; 17: 623-633.
197. Voehringer, D., Blaser, C., Brawand, P., Raulat, D.H., Hanke, T., Pircher, H. Viral infections induce abundant numbers of senescent CD8 T cells. *J Immunol.* 2001; 167: 4838-4843.
198. Von Andrian, U. H., Mackay, C.R. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 1020-1034.

199. Von Mehren, M., Adams, G., Weiner, L.M. Monoclonal antibody therapy for cancer. *Annual Rev. Medicine* 2003; 54: 343-369.
200. Wadler, S., Schwartz, E. L. New advances in interferon therapy of cancer. *The oncologist* 1997; 2: 254-267.
201. Waldmann, T.A., White, J.D., Nelson, D.L. Radioimmunotherapy of IL-2Ralpha-expressing adult T cell leukemia with Yttrium-90-labeled anti-tac. *Blood* 1995; 86: 4063-4075.
202. Walter, E.A., Greenberg, P.D., Finch, R.J., Thomas, E.D., Riddell, S.R. Reconstitution of cellular immunity against CMV in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T cell clones from donor. *New Eng. J. Med.* 1995; 333: 1038-1044.
203. Walzer, T., Arpin, C., Beloïel, L., Marvel, J. Phenotype et fonctions des lymphocytes T CD8 memoire. *Médecine Sciences* 2001; 17: 1105-1111.
204. Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Pardoll D, Yu H. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat. Med.* 2003; 10(1): 48-54.
205. Warnock, R.A., Askari, S., Butcher, E.C., Von Andrian, U.H. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J. Exp. Med.* 1998; 187: 205-216.
206. Wei, W.Z., Morris, G.P., Kong, Y.C. Anti-tumor immunity and autoimmunity: a balancing act of regulatory T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 2004; 53: 73-78.
207. Weidt, G., Utermohlen, O. Relationship among immunodominance of single CD8 T cell epitopes, virus load, and kinetics of primary antiviral CTL response. *J. Immunol.* 1998; 160: 2923-2931.
208. Weninger, W., Crowley, M.A., Manjunath, N., Von Andrian, U.H. Migratory properties of naïve, effector, and memory CD8 T cells. *J. Exp. Med.* 2001. 194: 953-966.
209. Wettstein, P.J. Immunodominance in the T-cell response to multiple non-H2 histocompatibility antigens. *J. Immunol.* 1986; 137: 2073-2079.
210. Whitmire, J.K. CD40-CD40 ligand costimulation is required for generating antiviral CD4 T cell responses but is dispensable for CD8 T cell responses. *J. Immunol.* 1999; 163: 3194-3201.
211. Wilhem, M., Kunzmann, V., Eckstein, S., Tony, H.  $\gamma\delta$  T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003; 102: 200-206.
212. Wong, P., Pamer, E.G. Antigen-independent CD8 T cell proliferation. *J. Immunol.* 2001; 166: 5864-5868.

213. Wrzesinski, C., Restifo, N.P. Less is more: lymphodepletion followed by hematopoietic stem cell transplant augments adoptive T cell-based anti-tumor immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 2005; 17: 195-201.
214. Yamashiro S, Takeya M, Nishi T. Tumor derived monocyte chemoattractant protein-1 induces intratumoral infiltration of monocyte-derived macrophage subpopulation in transplanted rat tumors. *Am. J. Pathol.* 1994; 145: 856-867.
215. Yang, Y., Chang, J.F., Parnes, J.R., Fathman, C.G. T cell receptor engagement leads to activation-induced splicing of tumor necrosis factor nuclear pre-mRNA. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 247-254.
216. Yang, X., Froelich, C.J. Granzyme B mimics apical caspases. *J. Biol. Chem.* 1997; 273: 34278-34283.
217. Ye, X., McCarrick, J., Jewett, L., Knowles, B.B. Timely immunization subverts the development of peripheral nonresponsiveness and suppresses tumor development in simian virus 40 tumor antigen-transgenic mice., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91: 3916-3920.
218. Yee, C., Thompson, J.A., Riddell, S., Greenberg, P.D. Adoptive T cell therapy using antigen-psecific CD8+ T cells clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration and anti-tumor effect of transferred T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 16168-16173.
219. Yewdell, J. W., Bennick, J.R. Immunodominance in major histocompatibility complex class-I-restricted T lymphocytes responses. *Ann. Rev. Immunol.* 1999; 17: 51-88.
220. Yewdell, J. W., Del Val, M. Immunodominance in TCD8<sup>+</sup> responses to viruses; cell biology, cellular immunology, and mathematical models. *Immunity* 2004; 21: 149-153.
221. Yoshida H, Hayashi S. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature.* 1990; 345: 442-444.
222. Yoshie O. Role of chemokines in trafficking of lymphocytes and dendritic cells. *Int. J. Hematol.* 2000; 72: 399-407.
223. Youne A., Pro, B., Robertson, M. J., Flinn, I. W., Samaniego, F. Phase II clinical trial of IL-12 in patients with relapsed and refractory non-hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 5432-5438.
224. Zeng, Q., Tran, T.T., Tan, H.X., Hong, W. The cytoplasmic domain of Vamp4 and Vamp5 is responsible for their correct subcellular targeting: the N-terminal extension of VAMP4 contains a dominant autonomous targeting signal for the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 23046-23054.

225. Zinkernagel, R., Ehl, S., Aichele, P., Oehen, S., Kundig, T., Hengartner, H. Antigen localization regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol. Reviews* 1997; *156*: 199-209.

